



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

**“CALIDAD Y PROTEOMA DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae*
PRODUCIDOS CON ATMÓSFERAS MODIFICADAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

M. en B. Nohemi García Ortiz

DIRECTOR: Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESORES: Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

Dr. SAÚL TLECUITL BERISTAIN

Ciudad de México a 14 de diciembre de 2016

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados (PNPC) del CONACYT en el nivel de Competencia Internacional, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el No. de referencia 001466.

Ciudad de México a 14 de diciembre de 2016

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

“Calidad y proteoma de conidios de *Metarhizium anisopliae* producidos con atmósferas modificadas”

que presentó:

Nohemi García Ortiz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Saúl Tlecuítl Beristain. Universidad Politécnica de Tlaxcala

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres_____

Secretario: Dr. Misael Garza López_____

Vocal: Dr. Francisco Figueroa Martínez_____

Vocal: Dr. Saúl Tlecuítl Beristain_____

Ciudad de México a 14 de diciembre de 2016

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

-Calidad y proteoma de conidios de *Metarhizium anisopliae* producidos con atmósferas modificadas"

que presentó:

Nohemi García Ortiz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Saúl Tlecuil Beristain. Universidad Politécnica de Tlaxcala

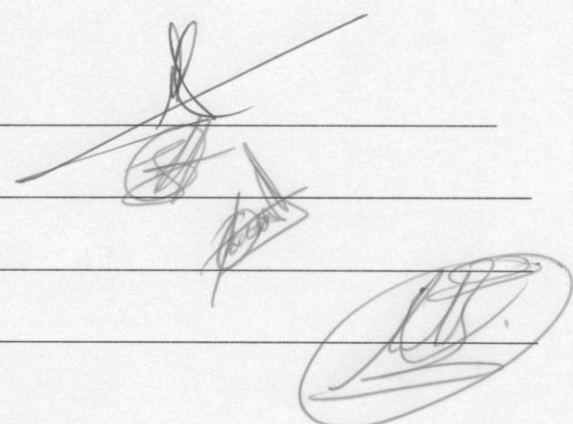
Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres _____

Secretario: Dr. Misael Garza López _____

Vocal: Dr. Francisco Figueroa Martínez _____

Vocal: Dr. Saúl Tlecuil Beristain _____





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00177

Matrícula: 210389335

CALIDAD Y PROTEOMA DE
CONIDIOS DE *Matarhizium*
anisopliae PRODUCIDOS CON
ATMÓSFERAS MODIFICADAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de diciembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
DR. SAUL TLECUITL BERISTAIN
DR. FRANCISCO FIGUEROA MARTINEZ
DR. PAUL MISAEAL GARZA LOPEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: NOHEMI GARCIA ORTIZ

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

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

[Signature]
DR. ERNESTO FAVELA TORRES

VOCAL

[Signature]
DR. SAUL TLECUITL BERISTAIN

VOCAL

[Signature]
DR. FRANCISCO FIGUEROA MARTINEZ

SECRETARIO

[Signature]
DR. PAUL MISAEAL GARZA LOPEZ

AGRADECIMIENTOS

Principalmente al Dr. Octavio Loera, por brindarme un lugar en su laboratorio, en el que crecí como persona y como profesional, le agradezco profundamente haber confiado en mí y por todo el apoyo que me dio, sobre todo, porque después de todos estos años le considero mi amigo.

A mis asesores, Dr. Ernesto Favela y Dr. Saúl Tlecuítl, por sus comentarios siempre acertados y por su contribución a este proyecto.

A mis sinodales, Dr. Francisco Figueroa y Dr. Misael Garza, por todo el apoyo brindado y por sus comentarios que sirvieron para la mejora y enriquecimiento del presente documento.

A los doctores Ulises Navarro, Gabriela Carrillo y Alicia Chagolla, por la ayuda y la asesoría en la parte de análisis de imágenes y proteómica, este trabajo no hubiera llegado a buen puerto sin toda su valiosa ayuda.

A los que son y fueron mis compañeros de laboratorio, Miguel, Jorge, Sayuri, Gerardo, Emmanuel, Viky, Briseida, Facundo, David, Roberto Montesinos, Rafael A. Cuapio, por el inmejorable ambiente de trabajo y por todas las críticas constructivas.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, verdaderamente una casa abierta al tiempo y por ser un hogar para mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (248839).

DEDICATORIA

Antes de comenzar es impórtate mencionar que todos lo aquí mencionados se encuentran en orden cronológico, según recuerdo los conocí, por favor nadie se ofenda por el orden de las circunstancias.

A mi madre y a mi padre, mis mejores ejemplos de lucha. A lo largo de mi vida nunca hubieron muchas palabras pero los hechos siempre los han respaldado, gracias por básicamente todo lo bueno que tengo en este mundo, yo creo que está claro que no hubiera llegado hasta aquí sin ustedes.

A mis hermanas, por todo el cariño que me han dado, que siempre será mi referente y por todo el cuidado y tiempo que pusieron en mí, espero poder pagarlo algún día.

A Adriana, por todos estos años, por ser mi primer ejemplo de auténtica amistad, de desinterés, de apoyo, de ser familia sin tener cierta cantidad de genes en común

A David Ortega, por ser mi amigo y mi “sensei”, por enseñarme matemáticas, física, química y sobre todo a ser una buena amiga, gracias por todos estos años de amistad.

A León Sánchez, por apoyarme siempre en los momentos críticos de la vida, y aparecer justo cuando se necesita.

A Jazmín Méndez, por las enseñanzas recibidas, por su invaluable amistad, por todo el trabajo compartido. ¿Qué sería de mí sin usted en el W104?

A Francisco Miranda, por todas las primeras instrucciones sobre los hongos entomopatógenos, por la discusión amable, por la crítica constructiva.

A Jorge y Anita por esos días cuidándonos y alimentándonos mutuamente, por ir por mí a la UAM aun cuando era ya muy tarde, por todas las risas y la anécdotas.

A mis sobrinos Fernanda y Pablo, bueno, básicamente por ser la parte más dulce de la familia, por llenarnos de alegría nuevamente, por sembrar nuevos sueños en la casa.

A los doctores Misael y Josefa, por recibirme en su hogar siempre con cariño, por todo el apoyo y la amistad brindada.

A Gerardo Suárez, por todo el apoyo brindado en la parte experimental de este trabajo, por repetirme constantemente de lo que puedo ser capaz, por recordarme que somos familia, por toda la risa, también el llanto, porque enseñándote lo que sé, yo he aprendido más.

A Rayan Aarald, por todos esos días de liofilización y por tu hermosa amistad, todavía me pregunto ¿Qué hubiera hecho sin ti y tu liofilizadora?

A Wylma por enseñarme a dar los primeros pasos hacia la proteómica, por toda tu paciencia, por toda tu buena disposición.

A Nemi, Pepe, Víctor Sánchez, Isabel Reyes, Paulina que sin ser parte del W104, siempre tuvieron la disposición de ayudarme.

A Daniel Hernández, Silvia, Víctor y Daniel Cisneros, por su amistad y por todos los días de alegría.

A Maribel y Rocío, por las risas sabatinas y dominicales, yo creo que mi inglés no hubiera mejorado sin ustedes.

A todos los que han tocado mi vida, han aportado a esta tesis de una u otra manera, muchas gracias.

CONTENIDO

Índice de figuras.....	v
Índice de tablas.....	vi
Índice de gráficas.....	vii
Resumen.....	ix
Lista de abreviaciones.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 Hongos entomopatógenos.....	3
1.1.1 Producción de hongos entomopatógenos.....	4
1.1.2 Calidad de conidios de hongos entomopatógenos.....	5
1.1.3 Ciclo infeccioso de los hongos entomopatógenos.....	7
1.2 Fuentes de especies reactivas.....	11
1.3 Defensa antioxidante.....	14
1.4 Estrés oxidante, diferenciación celular y respuesta de hongos filamentosos al oxígeno.....	16
1.5 Respuesta de hongos a factores ambientales y durante el cultivo.....	18
1.6 Pre-exposición a estrés moderado.....	19
1.7 Proteómica de conidios de hongos filamentosos.....	20
2 ANTECEDENTES.....	24
3 JUSTIFICACIÓN.....	26
4 HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares.....	28
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30

7.1	Microorganismo.....	30
7.2	Medio de cultivo.....	30
7.3	Reactivación de la cepa y cultivo monoclonia.....	30
7.4	Producción del inóculo.....	31
7.5	Producción de conidios y modificación de la atmósfera.....	31
7.6	Cuantificación de la producción de conidios.....	32
7.7	Determinación del tiempo crítico de respuesta a pulsos de oxígeno.....	32
7.8	Pruebas de calidad.....	33
7.8.1	Viabilidad.....	33
7.8.2	Hidrofobicidad	33
7.8.3	Termotolerancia de conidios	34
7.8.4	Infectividad.....	35
7.9	Extracción de proteína intracelular de conidios <i>Metarhizium anisopliae</i>	35
7.10	Determinación de la concentración de proteína.....	36
7.11	Determinación del tiempo de ruptura de células.....	37
7.12	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE).....	37
7.13	Electroforesis bidimensional (2D-SDS PAGE).....	39
7.14	Adquisición de imágenes e identificación de las proteínas con cambio de abundancia.....	41
7.14.1	Estimación de Peso Molecular y del punto Isoeléctrico.....	41
7.15	Digestión tróptica en gel.....	42
7.16	Análisis por espectrometría de masas.....	43
7.17	Identificación de proteínas.....	44
7.18	Actividades enzimáticas de enzimas antioxidantes.....	44
7.18.1	Obtención del extracto crudo enzimático (ECE)	44
7.18.2	Actividad Glutación Peroxidasa (GPx).....	45
7.18.3	Actividad Glutación Reductasa (GR).....	47
7.18.4	Actividad Catalasa-Peroxidasa (CPs).....	48

7.18.5	Actividad superóxido dismutasa (SOD).....	50
7.19	Análisis estadístico.....	51
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
8.1	Producción de conidios.....	53
8.2	Tiempo crítico de respuesta a pulsos de oxígeno.....	55
8.3	Pruebas de calidad.....	57
8.3.1	Viabilidad.....	57
8.3.2	Hidrofobicidad.....	59
8.3.3	Termotolerancia.....	61
8.3.4	Infectividad.....	63
8.4	Tiempo óptimo para la ruptura de conidios.....	65
8.5	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	67
8.6	Análisis proteómico de proteínas intracelulares de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> basado en geles 2D SDS PAGE.....	68
8.6.1	Grupo I: Proteínas relacionadas con infectividad.....	78
8.6.2	Grupo II: Proteínas implicadas en la resistencia al estrés.....	80
8.6.3	Grupo III: Proteínas implicadas en el metabolismo.....	85
8.6.4	Grupo IV: Proteína con función desconocida.....	87
8.7	Actividad de enzimas antioxidantes.....	88
8.7.1	Glutación Peroxidasa.....	91
8.7.2	Glutación Reductasa.....	93
8.7.3	Catalasa Peroxidasa.....	95
8.7.4	Superóxido Dismutasa.....	98
9	RESUMEN DE RESULTADOS.....	103
10	CONCLUSIÓN.....	105
11	PERSPECTIVAS.....	106
12	REFERENCIAS.....	107
13	ANEXO I.....	121

13.1	Curva estándar de proteína.....	121
13.2	Curvas estándar de peso molecular y punto isoeléctrico.....	122
13.3	Curva estándar Cps.....	123
13.4	Curva estándar SOD.....	124
14	ANEXO II.....	126
14.1	Análisis de imágenes.....	126
15	ANEXO III.....	128
15.1	Trabajos presentados en congresos.....	128
15.2	Publicación internacional.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de infección de <i>Metarhizium</i> (A) Conidio germinado produciendo un apresorio, (B) Micelio siendo atacado por hemocitos en la hemolinfa, (C) Diferenciación a blastosporas, (D) Cadáver con hifas emergentes que producen conidios (E). CO, conidios, AP, apresorio, barra 5 μm Tomado de Gao et al., (2011).	8
Figura 2. Proceso infectivo de los Hongos Entomopatógenos tomado de Samuels et al., (2016).	9
Figura 3. Mitocondrias de <i>Neurospora crassa</i> marcadas con fluorescencia mediante la expresión de proteína verde fluorescente (izquierda) y microscopía de contraste de fases (derecha) durante diferentes periodos de tiempo. (A) Conidioesporas antes de la germinación, (B) Conidioesporas recién germinadas, (C) Punta de hifa después de 4 horas de incubación, (D) hifa después de incubación durante toda la noche. Barra 5 μm . Tomado de Fuchs et al., (2002).	11
Figura 4. Formación del radical hidroxilo teniendo como primer paso (A) la reducción del catión férrico a ferroso, como segundo paso la (B) reacción de Fenton y finalmente la reacción neta, conocida como la reacción de (C) Haber-Weiss. Tomado de Valko et al., (2005).	13
Figura 5. Modelo del papel de la cadena respiratoria en condiciones de hipoxia, tomado de Castello et al., (2006).	14
Figura 6. Sistema detoxificante, tomado de Schafer y Buettner, (2001). γ -Glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS), Glutación sintetasa (GS), Glutación peroxidasa (GPx), Glutación reductasa (GR), Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD).	15
Figura 7. Modelo de la regulación de la diferenciación celular causada por especies reactivas de oxígeno, tomado de Aguirre et al., (2005).	18
Figura 8. Mini-PROTEAN® 3 Dodeca™ Cell	40
Figura 9. Marcador de peso molecular (All Blue)	42
Figura 10. Reacciones acopladas para cuantificar la actividad glutación peroxidasa	46
Figura 11. Reacción catalizada por la Glutación Reductasa	47
Figura 12. Reacción catalizada por la Catalasa Peroxidasa	48
Figura 13. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa	50
Figura 14. Esquema del fundamento del ensayo para medir actividad superóxido dismutasa	50
Figura 15. (A) Conidios rotos de <i>M. anisopliae</i> después del tratamiento de 6 min con ciclos de 30 s rompimiento 30 s enfriamiento en un Mini-beadbeater 16 (B) Conidios de <i>M. anisopliae</i> que no se sometieron a rompimiento.	66
Figura 16. SDS PAGE, carril 1- marcador de peso molecular, carril 2- proteína intracelular de conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos bajo atmósfera normal (21 % O_2), carril 3 -proteína intracelular de conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos bajo atmósfera enriquecida con 30 % O_2	67
Figura 17. Diagrama de Venn de las manchas proteicas que se identificaron por análisis de imágenes en geles en dos dimensiones.	69
Figura 18. Geles representativos 2D SDS PAGE de proteína intracelular de conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos de (A) atmósfera normal (21 % O_2) y (B) bajo atmósfera enriquecida con 30 % O_2 .	69





Figura 19. Manchas proteicas donde se identificaron (A) Carboxilesterasa, (B) Lectina de hongos específica para fucosa, (C) Proteína disulfuro isomerasa, (D) Proteasa vacuolar A, (E) Catalasa / Peroxidasa, (F) Enolasa.	74
Figura 20. Manchas proteicas donde se identificaron (G) Proteína Hipotética 26147, (H) Aldehído deshidrogenasa, (I) Proteína de choque térmico 88, (J) Dipeptidil peptidasa, (K) Tirosina hidroxilasa y (L) Transaldolasa.	75
Figura 21. Reacciones que cataliza la Catalasa/Peroxidasa bifuncional, (1) actividad peroxidática y (2) la oxidoreducción de H ₂ O ₂	81
Figura 22. Mancha proteica SSP 3401 (A) proteína de conidios obtenidos bajo atmósfera normal (21 % O ₂) y de (B) proteína intracelular de conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos bajo atmósfera enriquecida con 30 % O ₂ , la flecha indica la mancha que ha cambiado incrementado 34.5 veces en abundancia ($p < 0.05$) con respecto a las condiciones atmosféricas normales	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla para preparar geles de poliacrilamida	38
Tabla 2. Solución de carga	38
Tabla 3. Solución amortiguadora de corrida 10 X (Laemmli)	39
Tabla 4. Solución fijadora	39
Tabla 5. Solución de tinción "Blue silver"	39
Tabla 6. Solución amortiguadora de solubilización.	40
Tabla 7. Solución amortiguadora de equilibrio	40
Tabla 8. Mezcla de reacción para determinar actividad glutatión peroxidasa	46
Tabla 9. Mezcla de reacción para determinar Actividad Glutatión Reductasa	48
Tabla 10. Mezcla de reacción para determinar Actividad Catalasa Peroxidasa	49
Tabla 11. Mezcla de reacción para determinar actividad SOD.	51
Tabla 12. Parámetros de termotolerancia de los conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos de los diferentes tratamientos con O ₂ , expuestos a 45 ± 1 °C. Las letras indican los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).....	61
Tabla 13. Parámetros de infectividad de conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos de distintas atmósferas modificadas con larvas de <i>T. molitor</i> como hospedero.	64
Tabla 14. Soluciones estándar de formaldehído	123
Tabla 15. Estándares de actividad SOD	125

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Cinética de producción de conidios con pulsos de 16 % (●); 21 % (◇, línea punteada); 26 % (▼); 30 % (○, línea negra intensa) y 40 % (■) de O ₂ en la atmósfera del cultivo de <i>M. anisopliae</i> . La flecha indica el tiempo en que se inició el cambio atmosférico.	54
Gráfica 2. Producción máxima de conidios (C _{max}) en función del tiempo en que se aplicó el primer recambio atmosférico conteniendo 30 % de O ₂ (■).	56
Gráfica 3. Porcentaje de viabilidad de conidios de <i>M. anisopliae</i> (promedio ± desviación estándar) producidos bajo atmósferas modificadas conteniendo diferentes concentraciones de oxígeno (16 % (◻), 21 % (■), 26 % (□), 30 % (■) y 40 % (▨)). Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Prueba de Tukey $p < 0.05$).	58
Gráfica 4. Hidrofobicidad de conidios de <i>M. anisopliae</i> (promedio ± desviación estándar) producidos bajo atmósferas modificadas conteniendo diferentes concentraciones de oxígeno (16 % (◻), 21 % (■), 26 % (□), 30 % (■) y 40 % (▨)). Barras con diferente letra indican diferencias estadísticas significativas (Prueba de Tukey $p < 0.05$).	60
Gráfica 5. Supervivencia de conidios a distintos tiempos de rompimiento celular. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada tiempo de ruptura ($p < 0.05$).	65
Gráfica 6. Factor normalizado de abundancia espectral (NSAF) para las proteínas identificadas en las manchas proteicas (A) 1802, (B) 2502, (C) 3401, (D) 3703. Para identificar el nombre de las proteínas, se utilizó el sistema de abreviaturas de que se describe en la Tabla 14.	76
Gráfica 7. Factor normalizado de abundancia espectral (NSAF) para las proteínas identificadas en las manchas proteicas (E) 3802, (F) 3808, (G) 4508, (H) 4608. Para identificar el nombre de las proteínas, se utilizó el sistema de abreviaturas de que se describe en la Tabla 14.	77
Gráfica 8. Bigráfica del Análisis de Componentes Principales, Viabilidad (V, %), Hidrofobicidad (H), Supervivencia (S, %), Tiempo de supervivencia 50 (TS50, d), Tiempo letal 50 (TL50), Glutación peroxidasa (GPx, U/mg de proteína), Glutación reductasa (GR, U/mg de proteína), Catalasa / Peroxidasa (CPs, U/mg de proteína), Superóxido dismutasa (SOD, U/mg de proteína), 16 (16 % O ₂), 21 (21 % O ₂), 30 (30 % O ₂) y 40 (40 % O ₂).	90
Gráfica 9. Actividad Glutación Peroxidasa de conidios de <i>M. anisopliae</i> , obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 % (◻), 21 % (■), 30 % (■) y 40 % (▨)). Las barras con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).	92
Gráfica 10. Actividad Glutación Reductasa de conidios de <i>M. anisopliae</i> , obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 % (◻), 21 % (■), 30 % (■) y 40 % (▨)). Las barras con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).	94
Gráfica 11. Actividad Catalasa Peroxidasa de conidios de <i>M. anisopliae</i> , obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 % (◻), 21 % (■), 30 % (■) y 40 % (▨)). Las barras	

con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).....	96
Gráfica 12. Actividad Superóxido dismutasa de conidios de <i>M. anisopliae</i> , obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 %  , 21 %  , 30 %  y 40 % ). Las barras con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).....	100
Gráfica 13. Curva estándar de albúmina sérica bovina.	121
Gráfica 14. Curva estándar de movilidad relativa de proteínas.....	122
Gráfica 15. Curva estándar del punto isoeléctrico de proteínas.....	123
Gráfica 16. Curva estándar de Formaldehído.	124
Gráfica 17. Curva estándar de Actividad SOD.....	125

RESUMEN

Los plaguicidas químicos pueden matar una amplia gama de insectos rápidamente y de manera rentable; sin embargo, sus efectos secundarios son problemáticos, pues la presión selectiva conduce a la resistencia de los insectos a los pesticidas provocando daños al ecosistema y efectos tóxicos residuales tanto para los seres humanos como para los animales. Una alternativa es disminuir estos efectos adversos utilizando enemigos naturales de plagas de insectos, como los hongos entomopatógenos, que ya se producen, comercializan y se aplican en campo; sin embargo, estos agentes de control biológico se afectan por las elevadas temperaturas en campo, así como la respuesta inmune del insecto, por lo tanto, encontrar una estrategia para mejorar parámetros de calidad de los conidios de hongos entomopatógenos es aún un desafío; por lo cual en esta investigación se aplicaron atmósferas modificadas (16, 26, 30 y 40 % O₂) bajo las cuales se cultivó al hongo entomopatógeno *Metharizium anisopliae* CP-OAX y se comparó con una atmósfera normal (21 % O₂). Se utilizó un enfoque proteómico comparativo para dilucidar la respuesta de *M. anisopliae* ante un posible estrés oxidante causado por la concentración de oxígeno en la atmósfera y posteriormente, se analizó la actividad de enzimas antioxidantes, finalmente estas se relacionaron con los parámetros de calidad que se midieron en la primera etapa de esta investigación (viabilidad, hidrofobicidad, infectividad y termotolerancia).

El análisis de la producción y calidad de conidios mostró que la mayor producción de conidios de *M. anisopliae* se encontró con atmósferas ricas en oxígeno (26 y 30 % O₂), pero la máxima productividad se encontró a las 132 h con 30 % O₂ al modificar la atmósfera a partir de las 60 h de cultivo. Esta misma concentración de oxígeno provocó que los conidios exhibieran mejores parámetros de calidad, viabilidad, termotolerancia e infectividad, incrementando un 17.02%, 62.8% y 34.20% respectivamente, con respecto a los conidios cultivados bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂), mientras los conidios obtenidos con atmósferas conteniendo 16 y 40 % O₂ presentaron los valores más bajos en los parámetros de calidad.

La respuesta a un incremento en la concentración de oxígeno aplicado al cultivo de *M. anisopliae* a partir de las 60 h implicó cambios en el tipo de proteínas. Las proteínas de los conidios obtenidos bajo estas condiciones fueron diferentes a las presentes en conidios cultivados bajo una atmósfera normal (21 % O₂). Se identificaron cuatro grupos de proteínas relacionadas con la infectividad (I), la resistencia al estrés (II), el metabolismo (III) y por último una proteína cuya función no está determinada (IV).

Especialmente, las proteínas relacionadas con la infectividad pudieron contribuir al incremento en la mortalidad de larvas de *Tenebrio molitor*, puesto que la sobrevivencia de los insectos infectados con conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30% O₂) fue de 7.6% contra 34.2% de sobrevivencia de los insectos infectados con conidios obtenidos bajo una atmósfera normal (21% O₂). Por su parte, las alteraciones metabólicas parecen jugar un papel importante en las células eucariotas para enfrentar el estrés y también en *Metarhizium anisopliae*, esto quedó evidenciado por las proteínas que están implicadas en el metabolismo (III) donde está incluida la transaldolasa, que participa en la recuperación del poder reductor, lo cual parece ser importante pues por su parte la actividad de la enzima glutatión reductasa se incrementó en los conidios obtenidos en todas las atmósferas modificadas.

Mediante un análisis de componentes principales se demostró que la elevación de la actividad catalasa/peroxidasa se correlaciona con los parámetros de calidad, infectividad (S, $r = 0.807$; $p \geq 0.05$), y viabilidad (V, $r = 0.859$; $p \geq 0.05$), tanto en los conidios obtenidos con atmósfera normal (21 % O₂) como con atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂), esta relación concuerda con el hecho de que sólo los conidios obtenidos bajo estas condiciones pueden infectar a más del 80 % de los insectos en un bioensayo.

Hasta donde sabemos este estudio es el primero en realizar un análisis proteómico de conidios obtenidos con atmósferas modificadas. Los resultados obtenidos contribuyen a una mejor comprensión de los eventos moleculares implicados en la mejora de parámetros de calidad, por medio de una modificación de la concentración de oxígeno en la atmósfera. Por último, una posible aplicación sería tomar cepas de *M. anisopliae* cultivadas bajo una atmósfera rica en oxígeno (30% O₂) las cuales podrían exhibir menor formación de sectores y mayor cantidad de conidios, lo que mejoraría económicamente la comercialización de estas unidades infectivas.

LISTA DE ABREVIACIONES

ADS: Agar Dextrosa Sabouraud	mL: mililitros
AMS: Agar Maltosa Sabouraud	MPa: Mega Pascal
ADN: ácido desoxirribonucleico	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ARNm: ácido ribonucleico, mensajero	NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ATP: Adenosín trifosfato	NO: Óxido nítrico
BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local	OH⁻: Ión hidroxilo
BSA: Albúmina sérica bovina	OH•: Radical hidroxilo
CAT: Catalasa monofuncional	ONOO⁻: Peroxinitrito
CHAPS: (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato)	PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
CID: Disociación inducida por colisión	pI: punto isoelectrico
CPs: Catalasa / Peroxidasa	PM: peso molecular
d: día	s: segundos
DTPA: ácido dietilentriaminopentaacético	SDS: Dodecil sulfato de sodio
DTT: Ditiotreitól	SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
ECE: Extracto crudo enzimático	SOD: Superóxido dismutasa
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	TEMED: tetrametiletildiamina
ERO: Especies reactivas de oxígeno	Tween 80: polisorbato 80
FADH: Flavín adenín dinucleótido	UFC: Unidades formadoras de colonia
FU: Unidades de fluorescencia	UPLC: Cromatografía de líquidos de ultra presión
GPx: Glutati6n peroxidasa	UV: ultra violeta
GR: Glutati6n reductasa	%C, C es la concentraci6n de bisacrilamida
h: hora	%T, T es la concentraci6n total de mon6meros de acrilamida y bisacrilamida.
H₂O₂: Per6xido de hidr6geno	
HSP: Proteínas de choque térmico	
MIP: Manejo Integrado de Plagas	

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos, de los cuales el género *Metarhizium* es uno de los más utilizados (Faria y Wright, 2007), tienen importantes aplicaciones dentro del control biológico de plagas principalmente porque representan una alternativa ambientalmente amigable tanto para el control de plagas como para la preservación de la salud pública (Dawkar et al., 2013) pues los conidios de hongos entomopatógenos no son tóxicos para el ser humano; además, hasta el momento no se ha reportado el desarrollo de resistencia de los insectos plaga a la infección por hongos entomopatógenos, lo cual es muy común cuando se usan plaguicidas químicos para el control de plagas por periodos de tiempo prolongados (Farenhorst et al., 2009).

Los conidios de los hongos entomopatógenos infectan a los insectos blanco por contacto, es decir, en la primera parte de la infección los conidios deben ser capaces de adherirse a la cutícula del insecto por interacciones hidrofóbicas, penetrar esta cutícula y posteriormente deben enfrentar la respuesta inmune del insecto. Los conidios aplicados en el campo para el control biológico de plagas deben cumplir con ciertos parámetros de calidad que les permitan afrontar diversas condiciones de estrés a las que estarán sometidos previo y durante el proceso de infección; por ejemplo, una vez aplicados en el campo los conidios permanecen expuestos a factores abióticos como a luz UV, la temperatura, la humedad, que inducen un estado de estrés en el conidio; una vez comenzado el procesos infeccioso, los conidios deben superar los mecanismos de defensa de los insectos; entre los más importantes es que el insecto libera especies reactivas de oxígeno (ERO) lo cual, aunado con la producción de ERO por el metabolismo aeróbico propio del hongo, también contribuye a la generación de estrés oxidante. Por lo tanto, el éxito de la aplicación de los hongos entomopatógenos como bioplaguicidas recae en la producción de conidios de buena calidad que sean resistentes a diferentes tipos de estrés (Tseng et al., 2011).

Aunque se sabe que en incremento en las ERO provoca daños en diferentes estructuras celulares, también se ha reportado que el incremento en la concentración intracelular de algunas especies reactivas de oxígeno está relacionado con el proceso de diferenciación celular de hifas a conidios (Aguirre et al., 2005). Por otra parte, se ha observado que la exposición de ciertos microorganismos a un estrés moderado puede mejorar su tolerancia a mayores niveles de estrés, incluso cuando éstos son causados por factores diferentes al estresor original. A este fenómeno se le ha denominado *protección cruzada* y se cree que podría estar relacionado con la modificación en la síntesis de ciertas proteínas durante la exposición al factor estresor inicial (Rangel., 2011).

Con base en lo anterior, se han planteado estrategias experimentales diseñadas para tomar ventaja del conocimiento básico de los procesos de diferenciación celular inducido por ERO y de la existencia del fenómeno de protección cruzada; en el caso particular de esta tesis, la estrategia es someter al hongo a niveles de estrés oxidantes no letales (por cambios en la concentración atmosférica de oxígeno) tanto para inducir la diferenciación celular y obtener más conidios, como para mejorar la resistencia de los conidios obtenidos al niveles mayores de EROs y probablemente a otros tipos de estrés mediante protección cruzada; el objetivo del presente estudio por lo tanto fue evaluar la calidad de los conidios producidos al exponer a una cepa de *Metarhizium anisopliae* a atmósferas oxidantes durante diferentes etapas de su crecimiento, así como evaluar el efecto de dicha exposición sobre el proteoma de los conidios producidos.

La primera sección de este documento comprende una revisión bibliográfica, que incluye una breve descripción de los hongos entomopatógenos, la importancia de contar con parámetros que indiquen la calidad de los conidios y el proceso infectivo que se desarrolla cuando un conidio ataca a un insecto. A continuación se revisan las fuentes por las cuales se obtienen las ERO y los mecanismos antioxidantes desarrollados por los organismos aerobios, así como la respuesta a un estrés moderado; por último se revisan los estudios proteómicos que se han llevado a cabo con diversos hongos filamentosos y se incluye como se modificó el proteoma en respuesta al estado oxidante.

En la sección seis se presenta en detalle la estrategia experimental utilizada, y posteriormente la descripción de los materiales y métodos empleados. Los resultados del trabajo y la discusión de los mismos se presentan en la sección ocho, donde en una primera fase se analiza el efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción, calidad y el tiempo crítico de respuesta de *M. anisopliae*; a partir de éstos resultados se seleccionó la concentración de oxígeno que logró mejorar los parámetros de calidad de los conidios producidos y en la segunda fase se analizan cambios en el proteoma de los conidios sometidos a estrés oxidante con respecto al proteoma de conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales. Finalmente, en una tercera y última fase, se analiza y discute el efecto de la concentración de oxígeno sobre la actividad de cuatro de las principales enzimas antioxidantes involucradas en el control de las ERO.

En las secciones diez y once se presentan las conclusiones a las que se llegó con base en los resultados obtenidos y algunas perspectivas que se sugieren para continuar este estudio.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Hongos Entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos han recibido atención debido a su potencial para el control de plagas de insectos y por ser considerados como una alternativa a los insecticidas químicos. Estos agentes de control biológico pueden producirse y luego introducirlos en agrosistemas como parte de un programa de manejo integrado de plagas (MIP) (Faria y Wraight, 2007).

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno que está presente en los suelos de todo el mundo, fue el primer agente de control biológico en la década de 1880, este hongo se utiliza para controlar cuatro principales plagas de insectos (escarabajos, termitas, salivazo y langostas). (Zimmermann, 1993), también es una de las especies de hongos entomopatógenos con las que más se ha trabajado en todo el mundo, en relación con su producción masiva y comercialización como bioplaguicida (Faria y Wraight, 2007). Las formulaciones de este hongo pueden incluir conidios o micelio, una vez que se aplica y se induce una epizootia, los nuevos conidios y células vegetativas que se producen sobre los cadáveres de los insectos infectados, se extiende a la población sana de los insectos (Shahid et al., 2012).

A diferencia de las bacterias y virus que deben ser ingeridos para provocar la muerte del insecto, los conidios de hongos entomopatógenos infectan a los insectos por la penetración de la cutícula del insecto y por lo tanto pueden utilizarse para controlar plagas de insectos chupadores y masticadores, mosquitos y áfidos (St. Leger y Wang, 2010). El potencial que tienen los hongos entomopatógenos como agentes para combatir la propagación se destaca sobre todo en el control de la malaria mediante la disminución de las poblaciones de mosquitos y en la agricultura mediante la protección de cultivos de langostas (Inglis et al., 2001).

En México existen bioinsecticidas comerciales disponibles, basados en conidios de hongos entomopatógenos (unidad infectiva contra los insectos), lo que indica el éxito de esta tecnología. Estos bioinsecticidas están compuestos por conidios de un hongo entomopatógeno en solitario o dosificados en mezclas de varios de ellos o mezclados con bacterias. Son diversas las empresas o agrupaciones que se dedican a la producción y comercialización en México, entre ellas destacan Agrobionsa,

Bioworks INC, Koppert México, CESAVER (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato) y GreenCorp Biorganiks de México (Tamez-Guerra et al., 2001; Alatorre-Rosas, 2007)

1.1.1 Producción de hongos entomopatógenos

La producción masiva de unidades infectivas de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium* spp, *Nomuraea rileyi* e *Isaria farinosus*, se realiza utilizando fermentación en sustratos sólidos en la que se producen conidios aéreos, en la fermentación líquida que produce principalmente blastosporas y en un cultivo líquido con mayor especialización se realiza la producción de microesclerotias (Jackson y Jaronski, 2009).

La fermentación en sustratos sólidos es la técnica más eficiente y que además utiliza tecnología básica para producir conidios, los cuales con algunas excepciones, son la unidad infectiva más practica e infecciosa de un hongo entomopatógeno, debido a que el conidio aéreo se transmite en el ambiente, cuando después de infectar al insecto crece en la superficie del cadáver (sección 1.1.3, Figura 1 D) (Jaronski y Jackson, 2012).

Los requerimientos básicos para el crecimiento de conidios de hongos entomopatógenos son la adecuada nutrición (fuente de carbono fósforo y nitrógeno), temperatura, pH, humedad y el intercambio de CO₂ y O₂, los sustratos pueden ser en general cualquier producto agrícola poroso o inorgánico, tales como como cebada, papa, trigo, soya, avena, arroz e incluso suero de leche (Kassa et al., 2008; Sahayaraj y Namasivayam, 2008).

Típicamente un hongo entomopatógeno puede producir de 20-150 g de conidios/ kg de sustrato sólido, exhibiendo títulos de 1×10^{10} - 1×10^{11} conidios/g, lo cual depende del hongo (Jaronski y Jackson, 2012), pero hay que considerar que para la aplicación práctica de estos hongos, el nivel requerido está alrededor de 10^{12} conidios por hectárea o mayor, por lo tanto es necesario contar con un método apropiado de producción (Dorta et al., 1996).

Aplicando una tecnología básica para la producción de conidios, se inoculan bolsas que contienen sustrato sólido estéril, y se incuban durante un total de 7 a 14 días, una característica clave es que el contenedor debe proporcionar un buen intercambio de gases mientras que debe retrasar la pérdida de agua, pasado ese tiempo el sustrato sólido junto con los conidios debe secarse para mantener una buena vida útil, especialmente si los conidios se formularán con aceites o polvos humectables, la

humedad deseada es <7% (p/p) y el método más sencillo es el secado lento, semi-controlado, el cual consiste en transferir los cultivos esporulados a bolsas de papel Kraft; el último paso es cosechar los conidios, lo cual puede lograrse a través de tamizado o por medio de un ciclón que cuenta con un colector para polvo, donde se recuperarán los conidios (Jaronski y Jackson, 2012).

1.1.2 **Calidad de conidios de hongos entomopatógenos**

Un sistema de control de calidad eficaz, es una característica básica que deberían de tener todos los agentes de control biológico (Jenkins y Grzywacz, 2000). Hasta donde sabemos existen pocos parámetros cuantitativos que indiquen si la calidad de un lote de conidios es buena, de hecho las recomendaciones de los estándares y los límites de tolerancia deberían establecerse por fabricantes, investigadores e instituciones reguladoras para cubrir las necesidades de los productores en campo, sin embargo esta iniciativa aún no se ha puesto en marcha (Ravensberg, 2011), pero considerando que los conidios son una unidad infectiva ampliamente aplicada en campo (Jaronski y Jackson, 2012) estos se someten a factores ambientales que influyen su estabilidad, por lo tanto a nivel laboratorio se mide la resistencia a factores ambientales.

→ **Viabilidad**

La viabilidad de los conidios se ha reportado como un parámetro de control de calidad y uno de los pocos parámetros para los cuales se ha recomendado una cantidad mínima como medida de calidad, se ha establecido que la viabilidad debe ser mayor a 80-85 % (Jenkins y Grzywacz, 2000). Este parámetro de calidad es muy importante debido a que el ciclo infectivo de un hongo entomopatógeno inicia cuando un conidio se adhiere a la cutícula del insecto y germina, la velocidad de germinación y la capacidad adhesiva de los conidios se correlaciona positivamente con la infectividad (Altre et al., 1999)

→ **Hidrofobicidad**

Cuando los hongos entomopatógenos se utilizan como agentes de control biológico, los conidios por lo general se aplican en formulaciones humectables, donde estos son el ingrediente activo, los conidios aéreos son muy hidrofóbicos, la hidrofobicidad favorece la adherencia de los conidios a la cutícula de los insectos, el cual es el primer paso de la infección fúngica para matar plagas de insectos (Boucias et al., 1988).

La hidrofobicidad de los conidios se debe a capas de pequeñas varillas (rodlet) que constan de pequeñas proteínas de 6-14 KDa llamadas hidrofobinas, además de estar relacionadas con la hidrofobicidad, estas proteínas se relacionan con la morfogénesis, la adhesión, la antigenicidad y la defensa contra la reacción inmune de insecto (Bidochka et al., 1995).

La hidrofobicidad de los conidios puede evaluarse por diferentes métodos aunque a menudo se evalúa por un método de partición que determina la proporción de células distribuidas en un disolvente acuoso y uno orgánico (Shah et al., 2007). Se probó la hidrofobicidad de conidios aéreos provenientes de cuarenta y ocho diferentes cepas de hongos entomopatógenos, los valores que exhibieron las cepas de *B. bassiana* fue 69.5 - 87.2 % (promedio 78.6 %), *Metarhizium* spp. , 77.1 - 92. 2% (promedio 83.3 %) e *Isaria fumosorosea* 59.7–79.2% (promedio 72.5%) (Shan et al., 2010), estos valores corresponden con Shah et al., (2007) para la cepa *Metarhizium anisopliae* V245 que exhibe valores de 86.2 - 93.9 % dependiendo del número de subcultivo en un medio artificial.

→ Resistencia a la Temperatura

Para la aplicación práctica de conidios de hongos entomopatógenos, un factor importante es la temperatura, ya que no sólo tienen que soportar la temperatura del suelo, también la temperatura del insecto como respuesta de defensa ante el ataque del hongo (Inglis et al., 1996) El calor húmedo provoca la desnaturalización de proteínas y la desorganización de la membrana, se ha reportado que *M. anisopliae* tiene un límite superior de 37-40° C en el cual presenta crecimiento (Thomas y Jenkins, 1997). Por lo tanto, la preservación de la eficacia de los hongos entomopatógenos contra plagas de insectos requiere conocimiento para incrementar la tolerancia de los conidios a la temperatura.

De hecho se han clasificado a las cepas de *Metarhizium anisopliae* después de someterlas a calor húmedo (45 °C), como poco termotolerantes (Tipo I) a aquellos cepas que tenían un tiempo de sobrevivencia 50 (TS₅₀) de 19.9 min, medianamente termotolerantes (Tipo II) a aquellas con un TS₅₀ de 53 min y altamente termotolerantes (Tipo III) cuando su TS₅₀ fue de 167.6 min, este método podría usarse para buscar candidatos para mejorar sistemas de control de plagas (Li y Feng, 2009).

→ Infectividad

La patogenicidad se define como la habilidad para causar una enfermedad, la cual es una medida cualitativa, mientras que la infectividad es el grado de patogenicidad, por lo tanto es una medida

cuantitativa (Vega et al., 2012), la cual puede medirse como la dosis (DL_{50}), la concentración (CL_{50}) o el tiempo (TL_{50}) requerido para matar al 50% de la población de insectos en el bioensayo (Marcus y Eaves, 2000).

Los bioensayos efectuados en laboratorio para medir infectividad usualmente se llevan a cabo bajo condiciones óptimas para el crecimiento de los hongos (por ejemplo, alta humedad, temperatura constante y fotoperiodo) las cuales, evidentemente son muy diferentes a las condiciones ambientales las cuales se pueden encontrar en campo (Butt y Goettel, 2000).

El proceso de infección de los hongos entomopatógenos es un proceso complejo en el cual están implicados factores como la degradación de la cutícula del insecto, la producción de enzimas, factores de unión del conidio a la cutícula y producción de metabolitos, la pérdida de alguno de estos factores podría atenuar la infectividad, por lo tanto es difícil establecer estándares de control de calidad y rangos de tolerancia para la infectividad, aun así se recomienda que los conidios de un lote alcancen un 80-90% de mortalidad por el método de bioensayo, aunque los autores no especifican las condiciones bajo las cuales se debe proceder, cabe señalar que los bioensayos siguen siendo una herramienta pragmática para comprobar la calidad, por lo tanto debe llevarse a cabo a pesar de que ocupan tiempo y recursos considerables (Ravensberg, 2011).

1.1.3 Ciclo infectivo de los Hongos Entomopatógenos

El ciclo infectivo de un hongo entomopatógeno inicia cuando un conidio se adhiere a la cutícula del insecto por medio de hidrofobinas, las cuales son una clase de proteínas que forman parte de la superficie de los conidios de hongos (Boucias et al., 1988). Algunas enzimas están implicadas en la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto. Las actividades de la ecto-fosfatasa y de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de los conidios también afectan a la capacidad de adherencia de estos (Cosentino-Gomes et al., 2013). Por otro lado, la adhesina MAD1, es una proteína generada después de la germinación de esporas, esta adhesina media la cohesión fuerte y específicamente entre *Metarhizium* spp. y los insectos (Wang y St Leger, 2007). En hongos entomopatógenos, se reportó que la velocidad de germinación y la capacidad adhesiva de los conidios se correlaciona positivamente con la infectividad (Altre et al., 1999), incluso con los conidios de *M. anisopliae* obtenidos de medios de cultivo con una relación carbono/nitrógeno diferente, se observó una correlación positiva entre las velocidades de germinación y la infectividad contra *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor*

(Shah et al., 2005); también para el hongo *Paecilomyces fumosorosea* se encontró que el nivel de infectividad se correlaciona con la velocidad de germinación de los conidios sobre la superficie externa de lepidópteros (Altre y Vandenberg, 2001).

Después de la adhesión, el conidio germina y forma un apresorio (Figura 1 A), la cual es una estructura especializadas para la penetración, aunque la infección también se puede lograr por la penetración directa de la punta de la hifa extendida. El apresorio produce sustancias adhesivas, lo que le permite adherirse firmemente al cuerpo del insecto, este secreta enzimas hidrolíticas y lipolíticas, tales como proteasas, lipasas, quitinasas, y esterases, para descomponer la estructura epidérmica, con la ayuda de la presión de turgencia generada dentro de la apresorio (St Leger et al., 1987). La infección implica diferentes eventos, entre ellos la ya mencionada producción de apresorios, además de la penetración de la cutícula y los tejidos circundantes por el alargamiento de las hifas para alcanzar la hemolinfa del insecto, y la producción de organismos unicelulares, conocidas como blastosporas (Figura 1 C) dentro de la hemolinfa que son capaces de evadir las células inmunes del huésped (Bidochka et al., 2010).

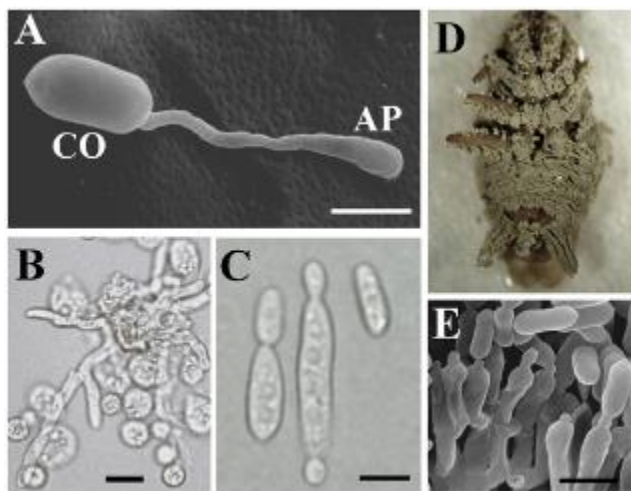


Figura 1. Etapas de infección de *Metarhizium* (A) Conidio germinado produciendo un apresorio, (B) Micelio siendo atacado por hemocitos en la hemolinfa, (C) Diferenciación a blastosporas, (D) Cadáver con hifas emergentes que producen conidios (E). CO, conidios, AP, apresorio, barra 5 μm Tomado de Gao et al., (2011).

La epicutícula del insecto es una capa cerosa y es la primera barrera contra las amenazas ambientales como insecticidas químicos y biológicos. La epicutícula es una capa delgada (Figura 2) sobre la cutícula del insecto y se compone de una mezcla compleja de lípidos que incluyen cantidades abundantes de cadenas lineales y ramificadas de hidrocarburos saturados e insaturados, los hidrocarburos epicuticulares más comunes son n-alcanos y n-alquenos. Algunos de los determinantes

bioquímicos para el establecimiento de la infección de *B. bassiana* hacia sus insectos blanco, además de las ya mencionadas hidrolasas, proteasas, lipasas, y fosfatasa, incluyen la producción de metabolitos tóxicos, tales como beauvericinas, oosporeina y ácido oxálico. Sin embargo, se sabe poco respecto a la degradación y/o la penetración de esta barrera inicial la cual debe superarse para la infección exitosa por parte del hongo, en particular se desconocen los mecanismos acerca de la degradación de los hidrocarburos que constituyen la epicutícula del insecto (Pedrini et al., 2013).

Se demostró que *B. bassiana* y *M. anisopliae* pueden utilizar varios hidrocarburos presentes en la epicutícula de un insecto chupador de sangre (*Triatoma infestans*) los cuales incluyen alcanos ramificados; la degradación completa de los hidrocarburos, se evidenció con la liberación de CO₂ (Napolitano y Juárez, 1997), en consecuencia *B. bassiana* fue capaz de degradar alcanos a ácidos grasos libres, fosfolípidos y acilgliceroles cuando fue cultivado en el hidrocarburo n-octacosano (n-C28) (Crespo et al., 2008).

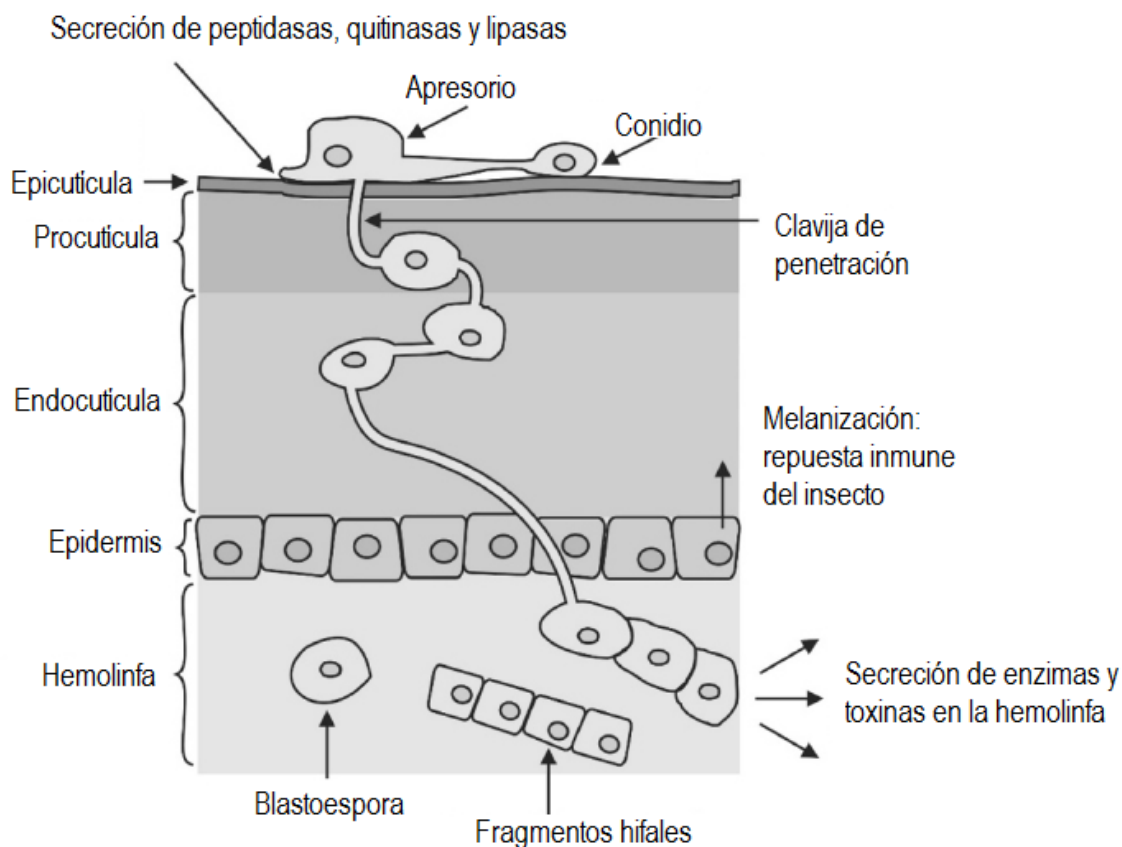


Figura 2. Proceso infeccioso de los Hongos Entomopatógenos tomado de Samuels et al., (2016).

Hasta ahora sólo se describió la entrada del hongo al insecto, pero este paso es sólo el inicio del proceso de infección. Después de la penetración, el apresorio del hongo entomopatógeno se encuentran con el sistema inmunológico del insecto. En general, los hongos patógenos que invaden a un hospedero, están sujetos a ataques por parte de un gran número de células inmunes, como monocitos y macrófagos en los seres humanos, y hemocitos en los insectos. Sólo los hongos patógenos que evaden o resisten ataques del sistema inmune tienen la oportunidad de colonizar el cuerpo del hospedero y causar enfermedades (Kavanagh y Reeves, 2004).

La respuesta inmune innata de los insectos se asemeja a la de los mamíferos (Bergin et al., 2005). Los hemocitos, plasmátocitos y granulocitos en los insectos, tienen características similares a los macrófagos en los vertebrados. Al entrar en contacto con los antígenos no propios tales como bacterias u hongos, los hemocitos engullen objetos extraños y desencadenan el metabolismo oxidante, que transforma el oxígeno en intermedios de oxígeno reactivos antimicrobianos. Las respuestas inmunes que se observan comúnmente en los sistemas de los animales son la nodulación, la fagocitosis y la encapsulación (Tseng et al., 2014).

El agente externo al insecto es envuelto y se coloca en una vacuola fagocítica, una vez ahí, la NADPH oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular en peróxido y superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ reacciona posteriormente con el óxido nítrico (NO) para producir peroxinitrito ($ONOO^-$). La mieloperoxidasa (MPO) también entra en la vacuola fagocítica y utiliza el Cl presente en la vacuola para generar ácido hipocloroso (HOCl). La infectividad de un hongo patógeno por lo tanto se asocia con la capacidad de afectar directa o indirectamente la producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en la célula huésped (Kavanagh y Reeves, 2004).

La melanina contribuye a la tolerancia al estrés y a la infección tanto en hongo patógenos de humanos, como *Cryptococcus* y hongos fitopatógenos como *Colletotrichum* sp, *Alternaria* sp, y *Magnaporthe* sp. En hongos fitopatógenos se forma una capa de melanina en el apresorio, entre la pared interna de la célula y la membrana plasmática, que sólo permite el paso de agua y moléculas pequeñas. El triacilglicerol y glucógeno acumulado en el apresorio permiten entrar al agua extracelular, formando una enorme presión de turgencia que sirve como la fuerza mecánica necesaria para la invasión (Thines et al., 2000). En el caso de hongos entomopatógenos, se reportó que en la cepa transformante *M. anisopliae* MA05-169, la melanina es un factor de infección clave, la melanina elimina los radicales libres tales como $O_2^{\bullet-}$ que se generan por el sistema inmune del huésped, *M. anisopliae* MA05-169

mostró una correlación positiva entre la producción de melanina y el aumento de la infectividad hacia *Plutella xylostella* (Tseng et al., 2014).

Una vez que los hongos evadieron o resistieron los ataques del sistema inmune del insecto, al agotarse los nutrientes dentro de este, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de conidios, con lo que se puede completar el ciclo infeccioso (Pucheta et al., 2006). Al final, la muerte del insecto se debe a una combinación de factores como: la acción de toxinas del hongo, obstrucción física de la circulación de la hemolinfa, la privación de nutrientes y la invasión de órganos (Goettel e Inglis, 1997).

1.2 Fuentes de especies reactivas

Todos los sistemas biológicos que funcionan en condiciones aeróbicas están expuestos a oxidantes, ya sea generados intencionalmente o como bioproductos. Bajo condiciones fisiológicas normales, alrededor del 1-2% del oxígeno consumido por la mitocondria se convierte en radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Richter et al., 1995).

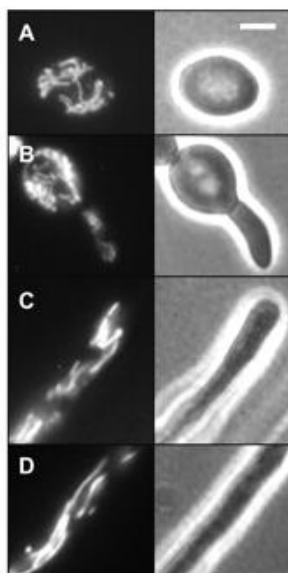


Figura 3. Mitocondrias de *Neurospora crassa* marcadas con fluorescencia mediante la expresión de proteína verde fluorescente (izquierda) y microscopía de contraste de fases (derecha) durante diferentes periodos de tiempo. (A) Conidiosporas antes de la germinación, (B) Conidiosporas recién germinadas, (C) Punta de hifa después de 4 horas de incubación, (D) hifa después de incubación durante toda la noche. Barra 5 μ m. Tomado de Fuchs et al., (2002).

El radical anión superóxido, es una especie reactiva de oxígeno (ERO) que se genera principalmente por la fuga de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, como consecuencia de la respiración aeróbica (Boveris y Cadenas, 2001), en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* las mitocondrias se observan como pequeños orgánulos tipo hilo (Figura 3) que se distribuyen uniformemente a través de la célula y orientadas a lo largo de la hifa (Fuchs et al., 2002).

El $O_2^{\bullet-}$ *in vivo* se produce por vías enzimáticas y no enzimáticas. Las vías enzimáticas incluyen a las NADPH oxidasas, varias isoformas de estas enzimas se han identificado tanto en animales, plantas y hongos (Lalucque et al., 2003), están situadas en la membrana celular y utilizan NADPH citoplasmático para producir $O_2^{\bullet-}$ (Malagnac et al., 2004); también se incluye a la citocromo P450 oxigenasa (Coon et al., 1992) y a la xantina oxidasa la cual cataliza la formación tanto de $O_2^{\bullet-}$ como de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Papapostolou y Georgiou, 2010), y por lo tanto constituye una fuente de radical hidroxilo (OH^{\bullet}), como se explicará más adelante.

Por las vías no enzimáticas, el $O_2^{\bullet-}$ se produce cuando un electrón es transferido directamente al oxígeno molecular por coenzimas reducidas o grupos prostéticos (por ejemplo, flavinas o clusters de hierro de azufre) o por xenobióticos (e.g. paraquat) previamente reducidos por ciertas enzimas (Turrens, 2003).

Otra ERO es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se produce durante la desintoxicación de anión superóxido catalizada por las superóxido dismutasas (SOD) (Fridovich, 1995). El H_2O_2 puede cruzar fácilmente las membranas biológicas. Aunque es relativamente poco reactivo, tiene efectos nocivos debido a su conversión a radical hidroxilo (OH^{\bullet}) el cual es extremadamente reactivo (Perrone et al., 2008). El radical hidroxilo se forma a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Michiels et al., 1994) que involucran la acción del anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Figura 4), reacción catalizada por iones metálicos de transición, tales como Fe^{2+} . El catión ferroso (Fe^{2+}) reacciona con el peróxido de hidrógeno, el cual se fragmenta para generar un radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y un ion hidroxilo (OH^-) con la formación de catión férrico (Fe^{3+}). El ciclo inicia y termina con la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por acción del anión superóxido (Valko et al., 2005).

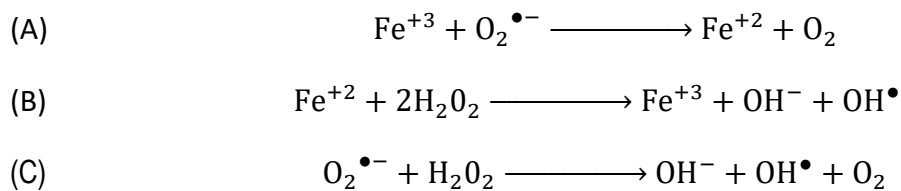


Figura 4. Formación del radical hidroxilo teniendo como primer paso (A) la reducción del catión férrico a ferroso, como segundo paso la (B) reacción de Fenton y finalmente la reacción neta, conocida como la reacción de (C) Haber-Weiss. Tomado de Valko et al., (2005).

Las ERO puede dañar una amplia gama de moléculas, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, sobre todo, los radicales hidroxilo reacciona indiscriminadamente con la mayoría de los metabolitos y macromoléculas, y en el proceso, pueden participar en la generación de otros radicales (Halliwell, 1995). Uno de los principales objetivos del radical hidroxilo y del anión superóxido son los lípidos insaturados, que conducen a la lipoperoxidación autocatalítica, durante la peroxidación de lípidos se forman radicales de lípidos e hidroperóxidos lipídicos tóxicos (Evans et al., 1998)

La formación de ERO debería disminuir con la hipoxia, ya que la concentración de oxígeno es proporcional a la formación de ERO (Turrens, 2003). Sin embargo, se ha reportado que existe un aumento paradójico de estrés oxidante en condiciones de hipoxia moderada (Schumacker, 2002). Se reportó que cuando una línea celular de hepatoma (Hep3B) se incuban con diclorofluoresceína (una sonda fluorescente para ERO), en condiciones de hipoxia se aumenta la fluorescencia en las células con mitocondrias en funcionamiento, mientras, mutantes sin una cadena respiratoria funcional no muestran un aumento de fluorescencia (Chandel et al., 1998).

Además en condiciones de hipoxia, en las células se puede producir óxido nítrico (Figura 5), el óxido nítrico (NO) puede reaccionar con el anión superóxido, proveniente de la cadena respiratoria mitocondrial para generar una gama de especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito (ONOO⁻), el cual puede oxidar de tioles y dañar algunas proteínas, en *Saccharomyces cerevisiae* se demostró que se produce óxido nítrico en las mitocondrias en condiciones de hipoxia (Castello et al., 2006).

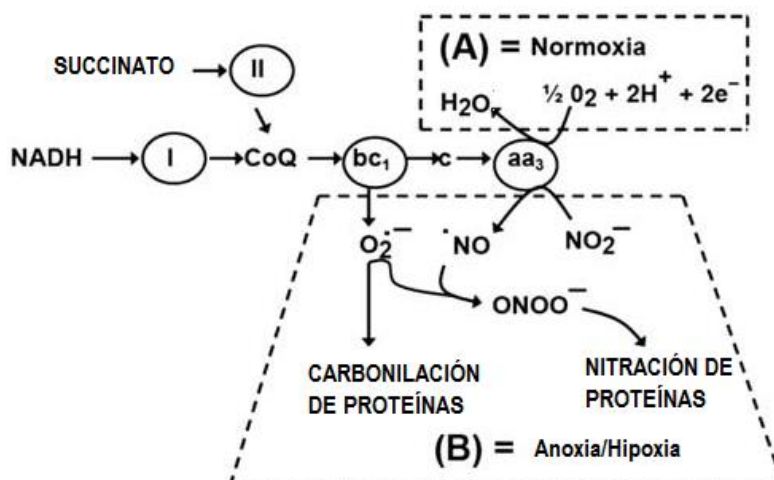


Figura 5. Modelo del papel de la cadena respiratoria en condiciones de hipoxia, tomado de Castello et al., (2006).

1.3 Defensa antioxidante

Los efectos perjudiciales que podrían causar las ERO formadas en la mitocondria son en gran medida, impedidos por varios sistemas antioxidantes (Figura 6). El superóxido se convierte enzimáticamente a H₂O₂ y O₂ por una familia de metaloenzimas llamadas superóxido dismutasas (SOD), la dismutación de O₂^{•-} a H₂O₂ y O₂ también puede ocurrir espontáneamente, el papel de la SOD es aumentar la velocidad de la reacción (Fridovich, 1995).

La matriz mitocondrial contiene una forma específica de SOD, con manganeso en el sitio activo (Fridovich, 1995), que elimina la O₂^{•-} formado en la matriz o en el lado interno de la membrana interna. La expresión de MnSOD se induce adicionalmente por agentes que causan estrés oxidante, incluyendo la radiación y la hiperoxia, en un proceso mediado por la activación oxidativa del factor de transcripción nuclear NFκB (Warner et al., 1996).

El peróxido de hidrógeno es el producto de la dismutación O₂^{•-} y el principal precursor de OH• en presencia de metales de transición reducidos como se expuso en la sección anterior. Varias enzimas eliminan H₂O₂: peroxirredoxinas, peroxidases, catalasa-peroxidases y catalasas. La K_M para H₂O₂ de estas enzimas varían cuatro órdenes de magnitud, lo que indica que las células tienen sistemas para la eliminación de H₂O₂ a diferentes concentraciones (Díaz et al., 2005). Las peroxirredoxinas son activas a concentraciones <10 μM, mientras que las catalasas son activas concentraciones mucho más altas de H₂O₂ (Hansberg et al., 2012).

El glutatión (GSH) es uno de los principales antioxidantes no enzimáticos, es un tiol de bajo peso molecular presente en concentraciones de hasta 10 mM en levaduras y hongos filamentosos (Grant et al., 1996). El GSH se sintetiza a través de dos pasos dependientes de ATP por la γ -glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS), enzima que junto con la glutatión sintetasa (GS) lo sintetizan partir de L-glutamato, L-cisteína y L-glicina (Cardenas-Rodríguez et al., 2008).

El GSH es importante en la desintoxicación de hidroperóxidos de lípidos, además desempeña un papel clave en la respuesta al estrés en los hongos (Pócsi et al., 2004). El GSH es sustrato para enzimas como la glutatión peroxidasa, la cual es una enzima importante para la respuesta a los hidroperóxidos de lípidos (Evans et al., 1998). La glutatión peroxidasa convierte el glutatión a su forma de disulfuro oxidado (GSSG) (Figura 6). Sin embargo, el glutatión se encuentra presente predominantemente en su forma reducida (GSH) tanto en *S. cerevisiae* como en otros eucariotas debido a la acción de la glutatión reductasa, la cual es una oxidoreductasa dependiente de NADPH, que convierte GSSG a GSH utilizando la reducción de la energía generada por la vía de las pentosas fosfato (Morano et al., 2012).

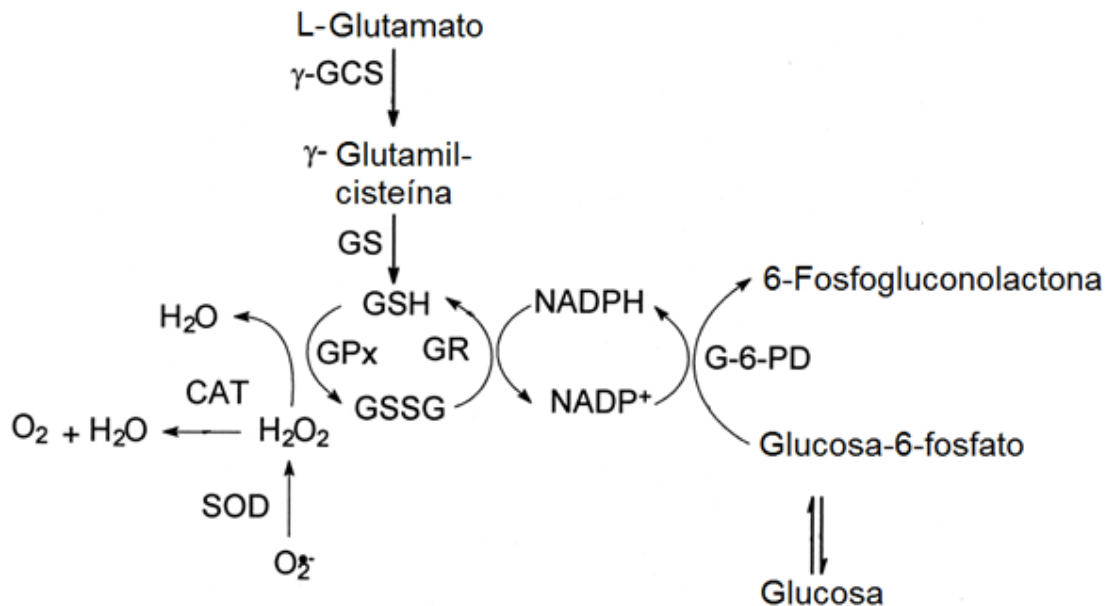


Figura 6. Sistema detoxificante, tomado de Schafer y Buettner, (2001). γ -Glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS), Glutatión sintetasa (GS), Glutatión peroxidasa (GPx), Glutatión reductasa (GR), Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD).

La vía de las pentosas fosfato es la fuente de poder reductor celular en forma de NADPH. El NADPH es particularmente importante durante la exposición a oxidantes, ya que proporciona el potencial de reducción para más antioxidantes y enzimas reguladoras redox incluyendo los sistemas de tiorredoxina y glutatión. La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH) catalizan las dos primeras etapas de la ruta de las pentosas fosfato y son la fuente de NADPH. La G-6-PD cataliza el paso clave para la producción NADPH y se sabe que juega un papel en la protección contra el estrés oxidante (Slekar et al., 1996). Finalmente, la vía de la pentosa fosfato está conectado directamente a la glucólisis a través de la oxidación de la glucosa 6-fosfato. Por lo tanto, cualquier condición de crecimiento que influya potencialmente en la actividad glucolítica, puede alterar el flujo de los equivalentes de glucosa a través de la vía de la pentosa fosfato de que conduce a la generación de NADPH (Ralsler et al., 2006).

1.4 Estrés oxidante, diferenciación celular y respuesta de hongos filamentosos al oxígeno

El concepto de estrés oxidante se definió por Helmut Sies como una situación de desequilibrio con una aumento de oxidantes o con una disminución de antioxidantes (Boveris et al., 2008). El delicado equilibrio entre las defensas antioxidantes y la producción de ROS puede ser interrumpido ya sea por defensas antioxidantes deficientes, o por la inhibición del flujo de electrones o la exposición a xenobióticos. Este desequilibrio aparece como un común denominador en diversos procesos en los que el daño oxidante resultante provoca daños en las células y eventualmente, la muerte celular (Turrens, 2003).

Los organismos aerobios han desarrollado numerosos factores antioxidantes para hacer frente a la producción de ERO, estos factores incluyen enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), que los desintoxican de estas moléculas peligrosas. Las células también tienen numerosos sistemas de defensa para mantener el estado redox celular y sistemas para la reparación de proteínas, ADN y lípidos dañados por ERO, estos sistemas incluyen el glutatión y la tiorredoxina dependientes de equivalentes reductores NADPH para su función (Outten et al., 2005) como se mencionó en la sección anterior.

Las células de *S. cerevisiae* a las que se les suprimió el gen *SOD1* son hipersensibles a agentes generadores de superóxido, como el paraquat y muestran una serie de fenotipos relacionados con el

estrés oxidante, como daños en la vacuola (Culotta, 2001). Aunque por otro lado, se ha demostrado que la estimulación por oxidantes suaves puede inducir a las células normales a dividirse, estos estímulos oxidantes parecen ser reguladores normales de la transcripción celular, sin embargo, cuando se excede la capacidad para desintoxicar los oxidantes producidos, provoca una serie de eventos que pueden inducir la muerte celular (Schafer y Buettner, 2001).

Como se mencionó en la sección 1.2, los organismos aerobios producen especies reactivas de oxígeno (ERO) debido al metabolismo celular, generadas principalmente en la cadena respiratoria o por acción de las NADPH oxidasas. Las especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo producen daño en ADN, lípidos y proteínas, a pesar de estos efectos, se ha encontrado evidencia en la que se relacionan las ERO con la diferenciación celular en *Neurospora crassa* (Aguirre et al., 2005; Belozerskaya y Gessler, 2006). Por otra parte, se ha reconocido que la exposición de la hifa al aire es un estímulo, en el inicio de la conidiogénesis en hongos filamentosos (Roncal y Ugalde, 2003). Una hifa expuesta directamente al aire, desarrolla un estado hiperoxidante, caracterizado por el incremento en la generación de ERO, en cantidades que sobrepasan la competencia celular para neutralizarlas. El estado hiperoxidante ocurre al inicio de los tres pasos morfogénéticos, durante la conidiación de *Neurospora crassa*. Se propone que la diferenciación celular surge cuando la célula utiliza mecanismos tendientes a evitar el desbalance oxidante que induce a la célula a aislarse de oxígeno molecular (Toledo et al., 1994).

Una célula que se encuentra en un estado hiperoxidante tiene tres posibles salidas, representadas en la Figura 7: (1) la célula compensa con una fuente de poder reductor (nutrientes) y vuelve al estado estable anterior, adaptándose de este modo a una condición más oxidante; (2) la célula se diferencia, aislándose del oxígeno del medio ambiente; y (3) cuando la adaptación o la diferenciación de células no pueden tener lugar, el medio interno reducido se equilibra con el medio externo oxidante y la célula muere, la muerte celular permite a otras células adaptarse o diferencian (Hansberg y Aguirre, 1990; Aguirre et al., 2005)

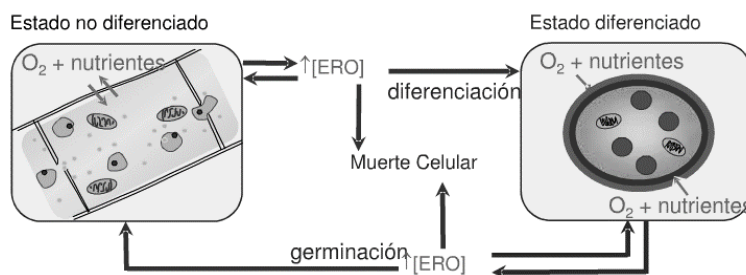


Figura 7. Modelo de la regulación de la diferenciación celular causada por especies reactivas de oxígeno, tomado de Aguirre et al., (2005).

El efecto del oxígeno sobre el crecimiento de hongos se ha probado con un porcentaje de oxígeno desde 0% hasta 100%; y se encontró que nueve de las diez especies estudiadas tuvieron un mayor crecimiento radial, conforme aumentaron el porcentaje de oxígeno en la atmósfera, llegando al máximo crecimiento a 30% de oxígeno y no se encontró mayor crecimiento radial cuando aumentaron el porcentaje de oxígeno desde 40 % a 100% (Yang y Lucas, 1970).

En un sistema en que se inyectó 100% de oxígeno se estudió el daño por hiperoxia a células de *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que la resistencia a la hiperoxia requiere de una serie de factores que respondan al estrés incluyendo aquellos de defensa antioxidante, choque térmico, la reparación del daño al ADN y la homeostasis de metales. Específicamente una serie de factores antioxidantes resultaron ser importantes para la resistencia a la hiperoxia, estos son la enzimas superóxido dismutasa (SOD 1 y SOD 2) y la glutatión reductasa (GLR1) (Outten et al., 2005).

1.5 Respuesta de hongos a factores ambientales y durante el cultivo

La formación de esporas es un proceso que consume energía, y requiere de una estricta regulación para utilizar eficientemente los recursos para reproducir y garantizar la supervivencia de la especie. Ya que las esporas están destinadas para su distribución a través del aire, el hongo debe "garantizar" que las esporas se entregan realmente en el aire o se producen sólo cuando las estructuras de esporulación son expuestas al aire. Por esta razón, la generación de esporas está regulada por un número de factores endógenos y factores ambientales. Algunos factores principales para la inducción de formación de esporas es el estado nutricional del micelio, la humedad, la luz, el pH, las lesiones en micelio y la aireación (Fischer y Kües, 2006).

En *Aspergillus nidulans*, todos los factores externos (agotamiento de los nutrientes, la luz, aireación) que influyen en acciones de desarrollo no tienen efecto si el hongo no es "competente" para el

desarrollo. Esto significa que las esporas germinadas necesitan para crecer vegetativamente al menos 18 h antes de que adquieran esta competencia de desarrollo (Fischer y Kües, 2006).

Uno de estos factores que se probaron sobre *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces*) fue la respuesta a la luz azul, esta respuesta se lleva a cabo en horas específicas del crecimiento de hongo ya que sólo cuando el pulso de luz azul que se aplicó a las 72, 84 y 96 h del crecimiento del hongo se obtuvo mayor producción de conidios, después o antes de esas horas, no se encontró efecto del pulso de luz. Los autores mencionan que la conidiación del hongo requiere de un periodo de “competencia” para que pueda observarse la inducción de conidiación por la luz azul (Sanchez-Murillo et al., 2004).

El efecto de la luz azul también se probó sobre la producción de conidios de *Beauveria bassiana*, se dejó crecer al hongo en total oscuridad, y después se aplicó un pulso de cinco minutos de luz azul, los resultados mostraron que el tiempo del crecimiento en que *B. bassiana* responde a la luz azul se encuentra entre las 96 y las 144 h, obteniendo la máxima producción a las 120 h, pero si se prolongaba el tiempo de tratamiento a más de 144 h, el rendimiento de conidios fue de 5 a 6 veces menor que lo que se obtenía a las 120 h (Zhang et al., 2009) Como se ha observado, cada hongo tiene su propia ventana de aplicación para que al exponer al micelio a un factor externo se obtenga una respuesta en la conidiación del hongo.

1.6 Pre-exposición a estrés moderado

En estudios previos se ha indicado que la exposición de microorganismos a estrés moderado mejora su tolerancia a un estrés posterior, que podrían ser letal para organismos que no han sido previamente expuestos o aclimatados a estas condiciones (Wang et al., 2010). Por ejemplo el estrés oxidante subletal puede mejorar la capacidad de levaduras para soportar condiciones ambientales desfavorables tales como la radiación UV (Verma y Singh, 2001), mientras que la adaptación al frío mejora la tolerancia de *Cryptococcus flavescens* a la desecación, ya que de este modo se regula la fluidez de su membrana (Dunlap et al., 2007). En el estudio realizado por Liu et al., (2012) al someter a *Candida oleophila* a estrés oxidante subletal (5mM de H₂O₂ por 30 min) se encontró que este pretratamiento confiere a la levadura la capacidad de tolerar un estrés oxidante fuerte, posterior al tratamiento, así como a otros tipos de estrés tales como alta temperatura y pH bajo. De hecho, las levaduras que fueron pretratadas mostraron siempre un mayor porcentaje de sobrevivencia cuando se sometieron a temperaturas elevadas, comparadas con las que no pasaron por el pretratamiento

(estrés oxidante), mientras que a pH bajo (4) las levaduras que fueron pretratadas presentaron mayor población de células a las 24 h, comparadas con las que no fueron pretratadas.

En hongos entomopatógenos se ha reportado con *M. anisopliae* que cuando se expone a una temperatura moderadamente elevada (40 min a 45 °C) o cuando el hongo creció bajo estrés osmótico (NaCl 0,8 M), se mejoró el porcentaje de germinación en comparación con los controles no estresados (Rangel et al., 2008). En condiciones similares a las mencionadas se encontró que los conidios de *M. anisopliae* acumulan altos niveles de eritritol cuando el micelio fue sometido a calor a las 60 h de su crecimiento (Rangel et al., 2006). La acumulación de eritritol y otros polioles se ha relacionado como una respuesta al estrés en hongos entomopatógenos como *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Isaria fumosorosea* (Hallsworth y Magan, 1995).

Los cultivos bacterianos expuestos a un tipo específico de estrés, pueden desarrollar resistencia cruzada frente a otros tipos de estrés, este proceso se ha denominado como adaptación al medio ambiente, protección de la fase estacionaria, o protección cruzada. Por ejemplo, las células sometidas a estrés nutritivo, causado por el agotamiento de glucosa en cultivo en fase estacionaria, son más tolerantes al peróxido de hidrógeno, el calor, etanol, alta osmolaridad y pH ácido (Rangel, 2011).

1.7 Proteómica de conidios de hongos filamentosos

El proteoma se define como la dotación completa de proteínas expresadas por un individuo, tejido, cultivo celular, etc., en un momento dado (Wilkins et al., 1996). Por lo tanto, el proteoma es un sistema dinámico, que varía en un mismo organismo en función de los factores del entorno, tales como: estrés, drogas, efectores, o en función de su propio estado metabólico o fisiológico. El proteoma de un organismo determinado en un momento específico es el responsable de la expresión de su fenotipo característico en dicho momento. Las diferencias entre en el proteoma de un organismo se deben a los cambios sufridos en la expresión y funcionalidad de sus proteínas (Graves y Haystead, 2002).

Existe gran cantidad de información biológica que no se puede obtener exclusivamente del estudio de los genes, ya que son las proteínas, y no los genes, los responsables del fenotipo (Graves y Haystead, 2002). Sería muy difícil elucidar los mecanismos de envejecimiento o los efectos del medio ambiente, entre otros sucesos biológicos, estudiando exclusivamente el genoma. Además, es necesaria la anotación funcional del genoma debido a la dificultad de predecir genes con exactitud a partir exclusivamente de datos genómicos, ya que existen errores en la predicción de intrones y exones de

muchos genes. Para evitar estos problemas es necesario que la información genómica sea integrada a los datos provenientes del estudio de las proteínas (Fernández-Acero et al., 2010).

El análisis proteómico comprende tres pasos principales, el paso inicial es la separación de las muestras en geles de poliacrilamida, para separar las proteínas de la muestra en dos dimensiones. Para la primera dimensión, se separan las proteínas por punto isoeléctrico para lo cual se emplean gradientes de pH inmovilizados en tiras de poliacrilamida, seguido de un SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico) para la separación de proteínas de acuerdo con su peso molecular, esto constituye la segunda dimensión. Para la posterior detección de proteínas es posible aplicar métodos como la tinción de las proteínas con azul de Coomassie, tinción de plata o con marcadores fluorescentes (Kniemeyer et al., 2009). El segundo paso es la digitalización de geles y el análisis de los patrones electroforéticos, la tercera etapa es la identificación y caracterización de proteínas por espectrometría de masas, esta técnica se basa en la formación de iones de un analito en fase gaseosa (en este caso péptidos) que será separado y detectado según su relación masa/carga (m/z), lo que dará lugar a un espectro de masas en el que se representa la abundancia relativa de cada uno de los iones en función de su m/z . Previo a la espectrometría de masas se procede con la digestión de proteínas, generalmente con tripsina, lo que dará como producto un conjunto de péptidos de tamaños determinados por su secuencia de aminoácidos. Los espectros generados por las masas de los péptidos se comparan con las masas teóricas en bases de datos, cuantos más péptidos experimentales coincidan con los teóricos, existirá mayor probabilidad de que la identificación de la proteína sea correcta (Lee et al., 2001).

El estudio del proteoma de hongos filamentosos ha servido para identificar las proteínas relacionadas con la respuesta a antifúngicos, la adaptación a un estrés osmótico y la represión catabólica por carbono (Barros et al., 2010). Específicamente en hongos entomopatógenos la proteómica contribuyó a una mejor comprensión de la interacción que tiene una cepa de *M. anisopliae* con el artrópodo *Callosobruchus maculatus*, al identificar las proteínas sintetizadas y secretadas en presencia de su exoesqueleto (Murad et al., 2008).

Se sabe que los conidios de la mayoría de los hongos son estructuras latentes con baja actividad metabólica, en contraste con el micelio vegetativo, que tiene una alta actividad metabólica (Braga et al., 1999). En una aproximación del proteoma de *Metarhizium acridum*, se determinó que sólo el 35% de las proteínas es común a dos etapas de desarrollo (conidios y micelio), cuando se compararon

perfiles de expresión de proteínas, cabe señalar que en ese estudio el sistema de producción no fue el mismo ya que los conidios aéreos fueron obtenidos en cultivo superficial sobre agar papa dextrosa y el micelio en medio líquido en caldo papa dextrosa; aun así el estudio pone de manifiesto la diferencia entre ambas etapas del crecimiento del hongo. Bajo el sistema descrito se encontró que, entre las proteínas que se expresan en los conidios se hallan factores protectores de estrés como: proteínas de choque térmico (HSP), actina, 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Barros et al., 2010).

En un sistema 2-DE (electroforesis bidimensionales) se han identificado las principales diferencias del proteoma de *Aspergillus nidulans* en condiciones de anoxia (0% O₂) y normoxia (21% O₂, aeración normal). Se observaron importantes diferencias entre ambas condiciones relacionadas con las enzimas para la producción de energía, además bajo la condición de anoxia se encontró mayor abundancia de proteínas implicadas en la recuperación de nucleótidos, por lo tanto se concluyó que la activación de la recuperación de nucleótidos es un mecanismo de respuesta del hongo a la privación de oxígeno (Shimizu et al., 2009).

Los conidios son unidades de dispersión y la caracterización del proteoma de conidios de *Aspergillus fumigatus* por análisis 2-D, reveló que muchas enzimas esenciales de rutas metabólicas primarias se conservan en los conidios inactivos (latentes), de este modo, estas proteínas no tienen que ser sintetizadas *de novo* en la salida de la latencia, es decir en el inicio de la germinación. Comparado con el proteoma del micelio, los conidios se enriquecen específicamente en enzimas de la ruta de biosíntesis de la melanina, proteínas del sistema desintoxicante de ERO y la hidrofobina conidial RodA (Teutschbein et al., 2010). De este punto en adelante se indicarán los números de acceso (número y letras) al NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) que identifican a cada proteína, los cuales se encontrarán entre paréntesis.

Se sabe que la germinación de los conidios sólo se activa en presencia de oxígeno (Taubitz et al., 2007), por lo que probablemente, el proceso de germinación genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, ya que en *Aspergillus nidulans* sólo se detectaron mitocondrias activas en conidios que estaban germinando, a la vez que se acumularon proteínas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial tales como NADH-ubiquinona oxidoreductasa (XP_663575), ubiquinol-citocromo reductasa subunidad hierro-azufre (XP_659910) y la regulación de las proteínas relacionadas con la eliminación de ERO, como la tiorredoxina reductasa, catalasa A y peroxirredoxina mitocondrial (Oh et al., 2010).

La catalasa CatA también se produce en exceso en conidios, comparado con el micelio, en general, se observó que no sólo la abundancia, sino que la diversidad de proteínas para la desintoxicación de ERO es alta en los conidios (latentes). Además de catalasas, se encontraron peroxidasa, superóxido dismutasa y enzimas del metabolismo de tiorredoxina y el glutatión, todos los cuales son miembros de los sistemas de desintoxicación de ERO, es muy probablemente que estas enzimas se encuentren activas en los conidios latentes y contribuyan a proteger la viabilidad de los conidios (Teutschbein et al., 2010).

Se analizó la respuesta al estrés oxidante para *Aspergillus fumigatus* por 2D SDS PAGE (electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico) en presencia de peróxido de hidrógeno y se encontró se indujeron las proteínas con funciones antioxidantes tales como tiorredoxina peroxidasa, citocromo c peroxidasa, superóxido dismutasa (Cu/Zn) y catalasa (Cat1), del mismo modo, las proteínas de choque térmico aumentaron en abundancia (Kniemeyer et al., 2009).

Los conidios en reposo se encuentran en un estado latente y albergan un conjunto de enzimas metabólicas que son capaces de catalizar la degradación de los sustratos almacenados en ellos además de los sustratos externos, por lo tanto también requieren enzimas que permitan la utilización inmediata de los compuestos de carbono extracelulares degradables, necesarios para la germinación (Lamarre et al., 2008).

En *A. nidulans*, la activación del "programa de germinación" requiere la ruptura del disacárido trehalosa y la síntesis de glicerol o manitol acompañado por un aumento de la presión de turgencia y la hinchazón de los conidios (Solomon et al., 2007). Las proteínas implicadas en este proceso, también se detectaron en *A. fumigatus*, entre las que se encuentran; una GTPasa monomérica (AFUA_5G11230), una trehalasa neutra (AFUA_4G13530) para la degradación de trehalosa, una deshidrogenasa de glicerol (AFUA_4G11730) involucrado en la formación de glicerol, una deshidrogenasa manitol-1-fosfato (AFUA_2G10660) para la biosíntesis de manitol, además se encontraron algunas proteínas más abundantes en conidios que en micelio, por ejemplo la hidrofobina conidial Hyp1/RodA que forma la capa externa (rodlet) de los conidios y la 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno reductasa (Arp2) que está implicado en la biosíntesis de la melanina, tanto el rodlet y la capa melanina se forman durante la conidiación y constituyen elementos estructurales específicos que confieren características a los conidios tales como hidrofobicidad y resistencia frente a las condiciones adversas, en el mismo estudio se observó que los conidios latentes contienen cantidades considerables de

proteínas ribosomales, factores de elongación, aminoacil-ARNt sintetetasas y proteínas de la biosíntesis de aminoácidos, que garantizan la rápida reanudación de la traducción de ARN mensajeros almacenados y de los ARN recién sintetizadas en el inicio de la germinación (Teutschbein et al., 2010).

Otro grupo importante de proteínas, son las proteínas de choque térmico (HSP) relacionadas con el estrés, estas se inducen durante la osmoadaptación en *A. nidulans*, durante este proceso también se incrementó la expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis del glicerol, el cual actúa como un osmolito cuando el hongo se enfrenta a un choque osmótico (Kniemeyer et al., 2009). Las proteínas de choque térmico también se conocen por su papel en la maduración de los complejos de proteínas y la degradación de péptidos dañados o mal plegados y para la regulación de la actividad de muchas proteínas de transducción de señales (Wang et al., 2004), además se demostró que seis manchas proteicas las cuales correspondían a HSP se sobrerregularon durante la ruptura de la latencia de las esporas y en la primera fase de germinación (Oh et al., 2010).

2 ANTECEDENTES

Se ha observado una relación entre la formación de los conidios y el porcentaje de oxígeno en la atmósfera donde se cultiva el hongo (Tlecuitl -Beristain et al., 2010; Garza-López et al., 2012; Miranda-Hernández et al., 2014). En el estudio realizado por Tlecuitl -Beristain et al., (2010) se mostró que una atmósfera enriquecida con oxígeno (26%) duplicó la producción de conidios de *M. anisopliae* cuando se aplicó un pulso de gas enriquecido con oxígeno a las 60 h de cultivo, que se relaciona al trabajo de Braga et al., (1999), quienes probaron que alrededor de las 60 h se da un consumo exponencial de la fuente de carbono y oxígeno. En este sentido, con el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* se mostró que la respuesta a la luz azul se lleva a cabo en horas específicas del crecimiento de hongo (Sanchez-Murillo et al., 2004) ya que sólo con el pulso de luz azul que se aplicó en las 72, 84 y 96 h del crecimiento del hongo se obtuvo mayor producción de conidios, antes de esas horas, no se encontró efecto del pulso de luz y después de esas horas específicas se vio un efecto negativo, ya que se disminuyó la producción de conidios, debido a que la conidiación del hongo requiere de un periodo de “competencia” para que pueda observarse la inducción de conidiación por la luz azul.

Se ha probado el efecto del oxígeno sobre el crecimiento de hongos y se encontró que nueve de las diez especies estudiadas tuvieron un mayor crecimiento radial, conforme aumentaron el porcentaje de oxígeno en la atmósfera, llegando al máximo crecimiento a 30% de oxígeno y no se encontró mayor

crecimiento radial cuando aumentaron el porcentaje de oxígeno desde 40 % a 100% (Yang y Lucas, 1970), mientras que con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, bajo condiciones de hipoxia (16% O₂) la producción de conidios se incrementó 33% respecto a la atmósfera normal; también el recambio atmosférico con oxígeno (16% y 26% O₂) provocó una 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, la modificación atmosférica produjo mayor oxidación de lípidos, lo cual coincidió con el decremento de la actividad enzimática antioxidante con esto los autores establecen que los pulsos con 16% y 26% O₂ provocaron estrés oxidante en *B. bassiana*, lo cual se reflejó en la calidad e infectividad de los conidios obtenidos con dichas atmósferas, ya que estos se afectaron negativamente (Garza-López et al., 2012).

En un sistema en el cual se inyectó 100% de oxígeno se estudió el daño por hiperoxia a células de *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que la resistencia a la hiperoxia requiere de una serie de factores que respondan al estrés incluyendo aquellos de defensa antioxidante, choque térmico, la reparación del daño al ADN y la homeostasis de metales. Específicamente una serie de factores antioxidantes resultaron importantes para la resistencia a la hiperoxia, estos son la enzimas superóxido dismutasa (SOD 1 y SOD2) y la glutatión reductasa (GLR1) (Outten et al., 2005).

Se reportó que cuando se aplican pulsos de oxígeno conteniendo 26 % O₂ al cultivo de dos cepas del hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF3302, los conidios producidos son más tolerantes a altas temperaturas (38 y 40°C), comparado con los conidios producidos en atmósfera normal (21 % O₂), al incrementar en todos los casos el tiempo al cual el 50% de los conidios aún son viables (TS₅₀) (Miranda-Hernández et al., 2014). Lo anterior corrobora el efecto de “protección cruzada” por exposiciones a estrés subletal, al mejorar la resistencia de los conidios a otro tipo de tensión (Rangel, 2011). La protección cruzada podría deberse a la sobrerregulación de genes de enzimas antioxidantes como en el caso de *Candida oleophila* que fue expuesta a un pretratamiento con peróxido de hidrogeno (subletal), y posteriormente fue tratada con concentraciones más elevadas de peróxido de hidrogeno o con calor, estas células presentaron genes sobrerregulados de enzimas tales como la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y glucosa-6 fosfato deshidrogenasa en comparación con las células que no pasaron por el pretratamiento (Liu et al., 2012).

3 JUSTIFICACIÓN

El uso de agentes biológicos para el control de plagas se ha propuesto como una alternativa confiable para el manejo integral de plagas (MIP) principalmente porque estos no tienen los riesgos asociados a la estrategia común del uso de plaguicidas químicos, tales como daños a la salud humana, contaminación al medio ambiente y el desarrollo de resistencia a los plaguicidas generados en las plagas (Alatorre-Rosas, 2007). En particular, los hongos entomopatógenos, de los cuales *Metarhizium* es el más utilizado, también tienen la gran ventaja de que no necesitan ser consumidos por el insecto para infectarlo (como es el caso de los bioinsecticidas producidos por *Bacillus thuringiensis*) sino que infectan por contacto; esto les da la posibilidad de ser utilizados para controlar plagas de insectos que transmiten enfermedades como la malaria, la enfermedad del sueño, la enfermedad de Chagas, dengue y la fiebre amarilla (Nappi y Christensen, 2005).

La efectividad en el uso de *M. anisopliae* en campo depende de que los conidios, las unidades infectivas del hongo, sean capaces de soportar tanto los factores ambientales a los que está expuesto (como la radiación ultravioleta o la temperatura elevada (Tseng, et al., 2011)) como de afrontar la respuesta inmune del insecto (usualmente dependiente de la generación de ERO), es decir, los conidios que se utilizan en el control biológico deben cumplir con ciertos parámetros de calidad que pueden medirse experimentalmente en el laboratorio y que están relacionados con la capacidad del hongo de infectar a su insecto blanco.

Por otro lado, se sabe que la exposición de los hongos entomopatógenos a un estrés moderado puede mejorar los parámetros de calidad de los conidios resultantes, mejorando no sólo su resistencia al estrés aplicado sino también a otros tipos de estrés, proceso denominado protección cruzada (Rangel, 2011). Una estrategia válida para incrementar la calidad de los conidios es el uso de atmósferas modificadas con concentraciones crecientes de oxígeno para inducir un estrés oxidante moderado, de modo que los conidios resultantes incrementen su tolerancia a las ERO generadas durante su metabolismo aerobio y durante el proceso infectivo, así como incrementar su resistencia a otros factores de estrés (en nuestro caso el incremento en la temperatura) gracias a la protección cruzada. La mejora en la calidad de los conidios podrían darse por cambios en la síntesis de proteínas involucradas con la respuesta general a estrés o de respuesta específica a ERO (Barros et al., 2010; Outten et al., 2005) los cuales podrían analizarse utilizando un enfoque proteómico.

4 HIPÓTESIS

La exposición de un micelio competente de *Metarhizium anisopliae* a una atmósfera rica en oxígeno mejorará la producción y calidad de sus conidios debido a la síntesis diferencial de proteínas, especialmente aquellas relacionadas con la defensa antioxidante.

5 OBJETIVOS

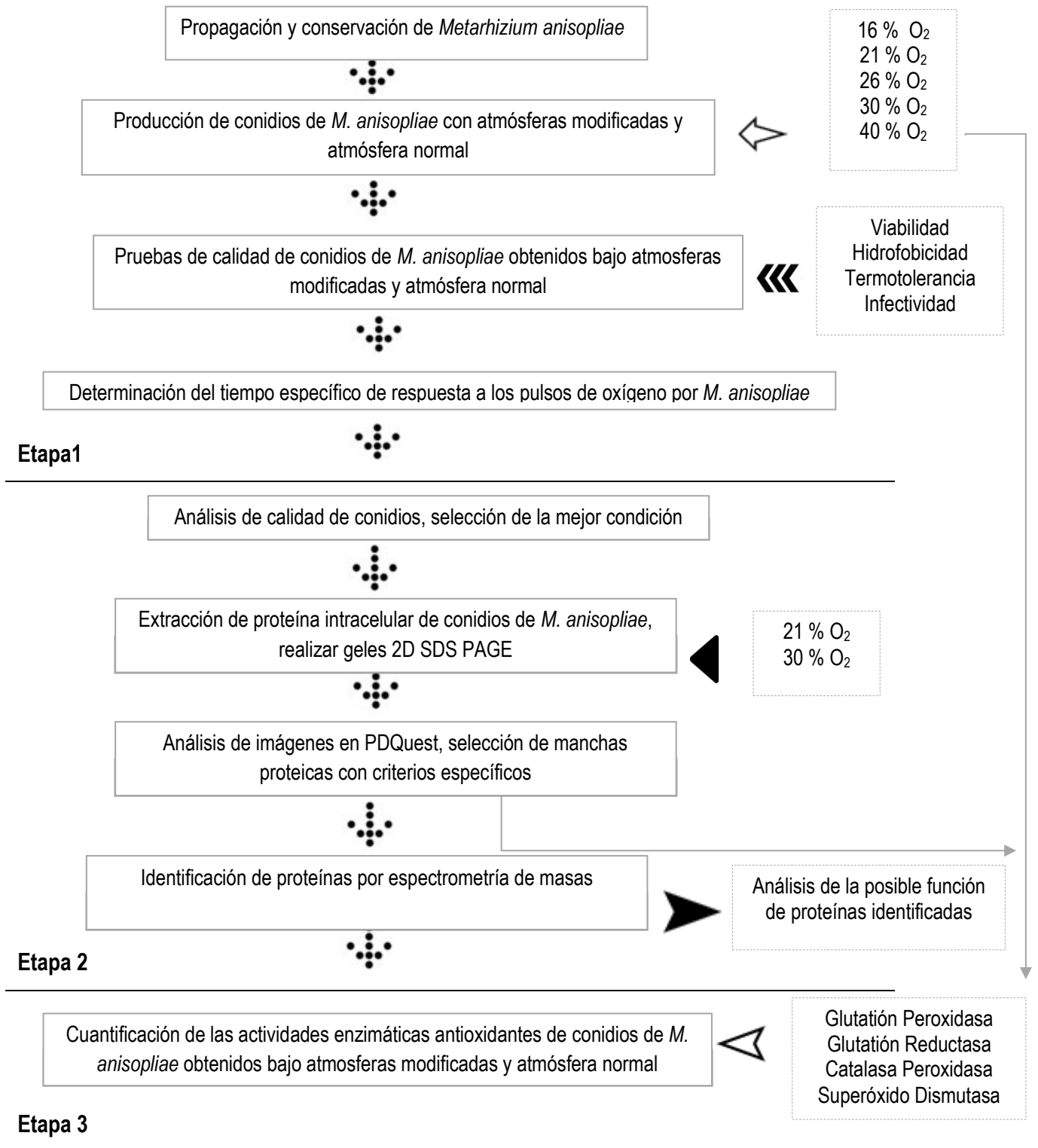
5.1 Objetivo General

Evaluar la calidad y el perfil proteómico de los conidios producidos por micelio de *Metarhizium anisopliae* expuesto a atmósferas oxidantes en diferentes puntos de su desarrollo.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el tiempo específico de respuesta a pulsos de oxígeno por parte de *Metarhizium anisopliae*.
- Determinar el efecto de pulsos con distintas concentraciones de oxígeno sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*.
- Determinar el efecto de los pulsos de oxígeno en la tolerancia de los conidios de *Metarhizium anisopliae* a una elevada temperatura.
- Identificar las proteínas diferenciales presentes en los conidios de *Metarhizium anisopliae* obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno y determinar qué proteínas están relacionadas con los procesos de conidiación y de tolerancia al estrés.
- Relacionar la actividad de enzimas antioxidantes con los parámetros de calidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae*.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismo

El hongo utilizado fue la cepa *Metarhizium anisopliae* CP-OAX que pertenece a la colección de hongos del Colegio de Posgraduados en Texcoco, México. Este hongo se identificó por análisis de secuencia de los fragmentos ITS de los genes ribosomales como *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. (NCBI: FJ876298) (Tlecuítl-Beristain et al., 2010). Esta cepa fue depositada en la colección de cepas ENCB-IPNWDCM449 del Instituto Politécnico Nacional, con el número de identificación ENCB-MG-81.

7.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo fue el formulado por Tlecuítl- Beristain et al., (2010), conteniendo harina de avena No. 1® (33.3 g/L) con de peptona de carne (Bioxon, 10 g/L) además de agar bacteriológico (Bioxon, 15 g/L). El medio de cultivo se esterilizó a 121 °C, a 15 lb/in² durante 15 minutos y a menos que se indique lo contrario, todo el material y los medios de cultivo se esterilizaron de esta manera.

7.3 Reactivación de la cepa y cultivo monoclonia

Las cepas de hongo filamentosos cultivados sucesivamente en medios de cultivo artificiales pierden la capacidad de producir conidios y/o los conidios sufren cambios coloración, se observa formación de sectores en el cultivo y la cepa pierde la capacidad de infectar a su hospedero (Wang et al., 2005), algunas de las características se pueden recobrar luego que los conidios se recuperan de los cadáveres de su hospedero una vez infectado (Brownbridge et al., 2001; Vandenberg y Cantone, 2004), con el objetivo de iniciar cada cultivo con una cepa que contara con las mejores características fisiológicas posibles se infectaron larvas de *Tenebrio molitor* como se indica en la sección 7.8.4 y un asada de conidios, tomada del cadáver de un insecto se sembró por estría en medio harina peptona al que se agregó sulfato de estreptomina (Sigma, 10 mg/L) como antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias (Jaronski y Jackson, 2012), la solución de estreptomina se filtró con una membrana de 2 µm de poro (Pall), como método de esterilización, después de 7 días de crecimiento se tomó una asada de conidios y se sembró por estría en medio Agar Maltosa Sabouraud (AMS), pasados 3 días se tomó un colonia aislada y se sembró en el centro de una caja Petri con medio avena-peptona,

descrito anteriormente, después de diez días se tomaron bocados de los conidios que crecieron en la periferia de la colonia y se almacenaron como se indica en la sección 7.4.

7.4 Producción del inóculo

A partir de conidios obtenidos del cultivo monoclonia, los bocados con micelio y conidios se almacenaron con 4 mL de agua desionizada a 4 ° C (Lastra et al., 2011). El inóculo se obtuvo distribuyendo los conidios que se encontraban en el bocado, sobre una caja Petri que contenía 15 mL de medio avena-peptona, mencionado anteriormente. La cepa se mantuvo a 28° C y con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h durante 7 días. Los conidios obtenidos de este modo se utilizaron para iniciar las cinéticas de producción de conidios, para las pruebas de calidad y la obtención de proteína, cabe señalar que cada vez que se inició la producción del inóculo para cualquiera de las pruebas mencionadas, siempre se inició de conidios almacenados a 4°C que pertenecían a un mismo lote de conidios y que no se sembraron más que para obtener el inóculo, esto con la finalidad de evitar la degeneración de la cepa por crecimiento sucesivo en un medio artificial (Chengshu Wang, Butt, & St Leger, 2005).

7.5 Producción de conidios y modificación de la atmósfera

Para las cinéticas de producción de conidios, las unidades experimentales fueron botellas serológicas de 120 mL (Distbrand, México) conteniendo 10 ml del medio avena-peptona, el inóculo inicial fue una suspensión de conidios realizada con Tween 80 al 0.1% (v/v) con una concentración de 5.7×10^5 con/cm². Las botellas se cerraron con tapones de algodón, hasta las 60 h de cultivo y después se cambiaron por tapones de goma (Tlecuil-Beristain et al., 2010). Después de 60 h de cultivo se modificó la atmósfera con una mezcla de gas con una concentración de 16, 26, 30 y 40 % de oxígeno, balanceado a 100 % con nitrógeno (Praxair, México); con una aguja se introdujo el gas proveniente de un tanque que contenía la mezcla a probar, con un flujo de 13.8 cm³/s de la mezcla durante 1.2 min y otra aguja funcionó como salida del gas, se renovó la atmósfera cada 24 h. Además, se evaluó la concentración de oxígeno en condiciones normales (21% de O₂), para lo cual, se mantuvieron las unidades experimentales con tapones de algodón durante toda la cinética. Para cada tratamiento se evaluaron tres muestras independientes.

7.6 Cuantificación de la producción de conidios

En cada tiempo de muestreo (cada 24h) se adicionaron 20 ml de Tween 80 0.1% (v/v), a cada una de las botellas (sección 6.5) y se agitó con una barra magnética que raspó la superficie sólida. El conteo de los conidios se realizó con cámara de Neubauer con el objetivo a 40 X de un microscopio óptico (BOECO, Alemania). La producción se calculó como conidios por centímetro cuadrado (con/cm²), al considerar el área sobre la cual crece el hongo.

Es importante señalar que se realizó una normalización de la producción de conidios debido a que dicha producción varía de lote a lote, como se reportó por Cherry et al., (1999). La normalización se calculó usando como referencia la máxima producción de conidios (5.43×10^7 con/cm²) observada bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂), mediante la ecuación 1. La normalización de datos se realizó ya que permitió visualizar la magnitud de cambio obtenido debido al tratamiento empleado (McCune et al., 2002).

$$C_N = \frac{C_T}{C_C} \quad (1)$$

Donde C_N es la producción de conidios normalizada, C_T producción de conidios obtenida en cada tiempo de muestreo de cada tratamiento y C_C es la producción de conidios control cuyo valor fue 5.43×10^7 con/cm²

7.7 Determinación del tiempo crítico de respuesta a pulsos de oxígeno

Con el objetivo de determinar el tiempo crítico de respuesta del hongo a los pulsos oxidantes se inoculó *M. anisopliae* como se describió en la sección 6.5, aunque en estos ensayos el primer recambio atmosférico se realizó a las 36, 40, 60 o 72 h. Estos ensayos se llevaron a cabo sólo con 30 % de oxígeno, se cambió la atmósfera cada 24 h y se cuantificó la producción de conidios.

Los resultados correspondientes a la cinética de producción de conidios se ajustaron al modelo de crecimiento de Gompertz (ecuación 2), con ello se estimó producción máxima de conidios al modificar el tiempo de aplicación de los pulsos (Zwietering et al., 1990).

$$y = a * \exp[-\exp(b - ct)] \quad (2)$$

Donde y es el $\ln C/C_0$ al tiempo t , y α , b y c son parámetro del modelo de Gompertz α y b (adimensional) y c (h^{-1}), finalmente, t es el tiempo (h).

El parámetro biológico C_{max} fue determinado por la ecuación 3:

$$C_{max} = \exp(a) * C_0 \quad (3)$$

Donde C_{max} es la máxima concentración de conidios (con cm^{-2}), α (adimensional) es un parámetro del modelo de Gompertz, y C_0 (con cm^{-2}) es la concentración inicial de conidios.

7.8 Pruebas de calidad

7.8.1 Viabilidad

La viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* se probó cultivando sobre Agar Maltosa Sabouraud (AMS) con desoxicolato de sodio (0.5 g/ L). Se inoculó cada caja Petri (90 x 15 mm) con 30 μ L de una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^4 con/mL, por lo tanto; se sembraron 300 conidios obtenidos de cada tratamiento y se esparcieron con una varilla de vidrio por todo el medio de cultivo, para cada tratamiento se realizó tres réplicas. Después de 72 h a $28 \pm 1^\circ$ C se contó las unidades formadoras de colonias y posteriormente se reportó como porcentaje de viabilidad, considerando 100 % los 300 conidios sembrados originalmente (Montesinos-Matías et al., 2011).

7.8.2 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad se determinó por un método exclusión de fases. Los conidios de *M. anisopliae* obtenidos de cada tratamiento se centrifugaron a 5000 rpm por 30 minutos a 4° C, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con agua destilada, nuevamente se centrifugó la suspensión y se desechó el sobrenadante, finalmente se realizó un lavado con nitrato de potasio (0.1 M) 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. En un tubo de ensayo se transfirieron 3 mL de la suspensión de los conidios y se adicionó 1 mL de n-hexadecano (Sigma) y se agitó por 20 s. Después de 30 min la fase acuosa fue removida con una pipeta Pasteur y se determinó la densidad óptica (OD ac), también se determinó la densidad óptica a la suspensión de conidios (OD total). La densidad óptica de la suspensión y de la fase acuosa fue determinada con un espectrofotómetro (Perkin-Elmer)

a 660 nm y se realizó tres réplicas por tratamiento, el porcentaje de hidrofobicidad fue calculada con la ecuación 4:

$$H(\%) = \left(1 - \frac{OD_{aq}}{OD_{total}} \right) * 100 \quad (4)$$

Donde, OD_{total} es el valor de la densidad óptica de la muestra inicial (suspensión de conidios) y OD_{aq} es el valor de la densidad óptica de la fase acuosa después del tratamiento (Shah et al., 2007).

7.8.3 Termotolerancia de conidios

La temperatura es uno de los factores que afecta la viabilidad de los conidios (Li y Feng, 2009), por tanto es importante conocer el grado de resistencia de estos a una elevada temperatura, por otro lado, esta prueba se llevó a cabo para evaluar el desarrollo del fenómeno conocido como “protección cruzada” contra un tipo de tensión ambiental diferente a la concentración de oxígeno al que se expuso a *M. anisopliae*.

Se probó la termotolerancia de los conidios obtenidos bajo diferentes atmósferas modificadas, la prueba se efectuó de acuerdo al protocolo reportado por Rangel et al., (2005), se estandarizó a 1×10^4 con/mL una suspensión de conidios que se colocó en tubos de vidrio y fueron expuestos a una 45 ± 1 °C en un baño de temperatura controlada. Periódicamente, se tomaron 30 μ L de muestra de las suspensiones de conidios y se cultivaron sobre medio AMS y se incubaron 72 h a 28 ± 1 °C, con un fotoperiodo 12:12 h luz/oscuridad. Después del periodo de incubación se cuantificaron las unidades formadoras de colonia se graficó la sobrevivencia (%) contra el tiempo de exposición al calor, los datos se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial (ecuación 5) propuesto por Miranda-Hernández et al, (2014).

$$S = S_0 * e^{-(k \cdot t)} \quad (5)$$

Donde S es la viabilidad de los conidios a un tiempo t , S_0 es la viabilidad inicial (%), k es la tasa específica de decaimiento en la viabilidad (h^{-1}). El tiempo de sobrevivencia 50 (TS_{50}) fue estimado y se definió como el tiempo al cual el 50% de los conidios es aún viable.

7.8.4 Infectividad

Con el objetivo de determinar si la infectividad de los conidios se afectó negativamente por la modificación de la atmósfera, se llevaron a cabo bioensayos utilizando larvas de *Tenebrio molitor* (Petmmal, Estado de México). Los conidios producidos bajo atmósfera modificadas (16, 26, 30 y 40% O₂) y atmósfera normal (21% O₂) se cosecharon y se preparó una suspensión de conidios, con una concentración de 1×10^8 con/mL. Las larvas fueron sumergidas durante 15 s, en 20 mL de la suspensión de conidios y luego se pasaron a cajas Petri (90 x 15 mm), cada caja Petri contenía 12 larvas, y una mezcla de salvado de trigo: avena (1:1) estéril, esta se agregó después de 10 min que se dejó secar el cuerpo del insecto, se utilizaron 5 réplicas por tratamiento (Goettel e Inglis, 1997). Como control, un grupo de larvas se sumergieron de la misma manera, pero en solución estéril de Tween 80 (0.1%) y luego las unidades experimentales se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de luz-oscuridad 12:12 h, en contenedores de plástico transparente con papel filtro húmedo, el porcentaje de sobrevivencia se registró cada 24 h. Tras la muerte del insecto, este fue retirado de la caja de Petri en donde se encontraba, y se colocó dentro de una nueva caja Petri estéril la cual fue puesta en otro contenedor con papel filtro húmedo para promover el crecimiento del hongo y confirmar que la muerte fue ocasionada por la infección de *Metarhizium anisopliae*.

Los datos experimentales se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial (ecuación 6), graficando el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo.

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

$$Y = 100 \text{ si } 0 \leq t \leq t_0 \quad (6)$$

Donde, Y es el porcentaje de sobrevivencia en el tiempo t , k es la tasa específica de muerte (d^{-1}), t_0 es el tiempo de retardo en el primer insecto murió (d) y S es el nivel (%) de sobrevivencia asintótica. Este modelo corresponde a una ecuación diferencial de primer orden que indica el tiempo de retardo de muerte con la condición inicial $Y \rightarrow S$ para $t \rightarrow \infty$ (Rodríguez-Gómez et al, 2009).

7.9 Extracción de proteína intracelular de conidios *Metarhizium anisopliae*

Con el objetivo de analizar el efecto de la concentración de oxígeno sobre los conidios producidos, por medio de un enfoque proteómico, se cosecharon los conidios producidos bajo la atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) y atmósfera normal (21 % O₂) con 20 mL de Tween 80 al 0.1 % (v/v), ese volumen

se pasó a otra botella con la finalidad de concentrar la suspensión, luego esta se lavó con 3 mL de la solución de Tween 80, este volumen se añadió a los 20 mL de volumen inicial, y lo mismo se realizó para 20 botellas más, al final se contó con 80 mL de suspensión, la suspensión se mantuvo en un baño con hielo para posteriormente se filtrar la suspensión por cuatro capas de gasa con el propósito de remover la mayor cantidad de micelio, luego se centrifugó a 7000 rpm, a 4 ° C por 10 min, se eliminó la solución de Tween 80 y el sedimento se lavó dos veces con agua desionizada, se centrifugó y los conidios se lavaron con 20 mL de solución amortiguadora de fosfato salino (0.9 % p/v NaCl en 0.1 M de solución amortiguadora de fosfato de potasio, pH 7.0), se centrifugó nuevamente y esta vez sólo se agregó 5 mL de solución amortiguadora de lisis (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM NaCl, 0.5 mM desoxicolato de sodio), se tomó 1 mL de esta suspensión y se pasó a un tubo que contenía 500 mg de perlas de vidrio (5mm de diámetro, Cole Palmer) previamente esterilizadas, además se añadió 30 µL de cocktail inhibidor de proteasas por cada mililitro de suspensión (Sigma P8215); posteriormente se rompieron los conidios en un disruptor de células (Mini-bedbeater 16, Biospec Products), durante 6 min, en ciclos de 30 s de rompimiento por 30 s de enfriamiento en hielo, esta suspensión se centrifugó a 9000 rpm, 4 ° C por 14 min para separar los restos celulares de la proteína soluble, el precipitado se desechó y el sobrenadante se centrifugó 9000 rpm, 4 ° C por 10 min para asegurar que todos los restos celulares fueran removidos, el sobrenadante se pasó a tubos de 2 mL (Nandakumar y Marten, 2002).

Finalmente la solución se ultrafiltró en unidades de 10 kDa (Amicon ultra-15, Millipore), se centrifugó a 8000 rpm, a 4 ° C por 2 h y se lavó dos veces con Tris-HCl 20 mM con un pH de 7.2, finalmente se tomaron alícuotas de 200 µg de proteína que se midió por el método de Bradford (Biorad USA) como se describe en la siguiente sección y finalmente se liofilizó a 0.01 mBa, -53°C (Labconco Freezone 4.5).

7.10 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se midió por el método de Bradford, (1976) en microplaca de Biorad, la mezcla de reacción consistió en 160 µL de extracto intracelular y 40 µL de reactivo de Bradford (Biorad). Se mezcló la muestra y el reactivo de Bradford y después de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente se registró la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Biotex, ELx808). El cálculo de la concentración de proteína se realizó mediante una curva de calibración empleando Albúmina Sérica Bovina (ASB) como estándar, se prepararon 5 diluciones de ASB desde

0 hasta 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que es el rango lineal de este método, la curva de calibración se muestra en el Anexo I.

7.11 Determinación del tiempo de ruptura de células

Se cosecharon los conidios de *M. anisopliae* cultivados con atmósfera normal (21 % O_2), la suspensión de conidios se estandarizó a 1×10^9 con/mL, como se describe en la sección 6.9 se procedió a extraer la proteína intracelular, con la diferencia de que los conidios se mantuvieron en el disruptor de células (Mini-bedbeater 16, biospec products), durante 3, 4, 6, y 8 min, en ciclos de 30 s de rompimiento por 30 s de enfriamiento en hielo; posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para sembrar 300 conidios en una caja Petri con medio AMS y se determinó la viabilidad como se describió en la sección 7.8.1, esta prueba se realizó para determinar el tiempo en el cual los conidios no sobreviven a la ruptura, a la par se corroboró la ruptura de los conidios colocando 10 μL de la suspensión de conidios que pasó por el tratamiento y se colocó en una cámara de Neubauer la cual se observó en un microscopio óptico a 40 X (Boeco, Alemania), la imagen se puede encontrar en la sección 8.4.

7.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

(SDS PAGE)

Esta técnica se empleó para verificar la integridad de la proteína aislada (sección 7.9). Debido a la desnaturalización por dodecil sulfato sódico (SDS), las proteínas migran en el gel de acuerdo con su peso molecular, lo que permite detectar posibles eventos de proteólisis, producto del método de extracción (Raynal et al., 2014), para llevar a cabo esto, se utilizó el sistema de amortiguador discontinuo (Laemmli, 1970). Se mezclaron los reactivos descritos en la Tabla 1, primero se realizó el gel de resolución con una concentración de poliacrilamida 12 % T, que contenía solución amortiguadora Base Tris HCl 0.375 M, pH de 8.8, posteriormente se realizó el gel de compactación cuya concentración de poliacrilamida fue de 5 % T con solución amortiguadora Base Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8 y se sonicó ambas mezclas durante 5 min. Aparte, se preparó persulfato de amonio (APS) al 10 %, una vez realizado esto se añadió TEMED (Tetrametiletildiamina) y APS a la mezcla para realizar el gel de resolución y se dejó polimerizar por 40 min, añadiendo 1 mL de agua desionizada para evitar la desecación del gel, pasado este tiempo se añadió el gel de compactación, se colocó un molde para realizar pozos y se dejó polimerizar por 15 min, al finalizar los geles tenían pozos de 0.75 mm de grosor.

Tabla 1. Mezcla para preparar geles de poliacrilamida

Reactivo	Cantidad para Gel al 5 %	Cantidad para Gel al 12 %
H ₂ O desionizada	5.7 mL	3.4 mL
Acilamida/Bis 30 % T, 2,67 % C	1.7 mL	4.0 mL
Base Tris HCL*	2.5 mL	2.5 mL
Tampón de gel	0.1 mL	0.1 mL

Las cantidades que se indican son para preparar 10 mL de mezcla, *la concentración y pH se especifica en el texto.

%T, donde T es la concentración total de monómeros de acrilamida y bisacrilamida.

%C, donde C es la concentración de bisacrilamida

Se reconstituyó con 80 μ L de solución amortiguadora de solubilización (sin anfolitos) un tubo con proteína soluble extraída de los conidios (sección 7.9), se tomó 50 μ g de proteína (20 μ L de solución) a la cual se añadió 10 μ L de solución de carga (Tabla 2) la mezcla se agitó en vórtex y se calentó a 90 °C por 5 min. La mezcla de proteína soluble extraída de los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) o atmósfera normal (21 % O₂) junto con la solución de carga se añadieron en cada uno de los pozos (30 μ L) y la electroforesis se realizó con un voltaje constante de 150 V por 1 h en una cámara de electroforesis (Miniprotean tetra 4, Biorad) que contenía solución amortiguadora de corrida 1x (Tabla 3) a continuación los geles se retiraron y se adicionó solución fijadora (Tabla 4) durante 2 h, posteriormente la solución se retiró y se lavó los geles 6 veces con agua desionizada, se retiró el agua y se añadió solución de tinción (Tabla 5) y se dejó agitando suavemente por 12 h (Candiano et al., 2004). Finalmente se destiñeron los geles por medio de lavados con agua desionizada y se digitalizó la imagen como se describe en la sección 6.14, la electroforesis se realizó por triplicado para cada muestra.

Tabla 2. Solución de carga

Reactivo	Cantidad
Agua desionizada	3.5 mL
Tris HCl 0.5M, pH 6.8	1.25 mL
Glicerol	2.5 mL
SDS 10 % (p/v)	2.0 mL
Azul de bromofenol 0.5 % (w/v)	0.2 mL
β -mercaptoetanol, justo antes del uso	50 μ L

Tabla 3. Solución amortiguadora de corrida 10 X (Laemmli)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Tris base	30.3 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Tabla 4. Solución fijadora

Reactivo	Concentración
Ácido acético glacial	10 %
Etanol absoluto	40 %
Agua desionizada	50 %

Tabla 5. Solución de tinción "Blue silver"

Reactivo	Concentración
H ₃ PO ₄	2 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 %
Metanol	20 %
Azul de Coomassie G-250	0.1 %

7.13 Electroforesis bidimensional (2D-SDS PAGE)

Esta técnica se empleó para separar a las proteínas extraída de los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) o atmósfera normal (21 % O₂), primero por su punto isoeléctrico y posteriormente como segunda dimensión, por peso molecular, para esto se rehidrataron 200 µg de proteína soluble (liofilizada) extraída de los conidios, con 125 µL de solución amortiguadora para solubilización (Tabla 6) y se cargó en una tira de 7 cm con poliacrilamida, con un gradiente lineal de pH inmovilizado de 3-10 (Biorad), luego las tiras se rehidrataron a 20 °C por 14 h (rehidratación pasiva). Para resolver las proteínas, se realizó un isoelectroenfoque (Protean i12™ IEF cell) con las condiciones siguientes: 20 °C, 250 V por 0.25 h, 4000V por 2h, 4000-15000 V h. Después del isoelectroenfoque las tiras se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

Previo a realizar la segunda dimensión las tiras se equilibraron en dos pasos sucesivos de 15 min cada uno, agitando la tira suavemente en solución amortiguadora de equilibrio (Tabla 7) agregando: (a) 2 % p/v DTT a continuación se decantó la solución y se reemplazó por solución amortiguadora de equilibrio y (b) 2.5 % de iodoacetamida (Li et al., 2010).

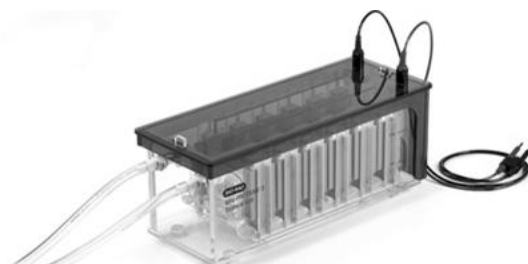
Tabla 6. Solución amortiguadora de solubilización.

Reactivo	Concentración
Urea	8 M
CHAPS	4 % (p/v)
DTT	1 % p/v
Anfolitos pH 3-10	0.2 % (v/v)
Azul de bromofenol	0.001 % (p/v)

Tabla 7. Solución amortiguadora de equilibrio

Reactivo	Concentración
Urea	6 M
SDS	20 % (p/v)
Tris HCl, pH 8.8	1.5 M
Glicerol	50 % (v/v)

Las tiras se cargaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes 12 % T (SDS-PAGE), de 1 mm de grosor, para asegurar la tira se agregó 0.6 % p/v de agarosa de bajo punto de fusión que contenía 0.1 μ L de azul de bromofenol al 0.5 % (p/v), 5 μ L de un marcador de peso molecular de 10 a 250 KDa (Figura 9) se cargó en papel filtro que se incluyó en los geles (All blue, Biorad) los geles se cargaron en un cassette y estos se sumergieron en solución amortiguadora de corrida 1X (Tabla 3), pH 8.3 (Laemmli, 1970) contenida en una cámara Mini-PROTEAN® 3 Dodeca™ Cell (Biorad) que se muestra en la Figura 8, para finalizar se aplicó un corriente constante de 150 V. Después de 45 min, se lavó el gel con agua desionizada y se sumergió en solución para fijadora (Tabla 4) por 2 h, luego se realizaron seis lavados con agua desionizada, el gel se tiñó con solución "Blue silver" (Tabla 5) que contenía azul de Coomassie G-250 (Candiano et al., 2004) después de 12 h de tinción se lavó el gel con agua desionizada y el gel se digitalizó.

**Figura 8.** Mini-PROTEAN® 3 Dodeca™ Cell

7.14 Adquisición de imágenes e identificación de las proteínas con cambio de abundancia

Después de separar las proteínas que fueron extraídas de los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) o atmósfera normal (21 % O₂) por su peso molecular y su punto isoelectrico), se obtuvieron seis geles 2D SDS PAGE, correspondientes a 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas, mismas que se digitalizaron en el equipo Gel Doc™ Biorad XR+ Imaging system, con el software Image lab 3.0 de Biorad, el software optimizó automáticamente el tiempo de exposición de cada gel. Posteriormente se analizaron las imágenes en el programa PDQuest Advance 8.0.1 (Biorad), se procedió a realizar un “experimento” en el programa para obtener un gel maestro correspondiente a cada tratamiento, para esto, primero se realizó una edición de manchas, se eliminaron los falsos positivos que el programa detectó como manchas, se verificó que las manchas fueron agrupadas correctamente, estas debían estar al menos en tres geles (Valledor y Jorrín, 2011) Con el objetivo de comparar los geles de las dos condiciones atmosféricas probadas (21 y 30 % O₂), la normalización de las manchas se hizo utilizando el modelo de regresión local, de este modo se obtuvo la cantidad normalizada de todas las manchas detectadas. Una vez que se obtuvieron los geles maestros de cada condición se realizó un “experimento de alto nivel” que empató las manchas que se encontraban en ambos tratamientos, y se encontró las proteínas que eran exclusivas de cada tratamiento.

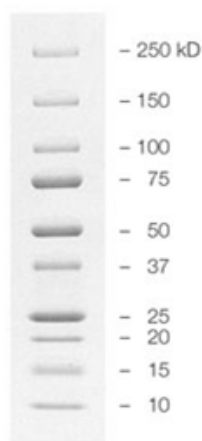
Para las manchas que se encontraron en ambos tratamientos, se consideraron para su posterior análisis por espectrometría de masas, aquellas que habían cambiado en abundancia, esto fue cuando la cantidad normalizada de una mancha fue mayor al menos 3 veces en relación con el tratamiento (21 % vs 30 %), se determinó la diferencia significativa por una prueba estadística de *t* de Student.

7.14.1 Estimación de Peso Molecular y del punto Isoeléctrico

Para conocer el peso molecular experimental de cada proteína encontrada, se calculó la movilidad electroforética relativa (Rf) mediante la ecuación 7, para cada proteína. La distancia recorrida verticalmente por cada proteína (cm) se midió con el programa Image ProPlus.

Se determinó cada Rf y debido a que la movilidad electroforética relativa es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular (Voet et al., 2009), se trazó un gráfico con los logaritmos de los pesos moleculares conocidos del estándar (All Blue, Biorad) contra la movilidad relativa de cada banda, posteriormente se ajustaron los datos a una ecuación exponencial que permitió interpolar las Rf de

cada mancha que se obtuvo en los geles 2D SDS PAGE. La curva de calibración se puede encontrar en el Anexo I.



$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la proteína(cm)}}{\text{Distancia recorrida por el colorante(cm)}} \quad (7)$$

Figura 9. Marcador de peso molecular (All Blue)

Para determinar el punto isoeléctrico experimental de cada mancha se midió la distancia horizontal que migro la proteína con el programa Image ProPlus, en este caso el gradiente de pH (pI 3-10, Biorad), de la tira con acrilamida es de tipo lineal, por lo que se graficó la distancia recorrida (cm) contra las unidades de pH y los datos se ajustaron a un modelo lineal para interpolar la distancia recorrida por cada mancha en los geles 2D SDS PAGE. La curva de calibración se puede encontrar en el Anexo I.

7.15 Digestión triptica en gel

El análisis de las manchas proteicas seleccionadas, por espectrometría de masas se realizó en el servicio del Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Irapuato (CINVESTAV Irapuato), y los materiales y métodos que se utilizaron se describen en las secciones 7.15, 7.16 y 7.17.

La digestión triptica de las proteínas contenidas en el gel se realizó siguiendo el protocolo de Shevchenko et al. (1996), las machas seleccionadas se cortaron manualmente de los geles con ayuda de puntas para pipeta estériles y se colocaron en tubos independientes que contenían 10 μ L de agua desionizada, el agua se retiró y se añadió 50 μ L de acetonitrilo (50 %) con el cual se realizaron dos lavados, el líquido se retiró y se añadió acetonitrilo (100 %) y se mantuvo en agitación por 10 min, el

acetonitrilo se retiró y se agregó 25 μL de una solución de NH_4HCO_3 100 mM se incubó por 5 min y se añadió 25 μL de acetonitrilo (100 %), la mezcla se incubó en agitación a temperatura ambiente por 15 min y posteriormente se retiró todo el líquido.

Se añadió un volumen suficiente para cubrir las piezas de gel con una solución de ditioneitol (DTT) 10 mM disuelto en NH_4HCO_3 100 mM durante 1 hora a 56 °C, de este modo se redujeron las proteínas, posteriormente se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y la solución que contenía DTT se reemplazó con el mismo volumen, pero con una solución que contenía iodoacetamida 55 mM disuelta en NH_4HCO_3 100 mM y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 45 min. Pasados los 45 min, se desechó la solución anterior y las piezas de gel se lavaron con 100 μL de una solución de NH_4HCO_3 100 mM y de 100 μL acetonitrilo (100 %) y se incubó durante 10 min. La fase líquida se retiró, y las piezas de gel se secaron completamente en una centrifuga de vacío.

Se adicionó un tampón de digestión que contenía NH_4HCO_3 100 mM, CaCl_2 5 mM, y 12,5 ng/ μL de tripsina (grado secuenciación, Promega) y se incubó en un baño con hielo por 45 min, pasado ese tiempo se retiró la solución y se reemplazó con 10 μL del mismo tampón, pero esta vez sin tripsina y se incubó a 37 °C, durante toda la noche.

Los péptidos se extrajeron añadiendo a las piezas de gel 20 μL de NH_4HCO_3 20 mM se incubaron 20 min con agitación, a continuación se centrifugó a 5000 rpm por 2 min y se recuperó el sobrenadante, este procedimiento se realizó tres veces más, pero agregando una solución de ácido fórmico (5 %) diluido en de acetonitrilo (50%) (20 min para cada solución), al final se colectó el sobrenadante de cada lavado y se secó a temperatura ambiente.

7.16 Análisis por espectrometría de masas

Para identificar las proteínas que eran únicas o habían incrementado su abundancia se procedió al análisis por espectrometría de masas el cual se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida, nanoAcquity nano-flow (Waters, Milford, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) el cual estaba equipado con una fuente de ionización nanoelectrospray. El solvente A consistió en ácido fórmico (0.1 %) y el solvente B de acetonitrilo (100 %) en ácido fórmico (0.1 %). Se tomó 3 μL de proteínas digeridas con tripsina (sección 7.15) y se cargaron en una precolumna (Symmetry® C18, 5 μm , 180 μm x 20 mm, Waters). Posteriormente el

fluido se cambió a una columna capilar de UPLC¹ (100 µm ID BEH-C18, tamaño de partícula 1.7 µm). La temperatura de la columna se controló a 35 ° C. Los péptidos se separaron por gradiente durante 60 min a un flujo de 400 nL/min. El gradiente se programó de la siguiente manera: solvente B 3- 50 % (30 min), 50-85 % (2 min), 85 % (4 min) y 3 % (22 min).

Los péptidos se eluyeron en un espectrómetro de masas con una fuente nano electrospray a través de una punta revestida de sílice (NewObjective, Woburn, MA). El espectrómetro de masas se operó en el modo de adquisición de datos dependientes con la finalidad de alternar automáticamente en la exploración completa (400-1600 m/z) y posteriormente se exploró cinco péptidos mayoritarios MS/MS en una trampa de iones lineal con exclusión dinámica habilitada. La disociación inducida por colisión (CID, Collision-induced dissociation) se realizó utilizando helio como gas de colisión a una energía de colisión normaliza de 35 % y 10 ms. La adquisición de datos fue controlada por el software Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

7.17 Identificación de proteínas

Los espectros de masas en tándem se extrajeron en el software Proteome Discoverer versión 1.4 y se utilizó el programa Sequest como motor de búsqueda, la base de datos contra la que se comparó fue de *Metarhizium anisopliae* obtenida de NCBI con 26,779 entradas. Los parámetros de búsqueda se establecieron de la siguiente manera: un máximo de 2 puntos de corte fallidos permitidos, y errores de 1Da para espectros MS/MS, la carbamido metil cisteína (derivado de la iodoacetamida) se especificó como una modificación fija y la oxidación de la metionina como modificación variable.

7.18 Actividades enzimáticas de enzimas antioxidantes

7.18.1 Obtención del extracto crudo enzimático (ECE)

Se obtuvo una suspensión de conidios que crecieron bajo distintas concentraciones de oxígeno (16, 21, 30 y 40 % O₂), desde las 84 h, es decir 24 h después de que se aplicó el primer pulso de oxígeno, y se tomaron muestras cada 24 h hasta las 156 h, como se ha descrito previamente en la sección 7.9, la suspensión se concentró por centrifugación a 7000 rpm, a 4° C por 10 min, se descartó la solución de Tween 80 al 0.1 %, se centrifugó nuevamente y se lavó dos veces con agua desionizada.

¹ Cromatografía de líquidos de ultra presión

Posteriormente se sustituyó el agua con solución amortiguadora de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.4, se centrifugó nuevamente y se desechó para resuspender con la solución amortiguadora de fosfatos de sodio, esta suspensión se añadió a tubos de 2 mL con aproximadamente 500mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro.

El extracto crudo enzimático se obtuvo al romper los conidios de *M. anisopliae* en un disruptor de células durante 6 min con ciclos de 30 s de ruptura por 30 s de enfriamiento, una vez pasado ese tiempo se centrifugó 9000 rpm a 4°C por 15 min (Nandakumar y Marten, 2002), se desechó el pellet junto con la perlas de vidrio, para liberar al ECE de restos celulares. Se pasó el ECE a otro tubo con ayuda de una pipeta automática y se centrifugó nuevamente para retirar los posibles restos celulares que hayan quedado cuanto se retiró el pellet, posteriormente se realizaron alícuotas del ECE conteniendo 500 µL en diferentes tubos con la finalidad de medir distintas actividades enzimáticas. Una vez hecho esto, inmediatamente se congeló el ECE a -70 ° C y se mantuvo así hasta que se obtuvieron todas las muestras (156 h), finalmente se liofilizó el ECE con el objetivo de concentrar la solución, para esto las muestras se congelaron en nitrógeno líquido a -80° C y se liofilizó a 0.01 mBa, -53° C (Labconco Freezone 4.5).

7.18.2 Actividad Glutación Peroxidasa (GPx)

Se midió la actividad Glutación Peroxidasa (A. GPx) de las muestras de ECE de los conidios obtenidos bajo atmósferas modificadas o atmósfera normal (16, 21, 30, 40 % O₂) con un kit comercial (Cayman Chemical). Este kit utiliza como principio dos reacciones acopladas, primero el hidroperóxido de cumeno es reducido mientras se oxidan dos moléculas de Glutación reducido (GSH) por la GPx a Glutación oxidado (GSSG); como segunda reacción se recicla el GSSG por la Glutación Reductasa (GR), la reacción requiere de la oxidación de NADPH (Figura 10, B) esta oxidación está acompañada por el decremento en la absorbancia a 340 nm, lo anterior es posible debido a que la glutación peroxidasa reduce hidroperóxidos lipídicos y no lipídicos así como H₂O₂ mientras oxida dos moléculas de GSH.

La GPx es muy específica para su donador de H y mucho menos específica para el sustrato (hidroperóxido) (Michiels et al., 1994). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que puede causar la oxidación de 1.0 nmol de NADPH a NADP⁺ por minuto a 25 ° C., la cual es totalmente dependiente de la cantidad de GSSG generado por la GPx (Figura 10, A).

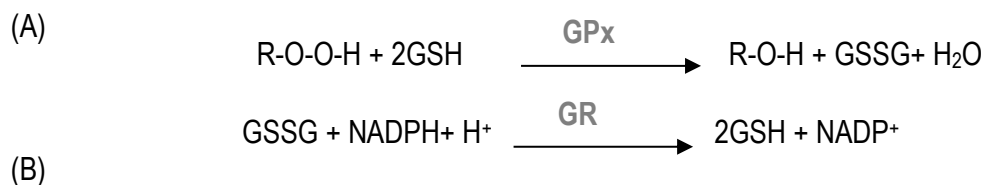


Figura 10. Reacciones acopladas para cuantificar la actividad glutatión peroxidasa

Se reconstituyeron las muestras de ECE, agregando 50 μL de solución amortiguadora que contenía 50 mM de Tris HCl (pH 7.6), 5 mM de EDTA y albúmina sérica bovina (1 mg/mL), por lo tanto el factor de concentración con respecto a las muestras antes de liofilizar, fue 10, esto se realizó manteniendo las muestras en hielo. Por instrucciones del proveedor se reconstituyó una mezcla de co-sustratos con 6 mL de agua desionizada, esta mezcla contenía NADPH, GSH y glutatión reductasa; aparte se preparó una solución amortiguadora de ensayo que contenía 50 mM de Tris HCl (pH 7.6) y 5 mM de EDTA, posteriormente se realizó la mezcla de reacción para determinar la actividad GPx de cada una de la muestras y de un control positivo proporcionado por el fabricante (GPx de eritrocitos bovinos), las cantidades de la mezcla de reacción se describen en la Tabla 8. En las celdas que no contenían enzima (blanco) el volumen de la muestra se sustituyó por solución amortiguadora de ensayo.

La reacción se inició con la adición de hidroperóxido de cumeno, una vez agregado este, se monitoreó la absorbancia a 340 nm en un lector de microplacas (Biotex, ELx808) a 25 °C, durante 6 min. Cada 30 s se obtuvo una lectura, las cuales se emplearon para construir una gráfica de Absorbancia (340 nm) contra el tiempo (min) para cada una de las muestras y se ajustaron los datos a un modelo lineal, cuya pendiente fue la tasa de decaimiento de absorbancia (ΔA_{340}), una vez obtenida la tasa de decaimiento de las muestras y del blanco, se restó la tasa de decaimiento del blanco.

Tabla 8. Mezcla de reacción para determinar actividad glutatión peroxidasa

Reactivo	Cantidad
Solución amortiguadora de ensayo 1X	100 μL
Mezcla de co-sustratos	50 μL
Muestra o control positivo	20 μL
Hidroperóxido de cumeno	20 μL

La actividad GPx se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de NADPH ϵ DE 0.00622 $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, el valor fue ajustado considerando el ancho del pozo (0.6 cm). Finalmente, la A GPx se calculó como se muestra en la ecuación 8.

$$ActividadGPx = \frac{\Delta A_{340} / \text{min}}{0.00373 \mu M^{-1}} \times \frac{0.19 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} = \text{nmol} / \text{min} / \text{mL} \quad (8)$$

Al mismo tiempo se midió la concentración de proteína soluble por el método de Bradford, la reacción se midió a 595 nm como se indica en la sección 6.10 con el objetivo de calcular la actividad enzimática específica.

7.18.3 Actividad Glutati3n Reductasa (GR)

La GR es una enzima dimérica que contiene FAD en su sitio activo la cual utiliza NADPH para reducir GSSG (Michielis et al., 1994), en esta reacci3n la GR oxida al NADPH a NADP⁺, esta oxidaci3n est3 acompa1ada por el decremento en la absorbancia a 340 nm (Figura 11). Una unidad de actividad enzimática se defini3 como la cantidad de enzima que puede causar la oxidaci3n de 1.0 nmol de NADPH A NADP⁺ por minuto a 25 ° C. Este es el principio bajo el cual trabaja el kit comercial (Cayman Chemical) que se utiliz3 para medir la Actividad Glutati3n Reductasa (A. GR) del ECE obtenido de los conidios.



Figura 11. Reacci3n catalizada por la Glutati3n Reductasa

Se reconstituyeron las muestras previamente liofilizadas, agregando 50 μL de soluci3n amortiguadora de muestra que contenía 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.5), 1 mM de EDTA y albúmina sérica bovina (1 mg/mL), por lo tanto; el factor de concentraci3n de las muestras en este caso tambi3n fue 10 con respecto al volumen que se liofiliz3. Siguiendo las instrucciones del proveedor se reconstituy3 NADPH que se encontraba liofilizado, con 2 mL de agua desionizada. Adem3s, se realiz3 una soluci3n amortiguadora de ensayo que contenía 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.5) y 1 mM de EDTA. Finalmente, la mezcla de reacci3n para determinar la actividad GR de un control positivo provisto por el fabricante (GR de *Saccharomyces cerevisiae*) y del ECE obtenido de los conidios contenía las cantidades que se muestran en la Tabla 9, en las celdas que no contenían enzima (blanco) el volumen de la muestra se sustituy3 por soluci3n amortiguadora de ensayo.

Tabla 9. Mezcla de reacción para determinar Actividad Glutatión Reductasa

Reactivo	Cantidad
Solución amortiguadora de ensayo 1X	100 μ L
Solución de GSSG (9.5 mM)	20 μ L
Muestra /control positivo	20 μ L
Solución de NADPH	50 μ L

La reacción se inició con la adición de la solución de NADPH, se monitoreó la absorbancia a 340 nm en un lector de microplacas (Biotex, ELx808) a 25 °C, durante 6 min, cada 30 s se obtuvo una lectura, las cuales se emplearon para construir una gráfica de Absorbancia (340 nm) contra el tiempo (min) para cada una de las muestras y se ajustaron los datos a una modelo lineal, cuya pendiente fue la tasa de decaimiento de absorbancia (ΔA_{340}). Una vez obtenida la tasa de decaimiento de las muestras y del blanco se restó la tasa de decaimiento del blanco a la tasa de decaimiento de las muestras.

Para el cálculo de la A. GR, se utilizó el coeficiente de extinción molar del NADPH y la ecuación 9 y para calcular la actividad enzimática específica también se midió la concentración de proteína soluble por el método de Bradford.

$$ActividadGR = \frac{\Delta A_{340} / \text{min}}{0.00373 \mu M^{-1}} \times \frac{0.19 mL}{0.02 mL} = nmol / \text{min} / mL \quad (9)$$

7.18.4 Actividad Catalasa-Peroxidasa (CPs)

La Catalasa-Peroxidasa están involucradas en el mecanismo de defensa contra ERO que catalizan la reacción representada en la Figura 12, para medir la actividad de esta enzima antioxidante se utilizó un Kit comercial (Cayman Chemical) el cual utiliza como principio la reacción de la catalasa con metanol en presencia de H_2O_2 , la cual produce formaldehído (Johansson y Håkan Borg, 1988). Este formaldehído puede detectarse a 540 nm cuando reacciona con Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) como cromógeno en condiciones alcalinas a temperatura ambiente, donde el formaldehído se oxida por la adición de H_2O_2 y peryodato de potasio, los cambios de oxidación provocan el desarrollo del color por este cromógeno (Quesenberry y Lee, 1996).

**Figura 12.** Reacción catalizada por la Catalasa Peroxidasa

Las muestras liofilizadas de los ECE extraídos de los conidios obtenidos bajo diferentes condiciones oxidantes, se reconstituyeron con 50 μL de solución amortiguadora de muestra que contenía fosfato de potasio 25 mM (pH 7.5), EDTA 1mM y albúmina sérica bovina (1 %). Por instrucciones de fabricante se inició la reacción agregando H_2O_2 (0.035 M), se incubó por 20 min a temperatura ambiente, para que el formaldehído desarrollado por la catalasa peroxidasa fuera detectable, se agregó Hidróxido de Potasio (10 M) y Purpald y se dejó reaccionar por 10 min, posteriormente se agregó peryodato de potasio y se dejó reaccionar por 5 minutos, pasado este tiempo se leyó la absorbancia de las soluciones diluidas del estándar de formaldehído y las muestras de los ECE a 540 nm en un lector de microplacas (Biotex, ELx808) a 25 °C. La mezcla de reacción final puede verse en la Tabla 10.

Tabla 10. Mezcla de reacción para determinar Actividad Catalasa Peroxidasa

Reactivo	Cantidad
Solución amortiguadora de ensayo 1X	100 μL
Metanol	30 μL
Muestra /control positivo	20 μL
Peróxido de Hidrógeno	20 μL
Hidróxido de Potasio	30 μL
Purpald	30 μL
Peryodato de potasio	10 μL

Se realizó una curva estándar con 7 diluciones de una solución estándar de formaldehído (se presentan en el Anexo I), los resultados de las absorbancias de estas diluciones se ajustaron a un modelo lineal (ecuación 10) cuya ecuación permitió interpolar las absorbancias de los ECE y conocer la concentración de formaldehído que había producido, para calcular la actividad catalasa peroxidasa se utilizó la ecuación 11, donde una unidad se definió como la cantidad de enzima que causa la formación de 1.0 nmol de formaldehído por minuto a 25 ° C. Para calcular la actividad enzimática específica se midió la concentración de proteína soluble por el método de Bradford.

$$[\text{Formaldehído}] = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}} - 0.2411}{0.0079} = \mu\text{M} \quad (10)$$

$$\text{ActividadCPS} = \frac{\mu\text{M}_{\text{formaldehído.producido}}}{20\text{min}} / \text{factordeconcentración} = \text{nmol} / \text{min} / \text{mL} \quad (11)$$

7.18.5 Actividad superóxido dismutasa (SOD)

Se midió la actividad SOD en el ECE de los conidios obtenidos bajo atmósferas modificadas o atmósfera normal (16, 21, 30, 40 % O₂), esta enzima cataliza (Figura 13) la dismutación de dos moléculas de anión superóxido (O₂^{•-}) en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno (Michiels et al., 1994). También se midió la actividad con un Kit comercial (Cayman chemical) el cual emplea como principio la formación del anión superóxido por la xantina oxidasa y la reducción de una sal de tetrazolio a formazán generando una reacción colorida detectable a 415 nm (Figura 14), esta reacción es inhibida por la superóxido dismutasa, por lo tanto la técnica para la determinación de A. SOD se basa en la disminución de la detección del formazán en presencia de la enzima SOD ya que esta elimina el superóxido. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que causa el 50 % de dismutación del radical superóxido (Peskin y Winterbourn, 2000).



Figura 13. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa

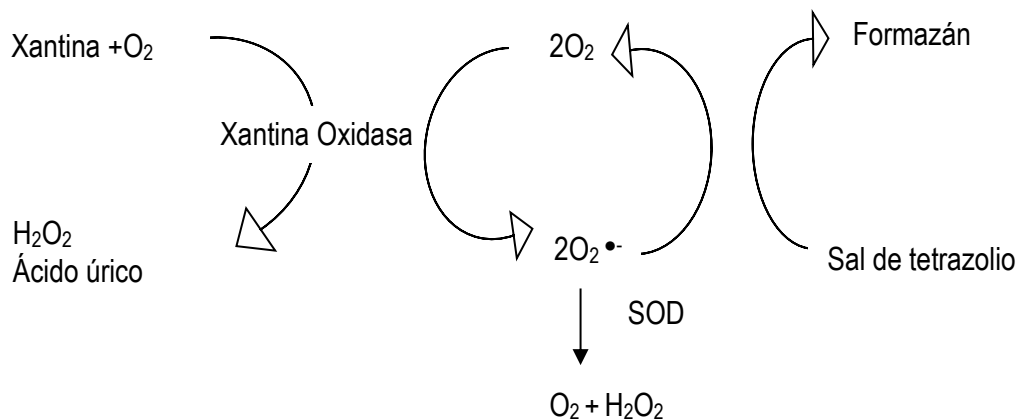


Figura 14. Esquema del fundamento del ensayo para medir actividad superóxido dismutasa

En el caso de la A. SOD, a diferencia del resto de las actividades enzimáticas medidas en este trabajo, los ECE para esta enzima no se concentraron por liofilización debido a que caían dentro del rango dinámico de detección del kit (0.025-0.25 U/mL). Para medir la A. SOD, se preparó una curva estándar con 7 diluciones de SOD de eritrocitos bovinos (se presentan en el Anexo I) la cual se diluyó con

solución amortiguadora de muestra la cual contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8). Al mismo tiempo se preparó la solución con xantina oxidasa con solución amortiguadora de ensayo la cual contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8) y de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 0.1 mM. Finalmente se preparó la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla 11 y la reacción se inició al agregar la solución con Xantina Oxidasa, después de 20 min de reacción la absorbancia se midió a 415 nm en un lector de microplacas (Biotex, ELx808) a 25 °C, en las celdas que no contenían enzima (blanco) el volumen de la muestra se sustituyó por solución amortiguadora de muestra.

Tabla 11. Mezcla de reacción para determinar actividad SOD.

Reactivo	Cantidad
Solución de sal de tetrazolio	200 µL
Muestra o estándar	10 µL
Solución de Xantina oxidasa	20 µL

Una vez que se obtuvo la absorbancia de la enzima estándar y de las diluciones, se dividió la absorbancia del blanco entre sí mismo y entre la absorbancia de los estándares (y las muestras) para obtener una gráfica de tasa linealizada (TL) contra actividad enzimática (U/mL). Los resultados de la absorbancia de los estándares diluidos se ajustaron a una modelo lineal cuya ecuación permitió interpolar la A. SOD de las muestras (ecuación 12), la curva estándar se encuentra en el Anexo I.

$$\text{Actividad SOD} = \frac{TL - 1.0782}{12.213} = U / mL \quad (12)$$

Al mismo tiempo se midió la concentración de proteína soluble por el método de Bradford, como se describe en la sección 6.10, finalmente la actividad SOD se reportó como U /mg de proteína.

7.19 Análisis estadístico

La comparación de medias se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) o pruebas de *t* (de student). La comparación múltiple de medias se realizó utilizando la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia (α) de 0.05. Las curvas estándar que se presentan en el Anexo I, se realizaron al menos por duplicado y en todos los casos los coeficientes de regresión fueron mayores de 0.9.

Para determinar la correlación de los parámetros de calidad con la actividad de las enzimas antioxidantes, se utilizó el método estadístico conocido como análisis de componentes principales, en el cual se transforman las variables originales en componentes principales (variables sintéticas) que son funciones lineales de las variables originales (Ramette, 2007). El primer componente principal (CP 1) representa la mayor porción de variabilidad de los datos, la cual desciende en los componentes restantes CP2, CP3, etc.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS versión 18 y excepto el análisis de componentes principales que se realizó en el software Statgraphics centurión XVI versión 16.1.03.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

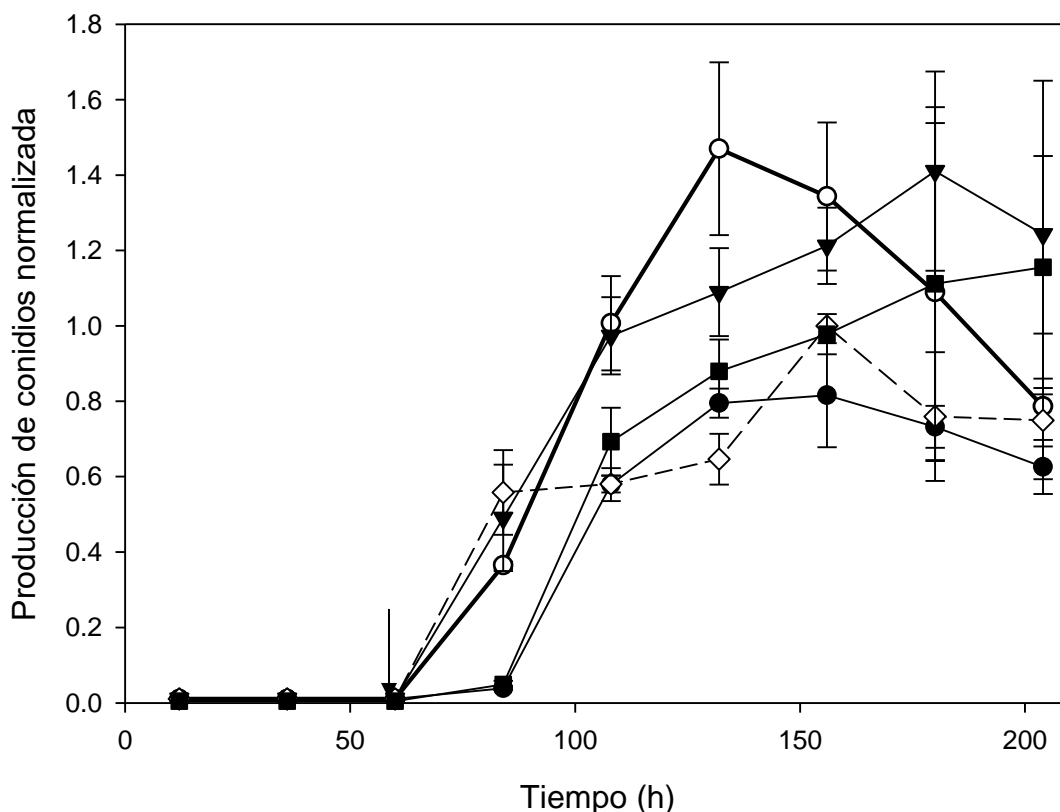
8.1 Producción de conidios

En una etapa anterior a esta investigación (García Ortiz, 2012), se estudió el efecto de distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera en la que se cultivó *M. anisopliae* (16, 21, 26 y 30 % O₂) sobre la producción de conidios de este hongo entomopatógeno, aplicando la concentración de oxígeno a probar desde las 60 h y con recambios de la atmósfera cada 24 h, gracias a ese trabajo, sabíamos que una concentración de 16 % de O₂, no afectó la producción de conidios ($p > 0.05$), comparado con la atmósfera normal (21 %). Por otro lado, las atmósferas ricas en O₂ (26 y 30 %), provocaron un incremento en la producción de conidios ($p < 0.05$), tanto, que la aplicación de pulsos de 26 % de O₂ consiguió elevar en 86 % la cantidad de conidios a las 180h; por su parte con 30% de O₂, se logró una mejoría del 120 % después de tan sólo 132h de cultivo, lo cual significa que se mejoró la productividad de conidios con respecto a la atmósfera normal, ya que se produjo un rendimiento similar en menor tiempo (48 h menos). Era notable que las concentraciones de oxígeno más altas que la concentración de oxígeno normal, provocaron cambios favorables en la producción de conidios, así que resultó interesante conocer si este efecto se podía presentar al incrementar la concentración de oxígeno arriba de 30 %, por lo tanto en el presente trabajo se incluyó el efecto de una concentración aún más elevada de oxígeno (40 % O₂) sobre la producción de conidios de *M. anisopliae*. En la Gráfica 1 se presenta la producción de conidios normalizada contra el tiempo.

Como habíamos mencionado, incrementar la concentración de oxígeno (26 y 30 % O₂) provocó cambios favorables en la producción de conidios con respecto a la atmósfera normal, en contraste, la producción de conidios no mejoró por la aplicación de una concentración de oxígeno más elevada (40 %) de hecho no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) a lo largo de toda la cinética, con respecto al control (21 % O₂).

Comparando la producción de conidios bajo todas las concentraciones de oxígeno probadas (16, 21, 26, 30 y 40 % O₂), la producción de conidios más alta se obtuvo a las 132 h por lo tanto se decidió que las siguientes pruebas se llevarían a cabo utilizando los conidios obtenidos en este punto específico, con el objetivo de determinar la calidad de los conidios y en la búsqueda de una posible explicación

de este fenómeno, la proteína total de los conidios también fue evaluada en este punto con un enfoque proteómico.



Gráfica 1. Cinética de producción de conidios con pulsos de 16 % (●); 21 % (◇, línea punteada); 26 % (▼); 30 % (○, línea negra intensa) y 40 % (■) de O₂ en la atmósfera del cultivo de *M. anisopliae*. La flecha indica el tiempo en que se inició el cambio atmosférico.

La aplicación de atmósferas modificadas a cultivos de *M. anisopliae* para obtener altas producciones de conidios fue propuesto originalmente por Tlecuitl-Beristain et al. (2010). En este trabajo la producción y/o productividad de conidios se mejoró significativamente por atmósferas ricas en oxígeno (26 y 30 % O₂), por su parte, algunos autores han estudiado atmósferas ricas en oxígeno (>70 %) para incrementar la vida media de vegetales, en estos casos el oxígeno se utilizó con el objetivo de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Amanatidou et al., 1999, 2000; Jacxsens et al., 2001). La aplicación de atmósferas oxidantes durante el crecimiento de hongos entomopatógenos puede afectar la producción de conidios dependiendo de la cepa, mostrando diferencia entre cepas de la misma especie. Similarmente a *M. anisopliae*, *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 incrementa la producción de conidios de 3.38×10^7 a 1.68×10^8 con / cm² cuando se expone a una atmósfera conteniendo 26 % O₂ (Miranda-Hernández et al., 2014). En contraste, la producción de conidios de *Beauveria bassiana*

no se afectó por este tipo de tratamiento, incluso la calidad de los conidios producidos disminuyó debido al estrés oxidante inducido por la atmósfera rica en oxígeno (Garza-López et al., 2012).

En el presente trabajo, la producción de conidios de *M. anisopliae* no se afectó por la aplicación de una atmósfera conteniendo 40 % de O₂, ya que no fue significativamente diferente de la producción de conidios bajo atmósfera normal. La producción de esporas de *Botrytis cinerea* puede afectarse negativamente por la aplicación de una alta concentración de oxígeno (80-95 %) resultando en el decremento de la producción de 1.4 X10⁶ a 4.5 X 10⁵ esporas/ mL (Jacxsens et al., 2001). Los hongos crecidos en hojas de tabaco incrementaron su crecimiento radial cuando se exponen a altas concentraciones de oxígeno (hasta 40 %) (Yang y Lucas, 1970).

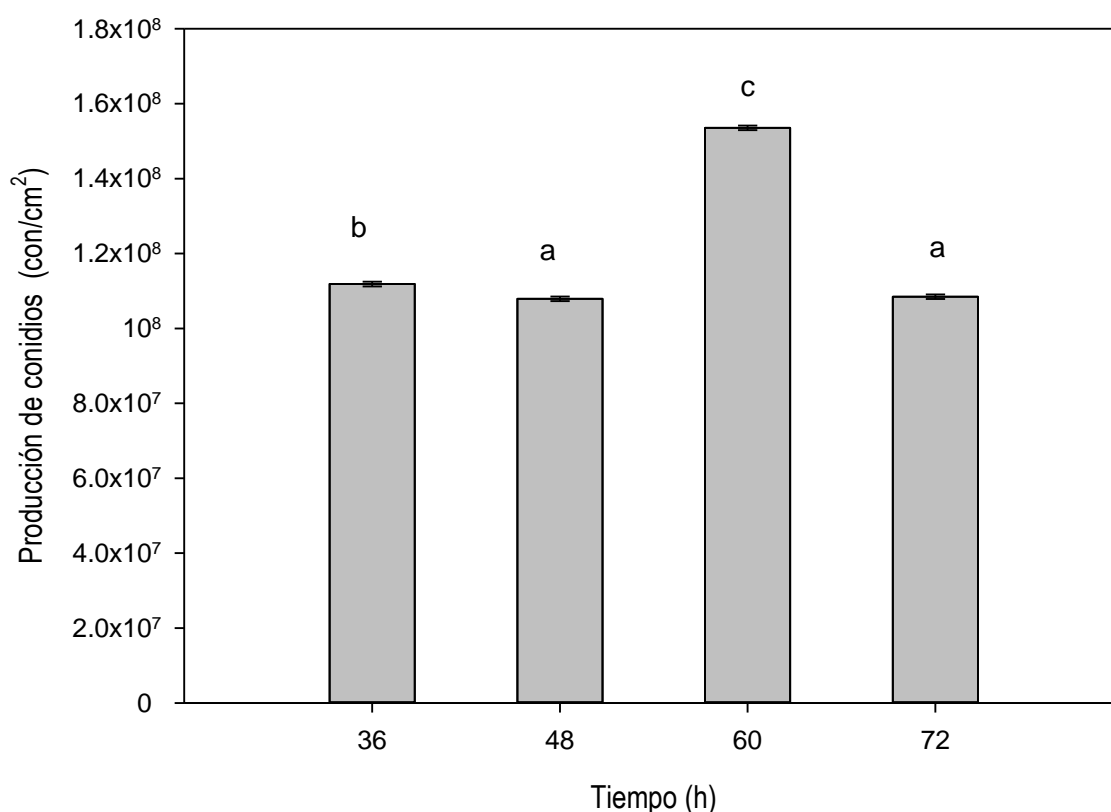
El hecho de que *M. anisopliae* puede tolerar los pulsos con concentraciones altas de oxígeno, después de las 60 h de cultivo en etapa de la investigación, sugirió que este hongo ha desarrollado mecanismos de protección contra un posible estrés oxidante, como: catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa (Garza-López et al., 2012; Amanatidou et al., 1999) cuya actividad en conidios de *M. anisopliae* se discutirán en la sección 8.7. Similarmente, cuando *Saccharomyces cerevisiae* fue expuesto a 100 % de O₂ (hiperoxia), desarrolló numerosos factores de respuesta al estrés, incluyendo aquellos involucrados en la defensa antioxidante, choque térmico, reparación del daño a ADN y proteínas (Outten et al., 2005).

8.2 Tiempo crítico de respuesta a pulsos de oxígeno

De acuerdo con los resultados mostrados en la sección anterior, la aplicación de pulsos con una atmósfera modificada con 30 % de O₂ mejoró la producción y productividad de conidios; la aplicación de estos pulsos se inició después de 60h de incubación de *M. anisopliae* bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂). Con la finalidad de determinar si la respuesta al O₂ depende del estado fisiológico del hongo al momento de la aplicación del primer pulso de oxígeno, se aplicaron pulsos de O₂ (30 %) iniciando a diferentes tiempos: 36, 48 y 72 h, además de las 60 h cuyo efecto ya se conocía.

Se estimó la producción máxima de conidios (C_{max}) ajustando el modelo de Gompertz (Zwietering et al., 1990) a los datos obtenidos durante las cinéticas de crecimiento de *M. anisopliae* (Gráfica 2), el modelo fue capaz de explicar el 99 % de los datos ($R^2 \geq 0.99$). La máxima producción de conidios que se obtuvo aplicando el primer pulso de oxígeno a las 36 h fue de $1.1 \times 10^8 \pm 6.2 \times 10^5$ con/cm², cuando el primer pulso se aplicó a las 48 o 72 h de incubación, la producción de conidios disminuyó

3.7 % en ambos casos, en contraste, bajo las mismas condiciones de cultivo, la aplicación del primer pulso a las 60 h causó un incremento de 40 % ($p < 0.05$) en la producción de conidios, en comparación con la producción registrada aplicando el primer pulso a las 36 h. Estos resultados muestran que la respuesta de *M. anisopliae* a una atmósfera oxidante (30 % O₂) depende de un punto específico de tiempo al cual se aplica el primer pulso de oxígeno, ya que la producción de conidios no mejoró cuando el primer pulso, se aplicó antes o después de las 60 h, es decir, el micelio alcanza un estado de “competencia” para responder a la atmósfera oxidante a las 60h de cultivo. Por lo tanto, la mejora de la producción de conidios depende del estado fisiológico del hongo en el momento en que el primer recambio atmosférico se lleva a cabo.



Gráfica 2. Producción máxima de conidios (Cmax) en función del tiempo en que se aplicó el primer recambio atmosférico conteniendo 30 % de O₂ (■).

El hecho de que la producción de conidios se afectó positivamente, sólo si los pulsos de oxígeno iniciaron después de 60h de crecimiento bajo atmósfera normal, sugiere un papel fisiológico del micelio en respuesta a la atmósfera oxidante; por lo tanto, con la finalidad de obtener una respuesta positiva a la presencia de altas concentraciones de oxígeno es necesario contar con una biomasa de hongos “competente” antes de la primera aplicación del pulso de oxígeno. Esta respuesta positiva consistió

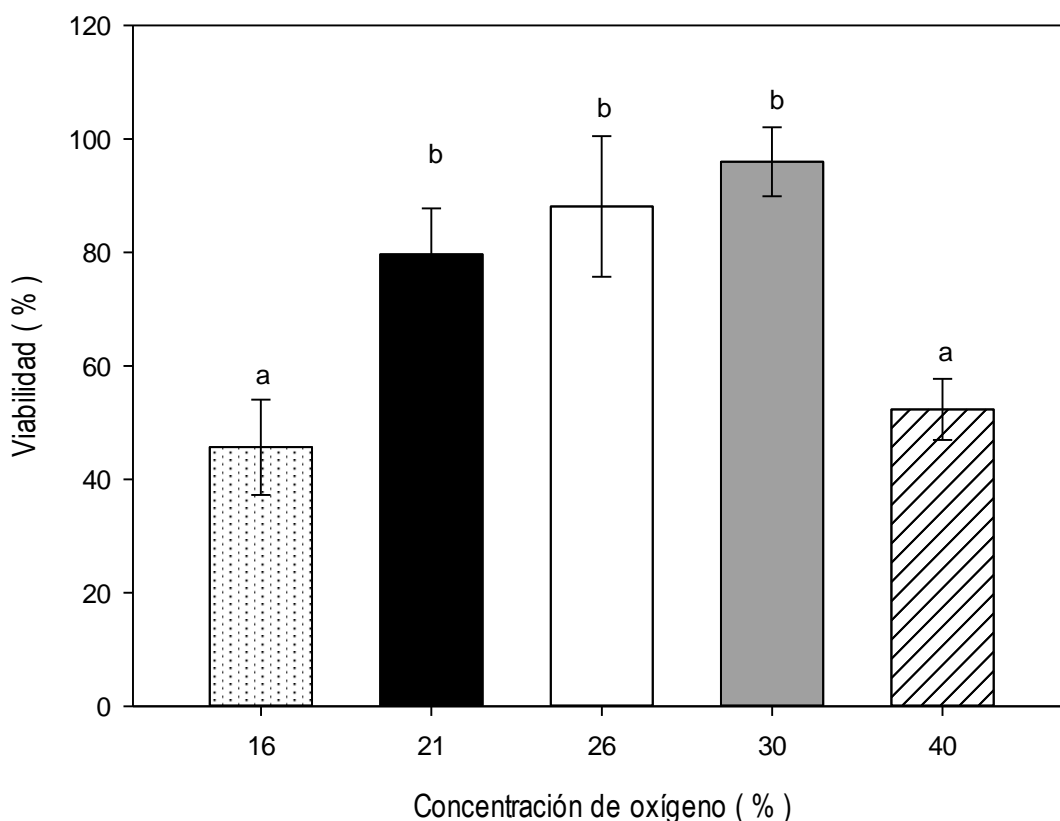
en el aumento de la producción de conidios (sección 8.1) cuya calidad e infectividad se discutirá en la sección 8.3. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se reporta un periodo crítico de respuesta, para un efecto positivo en la conidiación de *M. anisopliae*, aplicando atmósferas oxidantes. Sin embargo, otros factores pueden desencadenar los procesos de conidiación cuando se aplican a un periodo específico del cultivo del hongo (Sanchez-Murillo et al., 2004; Zhang et al., 2009). Sanchez-Murillo et al. (2004) trabajando con una cepa de *I. fumosorosea* encontró que la conidiación se puede mejorar por fotoinducción con pulsos de luz azul, sólo si estos pulsos se aplican en un micelio competente al menos a las 72 h creciendo en oscuridad, antes de este tiempo crítico la luz azul no induce la conidiación. Por lo tanto, es posible que en nuestro trabajo los pulsos de oxígeno jueguen un papel como un inductor de la conidiación de manera similar como lo hace la luz azul. Incluso algunos autores han observado que una hifa de *N. crassa* que está expuesta directamente al aire puede desarrollar un estado hiperoxidante, este estado se caracteriza por un incremento de ERO. Algunos reportes previos sugieren que los mecanismos de diferenciación celular se desencadenan por procesos diseñados para evitar un desequilibrio oxidante en la célula (Aguirre et al., 2005; Toledo et al, 1994).






8.3 Pruebas de calidad

8.3.1 Viabilidad

En este trabajo, se llevaron a cabo cuatro importantes pruebas de calidad de conidios, entre ellas, la viabilidad y la hidrofobicidad. El trabajo que antecedió a este (García Ortiz, 2012) permitió conocer la viabilidad (%) de los conidios obtenidos con 16, 21, 26 y 30 % O₂, hasta ese momento se sabía que la viabilidad de los conidios obtenidos bajo atmósfera normal era de 79.6 % ± 8.1 %. Ahora, con una atmósfera aún más oxidante (40 % O₂), se encontró que la producción de conidios no mejoró con respecto a la atmósfera normal (Gráfica 3), pero aún era desconocido qué sucedía con los conidios en cuanto a calidad. Se observó que la viabilidad registrada para los conidios producidos bajo condiciones oxidantes extremas (16 y 40 % O₂) fueron significativamente ($p < 0.05$) más bajas, exhibiendo valores de 45.6 ± 8.4 y 52.3 ± 5.3%, respectivamente, frente a una viabilidad del 79.6 ± 8 % de los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂). Por el contrario, la viabilidad de los conidios producidos bajo las atmósferas 26 y 30 % O₂ no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) de aquellas que se registraron para los conidios producidos bajo atmósfera normal, la viabilidades registradas fueron 88.1 ± 12.4 y 96 ± 6.1 %, respectivamente. Estos resultados

son favorables debido a que la producción de conidios más alta también se obtuvo por la aplicación de la atmósfera modificada con 30 % O₂, como se mostró en la sección 8.1.



Gráfica 3. Porcentaje de viabilidad de conidios de *M. anisopliae* (promedio \pm desviación estándar) producidos bajo atmósferas modificadas conteniendo diferentes concentraciones de oxígeno (16 % , 21 % , 26 % , 30 %  y 40% ). Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Prueba de Tukey $p < 0.05$)

Respecto a la calidad de los conidios, la viabilidad es uno de las pruebas de calidad más importantes. De acuerdo con Jenkins y Grzywacz, (2000), con el objetivo de garantizar la calidad del lote de conidios, la viabilidad del producto, medido como conidios germinados, debe ser mayor al 80 %, sin embargo, en este trabajo, la viabilidad se midió en términos de UFC, mostrando no sólo los conidios germinados sino aquellos que son capaces de formar una colonia. Los conidios que cumplieron con dicho criterio son aquellos obtenidos con 21, 26 y 30 % O₂.

El decremento en la calidad, específicamente en la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* producidos bajo condiciones oxidantes extremas (16 o 40 % O₂), sugiere que el hongo ha sufrido un tipo de daño debido al propio oxígeno o debido a la formación de ERO. Las ERO pueden dañar diferentes macromoléculas que conducen a múltiples alteraciones metabólicas, incluyendo inhibición

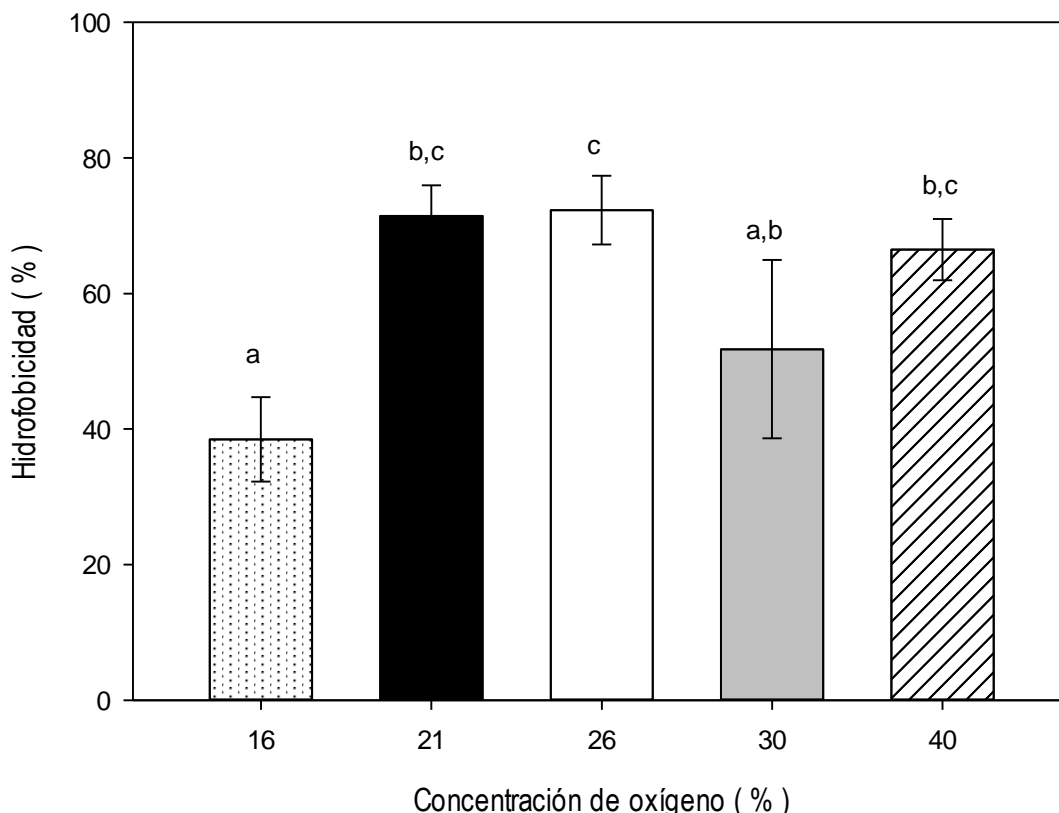
del crecimiento y posiblemente un desequilibrio oxidante en la célula (Amanatidou et al., 1999), este efecto se ha observado en cultivos de *B. bassiana* expuestos a 16 % O₂ (Garza-López et al., 2012).






8.3.2 Hidrofobicidad

La cutícula de los insectos es la primera línea de defensa contra la infección por contacto de hongos entomopatógenos. La epicutícula es la capa más externa y está cubierta por hidrocarburos de cadena larga y una variedad de lípidos (Juárez y Fernández, 2007) la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto es importante en los primeros pasos del ciclo infectivo y se atribuye a interacciones de proteínas tipo hidrofobinas de bajo peso molecular (Jeffs et al, 1999), por lo tanto es un parámetro de calidad importante a considerar en los lotes de conidios producidos.

Respecto a la hidrofobicidad, en esta investigación se encontró que los conidios producidos bajo condiciones hipóxicas (16 % O₂) o bajo atmósfera conteniendo 30 % O₂ mostraron la hidrofobicidad más baja (38.4 ± 6.2 %) ($p < 0.05$). Los conidios producidos bajo atmósfera normal mostraron un valor de hidrofobicidad del 71.4 ± 4.5 %, y no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) con aquellos valores registrados para los conidios producidos por la aplicación de atmósferas conteniendo 26 y 40 % O₂, cuyos valores fueron 72.3 ± 5.1 y 66.5 ± 4.5 %, respectivamente (Gráfica 4). Estos resultados están de acuerdo con lo obtenido por Tlecuitl-Beristain et al. (2010), donde no se reportaron diferencias entre la hidrofobicidad de los conidios producidos bajo condiciones atmosféricas normales y aquellos obtenidos bajo una atmósfera conteniendo 26 % O₂.

En el caso de *B. bassiana*, los conidios cultivados sobre arroz bajo atmósfera enriquecida (26 % O₂) disminuyeron su hidrofobicidad en un 20 % comparado con la atmósfera normal, por el contrario a lo encontrado en la presente investigación, los autores reportaron que la atmósfera modificada conteniendo 16 % O₂ no decrementó la hidrofobicidad de los conidios, comparado con los conidios obtenidos en condiciones atmosféricas normales (Pérez-Guzmán et al., 2016).



Gráfica 4. Hidrofobicidad de conidios de *M. anisopliae* (promedio \pm desviación estándar) producidos bajo atmósferas modificadas conteniendo diferentes concentraciones de oxígeno (16 % , 21 % , 26 % , 30 %  y 40 % ). Barras con diferente letra indican diferencias estadísticas significativas (Prueba de Tukey $p < 0.05$).

Es importante recordar que aunque la hidrofobicidad es crítica para la adhesión del conidio al insecto, la infección es un fenómeno multifactorial que depende además de la adhesión, de otros factores como la capacidad del hongo para producir una combinación de enzimas hidrolíticas y que pueda superar la respuesta inmune por parte del insecto (Khachatourians, 1996); de manera que aunque la hidrofobicidad se considera un parámetro de calidad, no hay una correlación directa entre la adhesión y la infectividad del conidio (Montesinos-Matías et al., 2011b) por ejemplo como se puede ver en la Tabla 13 de la sección 8.3.4, a pesar de que la hidrofobicidad de los conidios obtenidos con 40 % O_2 no difiere ($p > 0.05$) de los conidios obtenidos con atmósfera normal, estos no lograron matar al 50 % de larvas de *T. molitor*.

8.3.3 Termotolerancia

La temperatura es uno de los factores que afectan la sobrevivencia de los conidios durante su almacenaje, transporte y aplicación en campo (Faria et al, 2012), asimismo algunos insectos son capaces de elevar su temperatura corporal, como una forma de hacer frente a la infección fúngica (Inglis et al., 1996; Blanford y Thomas, 2000). Por lo tanto, es deseable que los conidios muestren una alta termotolerancia. Los conidios producidos por *M. anisopliae* bajo las distintas atmósferas modificadas se expusieron a 45 ± 1 °C en un baño de temperatura controlada, los datos experimentales se ajustaron al modelo propuesto por Miranda-Hernández et al. (2014), mostrando un grado de ajuste elevado ($R^2 \geq 0.95$). La tasa específica de decaimiento (k') cambió significativamente ($p < 0.05$) entre los conidios obtenidos de los diferentes tratamientos (Tabla 12). Los valores de k' para los conidios producidos bajo atmósfera normal fue 0.95 ± 0.07 h⁻¹ y no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) al valor obtenido por los conidios producidos bajo la atmósfera conteniendo 26 % O₂ ($k'=0.95 \pm 0.04$ h⁻¹).

Tabla 12. Parámetros de termotolerancia de los conidios de *M. anisopliae* obtenidos de los diferentes tratamientos con O₂, expuestos a 45 ± 1 °C. Las letras indican los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

O ₂ (%)	k' (h ⁻¹)	TS ₅₀ (h)
16	0.79 ± 0.02 b	0.87 ± 0.02 a,b
21	0.95 ± 0.07 c	0.76 ± 0.03 a
26	0.95 ± 0.04 c	0.79 ± 0.05 a
30	0.57 ± 0.02 a	1.21 ± 0.04 c
40	0.82 ± 0.04 b	0.92 ± 0.05 b

Donde k' es la tasa específica de decaimiento en la viabilidad y TS₅₀ es el tiempo al cual el 50 % de los conidios iniciales que aún son viables.

Diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos con diferente concentración de oxígeno, para cada parámetro (prueba de Tukey $p < 0.05$).

Es importante resaltar que los conidios producidos bajo las atmósferas modificadas conteniendo 16, 30 o 40 % O₂ mostraron valores de k' significativamente más bajos ($p < 0.05$) que los producidos bajo atmósfera normal, de estos, los conidios obtenidos con la atmósfera con 30 % O₂ mostraron termotolerancia más alta ($p < 0.05$), debido a que su tasa de decaimiento de viabilidad (0.57 ± 0.02 h⁻¹) fue 66.6 % más lenta en comparación con los conidios obtenidos con atmósfera normal. Por otro lado, el TS₅₀ fue de 0.76 h para los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales, este

valor se incrementó a 1.21 h cuando los conidios se obtuvieron con 30 % de O₂, del mismo modo, el TS₅₀ de los conidios incrementó un 20 % cuando los conidios se obtuvieron con 40 % O₂.

Los resultados encontrados en esta investigación mostraron que la aplicación de atmósferas modificadas, conteniendo altas concentraciones de oxígeno (30 o 40 % O₂), mejoran la termotolerancia de los conidios producidos. De hecho, los valores de TS₅₀ de los conidios provenientes de 30 % O₂ fueron significativamente más altos ($p < 0.05$) que para otros tratamientos. Estos resultados podrían explicarse por la acumulación de trehalosa, ya que se sabe que este disacárido protege a las células contra altas temperaturas (Abrashev et al., 2008); adicionalmente, las células mutantes que son incapaces de acumular trehalosa, también son incapaces de desarrollar termotolerancia cuando son expuestos a altas temperaturas (Mensonides et al, 2005). En el caso de *M. anisopliae*, se incrementó el doble la concentración de trehalosa en los conidios que fueron cultivados bajo una atmósfera enriquecida (26 % O₂) respecto a los conidios obtenidos con atmósfera normal aunque otro soluto compatible, el manitol, disminuyó más del 80 % su concentración bajo las mismas condiciones (Miranda Hernández, 2014), con base en esto, es posible decir que la trehalosa podría ser el soluto compatible que este contribuyendo a mejorar la termotolerancia de los conidios de *M. anisopliae*, aunque algunos resultados recientes reportados por Garza-López et al. (2015) mostraron que en conidios de *B. bassiana*, obtenidos con una atmósfera rica en oxígeno (26 % O₂), disminuyó un 75 % la concentración de trehalosa con respecto a los conidios producidos bajo una atmósfera normal y de hecho, los conidios más afectados en su concentración de trehalosa fueron aquellos obtenidos con 16 % O₂, ya que el disacárido no se detectó durante el estudio, asimismo los autores reportaron que se incrementó la concentración manitol hasta 100 % en conidios cultivados bajo atmósferas modificadas (16 y 26 % O₂) con respecto a la atmósfera normal.

La exposición de bacterias o micelio de hongos a un tipo específico de estrés ambiental puede promover el desarrollo de tolerancia contra otros tipos de estrés, este fenómeno se conoce como protección cruzada (Rangel, 2011), se ha descrito para los conidios de dos cepas de *I. fumosorosea* que fueron expuestos a una atmósfera rica en oxígeno (26 %) y posteriormente a altas temperaturas (38 y 40 ° C), estos incrementaron por lo menos 1.5 veces el tiempo al cual el 50 % de los conidios aún es viable (TS₅₀) (Miranda-Hernández et al., 2014). En el presente trabajo se observó que las concentraciones elevadas de oxígeno (30 o 40 % O₂) mejoraron la termotolerancia de los conidios, estos resultados sugieren que los conidios obtenidos con atmósferas modificadas ricas en oxígeno

estaban adaptados a altas concentraciones de ERO, de modo que pudieron desarrollar un mecanismo para enfrentar estrés oxidante, esto les permitió desarrollar una protección cruzada, ya que estos conidios enfrentaron una tensión similar al estar expuestos a la elevada temperatura, esto se sustenta con la información reportada por Abrashev et al. (2008) donde indican que la elevación de la temperatura en células de *Aspergillus niger* incrementó significativamente los niveles de ERO, entre ellas el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.

8.3.4 Infectividad

Con el objetivo de describir los perfiles de mortalidad de larvas de *T. molitor* infectadas con los conidios producidos bajo distintas atmósferas modificadas, y para calcular los correspondientes parámetros de infectividad, los resultados obtenidos durante los bioensayos se ajustaron al modelo propuesto por Rodríguez-Gómez et al. (2009). Los resultados mostraron un alto grado de ajuste a el modelo ($R^2 \geq 0.91$), los parámetros de infectividad se presentan en la Tabla 13. Estos resultados muestran que sólo los conidios obtenidos bajo una atmósfera conteniendo 21, 26 o 30% de oxígeno infectan y matan a más del 50 % de los insectos, obteniéndose sobrevivencias de insectos de 22.27, 30.44 y 7.6 % respectivamente, de hecho no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la sobrevivencia de los insectos infectados con conidios obtenidos 21 o 26 de oxígeno, por otro lado los conidios cultivados bajo una atmósfera conteniendo 30% O_2 presentaron el menor porcentaje de sobrevivencia de insectos, por lo que en este parámetro, 30% O_2 fue la condición que propició la obtención de conidios más virulentos.

Por otra parte, no se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de TL_{50} , para los conidios obtenidos bajo atmósfera normal y aquellas atmósferas que contenían 26 o 30 % O_2 , como lo reportó Tlecuitl-Beristain et al., (2010). Sin embargo, los conidios obtenidos con los valores extremos de oxígeno (16 % y 40 % O_2) significativamente decrementaron la infectividad ($p < 0.05$); de hecho, estos conidios no fueron capaces de infectar el 50 % de los insectos durante el tiempo del bioensayo, lo cual corresponde con la elevada sobrevivencia de insectos encontrada bajo estas dos condiciones, 52.2 y 82.2 % respectivamente.

Además del TL_{50} , otro importante parámetro de infectividad es el tiempo de la aparición del primer insecto muerto (t_0). Con respecto a este parámetro, los conidios producidos bajo la atmósfera más oxidante (40 % O_2) mostró la más baja capacidad de infectar larvas de *T. molitor*, el valor estimado de

t_0 para estos conidios incrementó el doble ($p < 0.05$) con respecto a los conidios obtenidos bajo atmósfera normal y mostró la mayor sobrevivencia de insectos ($p < 0.05$). En términos de la tasa específica de muerte (k), no se encontraron diferencias entre tratamientos, mostrando que después de la infección todos los conidios fueron capaces de matar a las larvas a una tasa similar.

Tabla 13. Parámetros de infectividad de conidios de *M. anisopliae* obtenidos de distintas atmósferas modificadas con larvas de *T. molitor* como hospedero.

O ₂ (%)	k (d ⁻¹)	t_0 (d)	TL ₅₀ (d)	S (%)
16	0.20 ± 0.07 a	4.71 ± 1.56 a	N.A.	52.20 ± 1.30 c
21	0.24 ± 0.10 a	3.49 ± 0.72 a	9.87 ± 1.99 a	22.27 ± 2.29 b
26	0.14 ± 0.08 a	3.69 ± 0.35 a	10.63 ± 1.95 a	30.44 ± 5.01 b
30	0.22 ± 0.07 a	4.14 ± 0.05 a	8.0 ± 1.29 a	7.60 ± 1.32 a
40	0.34 ± 0.07 a	7.32 ± 0.34 b	N.A.	82.20 ± 10.07 d

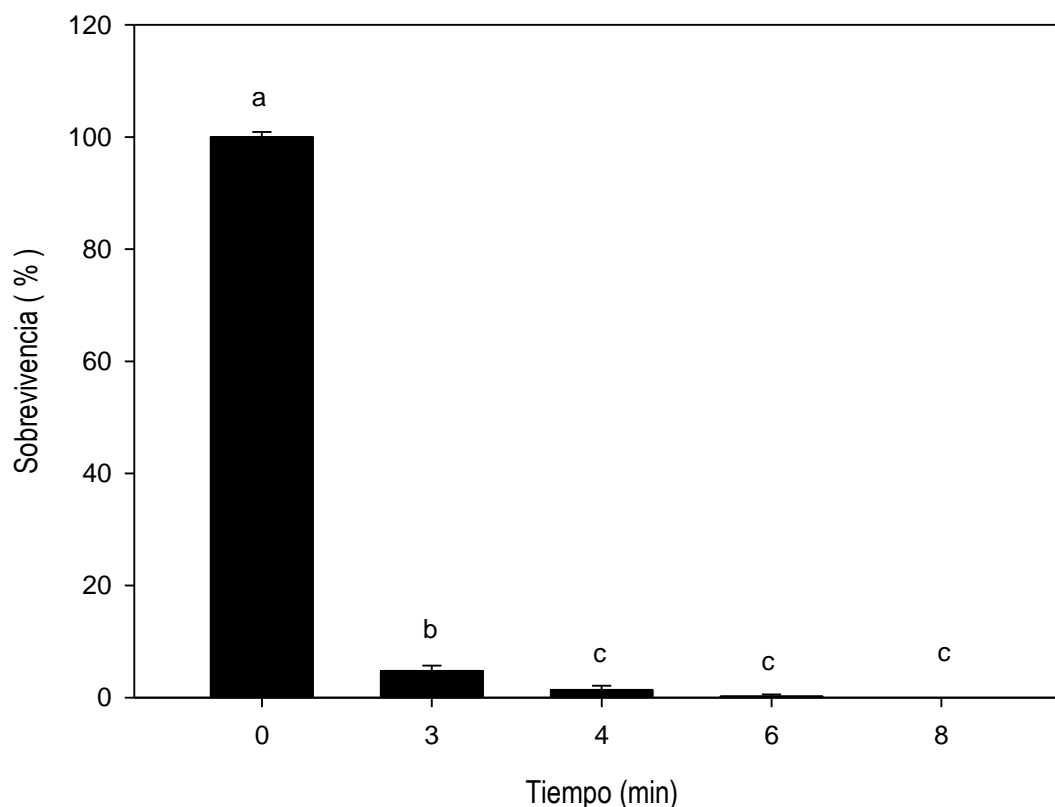
NA, no alcanzado, los conidios no fueron capaces de matar al 50 % de los insectos durante el tiempo del bioensayo. Donde k es la tasa específica de muerte, t_0 es tiempo en que el primer insecto muere TL₅₀ es el tiempo de sobrevivencia 50 y S es la sobrevivencia final. Diferentes letras minúsculas representan diferencias entre los tratamientos con oxígeno para cada parámetro (prueba de Tukey $p < 0.05$).

La baja viabilidad observada para los conidios obtenidos bajo atmósferas conteniendo 16 o 40 % O₂ (sección 8.3.1) podría estar relacionado con la imposibilidad de alcanzar el TL₅₀ y el elevado porcentaje de sobrevivencia de los insectos durante los bioensayos en ambos casos, debido a que la infectividad de los conidios está directamente correlacionada con la viabilidad (Safavi et al., 2007). De acuerdo con (Montesinos-Matías et al., 2011a), la germinación de los conidios en *B. bassiana* está correlacionado positivamente con los parámetros de infectividad contra larvas de *T. molitor*.

En investigaciones recientes se reportó que los conidios de *B. bassiana* obtenidos de una atmósfera pobre en oxígeno (16 % O₂) no lograron matar al 50 % de larvas de *T. molitor*, mientras que el pulso con una atmósfera oxidante (26 % O₂) mejoró el TL₅₀ de 8.6 a 6.4 días, comparado con la atmósfera normal (Pérez-Guzmán et al., 2016). Por otro lado, los conidios de *I. fumosorosea* obtenidos bajo una atmósfera modificada conteniendo 26 % O₂ mostraron un alta infectividad contra larvas de *Galleria melonella* además de que estos conidios desarrollaron mecanismos de protección cruzada contra otros tipos de estrés (Miranda-Hernández et al., 2014).

8.4 Tiempo óptimo para la ruptura de conidios

En este estudio se buscó un método que permitiera extraer las proteínas intracelulares de los conidios de *M. anisopliae*, principalmente debido a que la pared celular de los hongos es especialmente fuerte a la fragmentación, además de que es importante que el método de disrupción del material celular no modifique, o degrade mínimamente, las proteínas que se emplean en el análisis proteómico (Nandakumar y Marten, 2002).



Gráfica 5. Sobrevivencia de conidios a distintos tiempos de rompimiento celular. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada tiempo de ruptura ($p < 0.05$).

Como se describió en las secciones 7.9 y 7.10, los conidios cultivados bajo atmósfera normal se sometieron a diferentes tiempos de rompimiento, en la Gráfica 5 se observa que 95 % de los conidios los conidios que se sometieron a rompimiento con perlas de vidrio en el Mini-Beat-Beater desde los 3 min, no sobrevivieron al proceso, puesto que no formaron una colonia; después de 6 min no sobrevivió el 99 % de los conidios y finalmente a los 8 min no sobrevivió ningún conidio, pero no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre estos últimos tiempos, es por esta razón que se decidió que en lo sucesivo se utilizaría 6 minutos como tiempo de ruptura para los conidios de *M. anisopliae*, tanto

para la extracción de proteína como para la obtención de ECE. Además se corroboró con un microscopio óptico que los conidios estuvieran efectivamente rotos y que por esa razón no pudieran formar una UFC, en la Figura 15 (A) se puede observar los detritos de los conidios después de pasar por 6 min de rompimiento celular, en el centro de la figura se puede ver la mitad de un conidio roto y en contraste en la Figura 15 (B) se observa cómo son los conidios de *M. anisopliae* normalmente.

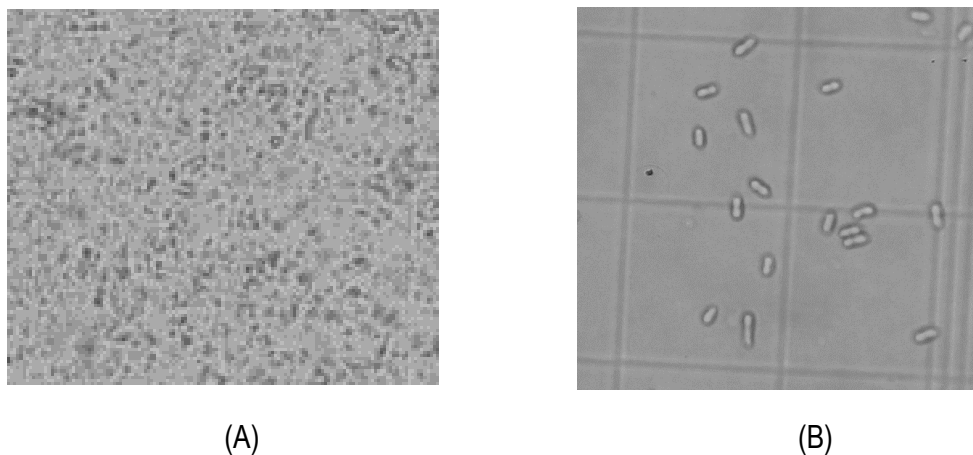


Figura 15. (A) Conidios rotos de *M. anisopliae* después del tratamiento de 6 min con ciclos de 30 s rompimiento 30 s enfriamiento en un Mini-beadbeater 16 (B) Conidios de *M. anisopliae* que no se sometieron a rompimiento.

Nandakumar y Marten (2002) probaron cuatro métodos para extraer proteína de *Aspergillus oryzae* (i. hervir la muestra en un álcali fuerte, ii. hervir la muestra en SDS, iii. Lisis química con un detergente comercial (Y-PER™) y iv. Lisis mecánica por agitación rápida con perlas de vidrio en un Mini-Beat-Beater). Los autores encontraron que la disrupción con perlas de vidrio es el mejor método debido a que fue el más eficiente, además se encontró un elevado número de proteínas tanto de alto como de bajo peso molecular en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones, en esta investigación encontramos que para los conidios de *M. anisopliae* este también fue un método apropiado y se aseguró que se extraía las proteínas intracelulares del 99 % de los conidios.

8.5 Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE,) como un método de control de calidad para la detección de proteínas degradadas (Raynal et al., 2014).

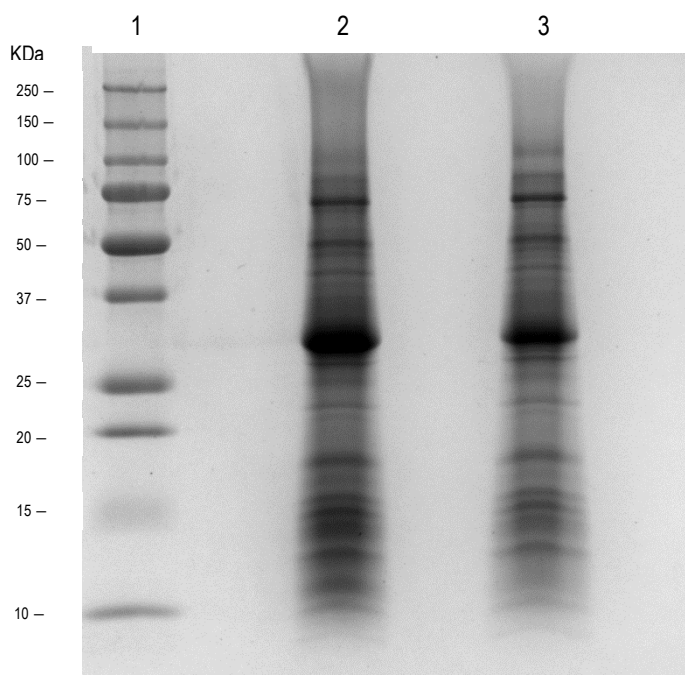


Figura 16. SDS PAGE, carril 1- marcador de peso molecular, carril 2- proteína intracelular de conidios de *M. anisopliae* obtenidos bajo atmósfera normal (21 % O₂), carril 3 -proteína intracelular de conidios de *M. anisopliae* obtenidos bajo atmósfera enriquecida con 30 % O₂

Las muestras conteniendo proteínas que fueron degradadas con diferentes proteasas, tienen un patrón alterado con respecto a las que contenían proteínas sin degradar, observándose sólo manchas difusas de bajo peso molecular en geles (Thomas et al, 2009), debido a la degradación proteolítica, dando lugar a péptidos de bajo peso molecular (Chalabi et al., 2014) . En la Figura 16 en el carril 2 se muestra las proteínas intracelulares obtenidas de conidios de *M. anisopliae* cultivados bajo atmósfera normal (21 % O₂), en el carril 3 las proteínas intracelulares de conidios de *M. anisopliae* cultivados bajo atmósfera enriquecida con 30 % O₂, de acuerdo al marcador de peso molecular (carril 1) se observa, que no se obtuvieron exclusivamente proteínas de bajo peso molecular, lo que indica que las muestras no fueron degradadas durante el proceso de obtención.

8.6 Análisis proteómico de proteínas intracelulares de conidios de *Metarhizium anisopliae* basado en geles 2D SDS PAGE

Con base en el análisis de calidad y producción de conidios de *M. anisopliae*, obtenidos con distintas atmósferas modificadas (16, 26, 30 y 40 % O₂) y con atmósfera normal (21% O₂), presentado en las secciones previas, se observó que una atmósfera conteniendo 30 % O₂, incrementó la producción y productividad de conidios, mejoró la termotolerancia y no afectó a los parámetros de calidad (infectividad, viabilidad e hidrofobicidad). Se decidió buscar con un enfoque proteómico, las proteínas que estaban implicadas en estos resultados, la hipótesis era que identificaríamos sobre todo proteínas relacionadas con una respuesta antioxidante, que permitieran al hongo enfrentar un posible estrés oxidante provocado por una elevada concentración de oxígeno, por estas razones se decidió comparar el proteoma de conidios obtenidos bajo una atmósfera enriquecida en oxígeno (30 % O₂) contra los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21% O₂).

En general para ambos tratamientos el 93.2% de las proteínas detectadas en los geles 2D SDS PAGE se encontró en un pI entre 5 y 7, con pesos moleculares entre 250 y 10 KDa, se detectó un total de 289 manchas proteicas procedentes de los conidios obtenidos con 30 % O₂ y 180 proteínas de la condición normal (21 % O₂), ambas condiciones compartían 147 manchas proteicas, 30 manchas eran exclusivas de los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂) y 142 manchas eran exclusivas de los conidios obtenidos con una atmosfera rica en oxígeno (30 % O₂) (Figura 17). Es decir se encontró que en los conidios obtenidos con 30 % de oxígeno había 60.5 % más manchas proteicas en comparación con los conidios obtenidos bajo atmósfera normal (21% O₂), esto podría relacionarse con el hecho de que el micelio al estar en contacto con una atmósfera más oxidante comparada con la normal, suministra a sus conidios una mayor carga de proteínas que estén listas para enfrentar un ambiente de mayor tensión de modo que al encontrar condiciones adecuadas para germinar, no gaste tiempo y energía en traducir ciertas proteínas, ya que los conidios cuentan con ARNm “preenvasado” que se encuentra listo para ser traducido por los ribosomas para sintetizar las proteínas *de novo* (Lamarre et al., 2008), con lo que los conidios proliferen adecuadamente, de hecho, para sintetizar estas proteínas se requieren entre 4 y 6 h de crecimiento, tiempo después del cual los conidios se han hinchado e incrementan su capacidad de biosíntesis (Suh et al., 2012).

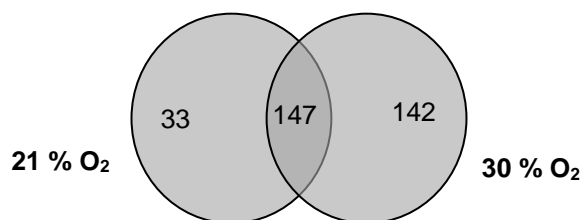


Figura 17. Diagrama de Venn de las manchas proteicas que se identificaron por análisis de imágenes en geles en dos dimensiones.

Una de las mayores diferencias entre estos dos tratamientos fue, como ya se mencionó, que en los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % de O₂) se encontró 60.5 % más manchas proteicas, estas se encontraron sobre todo a un pI alrededor de 5 y con un mayor peso molecular comparado con las proteínas obtenidas con la atmósfera normal, como se puede observar en la Figura 18 encerradas en el recuadro punteado en geles representativos, el resto de las réplicas se pueden encontrar en el Anexo II.

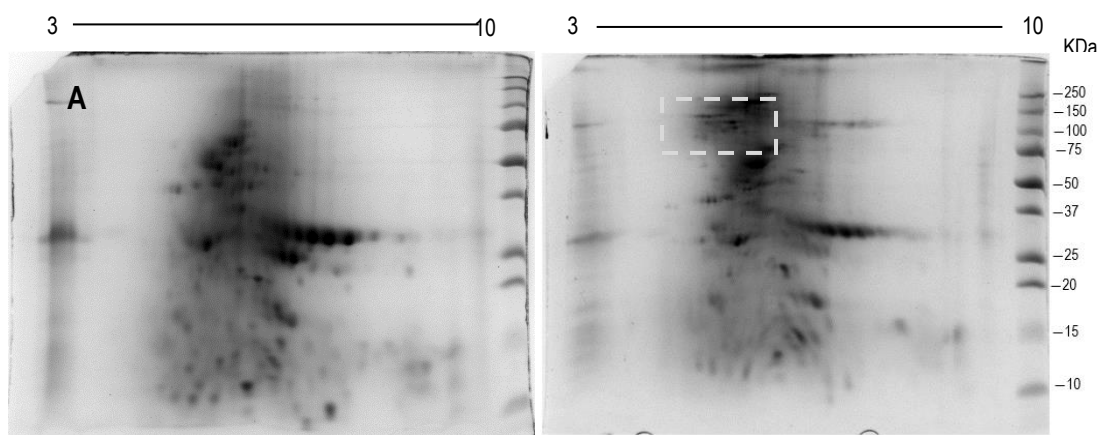


Figura 18. Geles representativos 2D SDS PAGE de proteína intracelular de conidios de *M. anisopliae* obtenidos de (A) atmósfera normal (21 % O₂) y (B) bajo atmósfera enriquecida con 30 % O₂.

Debido al número de manchas proteicas encontradas en los geles 2D SDS PAGE se realizó un cribado de las manchas que se analizarían por espectrometría de masas, así que, con base en el análisis de imágenes realizado con el programa PDQuest, se definieron los siguientes criterios, que debía cumplir una mancha proteica para ser analizada.

1. Coeficiente de variación de la cantidad normalizada (abundancia) entre manchas proteicas, menor o igual al 25 % (Hunt et al., 2005).

2. Manchas proteicas exclusivos de un tratamiento, es decir aquellas que bajo las condiciones de estudio no aparecieron en una condición y sí en la otra o manchas proteicas que se encontraron en ambos tratamientos y que cambiaron en abundancia según el criterio de “fold increase” mayor a 3.

3. Manchas proteicas visibles, es decir aquellas que tienen un valor de intensidad (peak value) mayor a 250, este criterio calificó sólo la intensidad de la mancha, por lo tanto, indicó si las manchas proteicas eran visibles en el gel físico.

En la primera columna de la Tabla 14 se enlistan las proteínas que fueron identificadas, además en la primera columna de la Tabla 15 se muestra el número de identificación (SSP, Standar Spot) de las manchas proteicas que cumplieron con todos los criterios establecidos.

Tabla 14. Proteínas observadas diferencialmente, obtenidas de conidios cultivados bajo una atmósfera conteniendo 30% O₂

Nombre de la proteína	Abreviación	Número de Acceso (NCBI)	pl teórico	PM (KDa) teórico
Carboxilesterasa	CARB	672385859	5.17	64.71
Proteína hipotética MANI_005266	LHEF	672375407	6.45	33.22
Lectina de hongos específica para fucosa				
Proteína hipotética H633G_04982	PDI	770406240	4.96	56.51
Proteína disulfuro isomerasa				
Proteasa Vacuolar A	PVA	672376640	5.25	42.66
Catalasa peroxidasa	CPs	672378132	5.83	80.75
Enolasa	ENO	672384501	5.12	47.36
Proteína hipotética MANI_026147	HP26147	672383289	4.94	29.99
Aldehído Deshidrogenasa	ALDH	672384998	6.23	54.03
Proteína de choque térmico 88 (HSP 88)	HSP88	672382438	5.15	80.13
Dipeptidil peptidasa	DPP	672385674	5.44	78.60
Tirosina Hidroxilasa 14-3-3	TH	672379662	4.85	29.90
Transaldolasa	TAL	672384382	6.06	35.49

Los pesos moleculares (PM) y los puntos isoelectrónicos (pl) teóricos de cada proteína, se obtuvieron de <http://www.expasy.org/>, en todos los casos la base de datos contra la que se comparó fue de *Metarhizium anisopliae* obtenida del NCBI con 26,779 entradas.

Las proteínas contenidas en ocho manchas (Tabla 15) se identificaron por espectrometría de masas; dentro de los recuadros se indica la puntuación de la identificación. En general se identificaron proteínas que fueron *exclusivas*, es decir que solamente se detectaron en los geles realizados con proteína de los conidios cultivados bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) (Proteínas agrupadas a la derecha en el diagrama de Venn, Figura 17) y sólo se identificó las proteínas de una mancha (SSP 3401) que se encontraba en ambas condiciones (Proteínas agrupadas en el centro del diagrama de Venn, Figura 17). Doce diferentes proteínas se identificaron en ocho manchas, es importante mencionar que se encontró una misma proteína en diferentes manchas proteicas, en la Tabla 15 puede verse por columna *cuales* y por fila *cuantas* proteínas se identificaron por cada mancha.

Tabla 15. Manchas proteicas seleccionadas después del análisis de imágenes con el programa PDQuest, se muestran identificadas por su número SSP.

SSP	CARB	LHEF	PDI	PVA	CPs	ENO	HP 26147	ALDH	HSP88	DPP	TH	TAL	CV (%)	pl exp	PM exp
1802	30.44	27.52	14.06										21.9	5.05	138.82
2502				74.65									25.4	5.14	44.80
3401	73.17	19.49					225.7				12.61		23.1	5.51	29.28
3703	101.5	23.55	29.47		29.42	27.04	188.7	14.56	27.57		18.95		19.6	5.54	104.06
3802							28.45						15.4	5.47	109.85
3808	89.57	33.07	15.55		104.3	41.24		23.18		13.75			9.65	5.75	132.51
4508	57.56	48.80										19.52	17.6	6.21	39.51
4608	208.8	39.82			97.68								23.5	6.19	70.34

Adicionalmente se calculó el factor normalizado de abundancia espectral (NSAF, normalized spectral abundance factor) con la finalidad de obtener la abundancia relativa de cada proteína identificada en cada mancha proteica, esta se calculó con la ecuación 13.

$$(NSAF)_k = \frac{\left(\frac{SpC}{L}\right)_k}{\sum_{i=1}^N \left(\frac{SpC}{L}\right)_i} \quad (13)$$

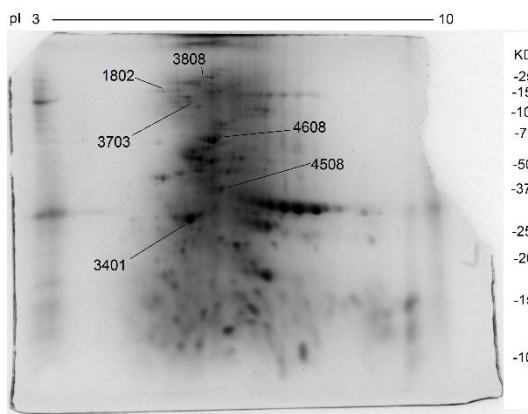
Donde NSAF es el factor normalizado de abundancia espectral para cada proteína k (adimensional), SpC es el número de recuentos espectrales (adimensional), L es la longitud de la proteína (número de aminoácidos) (Ferreira de Oliveira et al., 2011).

Los casos que más llamaron la atención fueron la carboxilesterasa (CARB) y la lectina de hongos específica para fucosa (LHEF), que se identificaron en seis de ocho diferentes manchas proteicas (para una mejor visualización ver Gráfica 19 A y B), pero este hallazgo también se presentó para la mayoría de las proteínas identificadas, esto surgió debido al bajo poder de resolución de los geles de poliacrilamida de 7 cm (Reed et al, 2012) que fue el tamaño de la tira de poliacrilamida de gradiente de pH que se utilizó en este trabajo y debido a que las proteínas se concentraron en un intervalo de pH de 5-7; la primera opción para mejorar este análisis sería realizar geles 2D SDS PAGE con tiras de poliacrilamida con gradiente de pH de 17 o 24 cm, para mejorar la resolución, y/o reducir el intervalo de pH en la separación por pl en la primera dimensión con tiras de poliacrilamida de gradiente de pH de 5-8, las cuales se encuentran en el mercado.

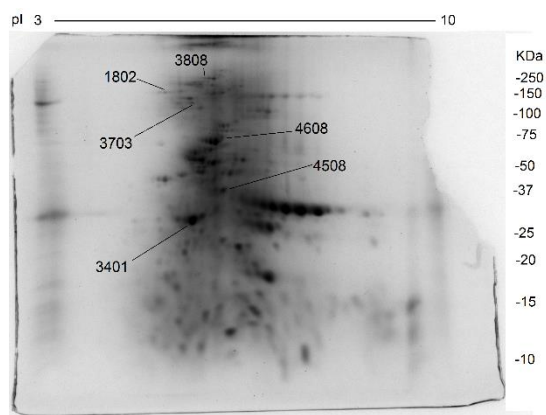
Otro factor que afectó la identificación de proteínas, haciendo que una misma proteína se encontrara en más de una mancha proteica, es la abundancia de la CARB y la LHEF. Mediante el factor normalizado de abundancia espectral (NSAF) es posible determinar que estas proteínas son la primera y segunda en abundancia en las manchas proteicas que se identificaron (Gráfica 6 A, D y Gráfica 7 F, G, H), la alta abundancia de estas proteínas provocó que enmascararan a las proteínas de baja abundancia (Björhall et al., 2005; Magdeldin et al., 2014). El problema de que una proteína se enfoque en un sitio pero que el remanente se pueda encontrar en otros puntos del gel se reportó por Linke et al., (2007) con muestras de plasma de rata, y con muestras de plasma y suero humano por Echan et al., (2005), por lo tanto en una próxima investigación, y conociendo que estas proteínas son de alta abundancia, se deberá proceder con un método conocido como *agotamiento de proteínas muy abundantes*, que consiste en eliminar por métodos selectivos la (s) proteína (s) más abundantes y realizar de nuevo el análisis en geles 2D SDS PAGE con una muestra *empobrecida*. Este procedimiento se realiza para analizar el proteoma de muestras de fluidos biológicos, por ejemplo en

la sangre humana se agota la albúmina sérica humana (HSA por su siglas en inglés), en muestras de saliva se agota la amilasa y es preferible que se realice antes del análisis del proteoma (Hu et al., 2006; Zolotarjova et al., 2005). Al eliminar las proteínas de alta abundancia, lo cual correspondió al 85% de las proteínas contenidas en suero humano, la capacidad de resolución de los geles 2D SDS PAGE mejoró con las muestras de suero empobrecido (Björhall et al., 2005). El mismo caso sucede con la muestras de plantas en donde se remueven las proteínas más abundantes entre ellas la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa (RuBisCO) (Ahsan et al., 2007). Hasta ahora no se conocía que estas proteínas fueran de alta abundancia en los conidios de *M. anisopliae*, de hecho, hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se realiza un análisis de la respuesta a una elevada concentración de oxígeno de un hongo entomopatógeno con un enfoque proteómico.

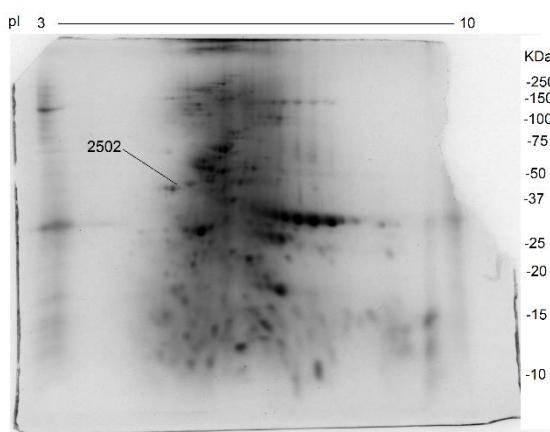
Considerando los factores descritos previamente, se identificaron doce proteínas que se describen en la Tabla 14, algunas proteínas se identificaron como hipotéticas, es decir que se han predicho por herramientas bioinformáticas, sin embargo falta evidencia experimental que dé certidumbre que se expresan *in vivo*, incluso hay evidencia de que el producto del gen se expresa por medio de espectrometría de masas, como en el caso de este estudio, pero no se han caracterizado funcionalmente ni se han descrito a nivel de bioquímico (Lubec et al., 2005). Es común encontrar estas proteínas, pues se estima que representan la mitad de las proteínas codificadas en el genoma de un organismo (Sivashankari y Shanmughavel, 2006). Sin embargo, para poder inferir su posible función y su relación con los parámetros de calidad descritos previamente, se utilizó la herramienta bioinformática BLAST (basic local alignment search tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), para identificar dominios homólogos de proteínas reportadas, con funciones conocidas o dominios de los cuales ya se conoce su actividad. Las proteínas se agruparon de acuerdo a su función en cuatro grupos, proteínas relacionadas con infectividad (I), proteínas implicadas en la resistencia al estrés (II), proteínas implicadas en otras reacciones metabólicas (III) y proteína con función desconocida (IV), la función de cada proteína se describe más adelante



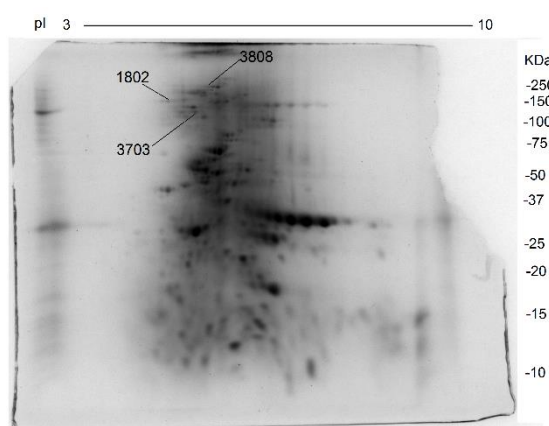
(A)



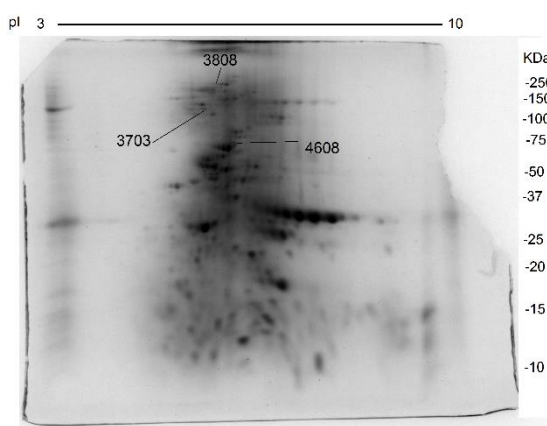
(B)



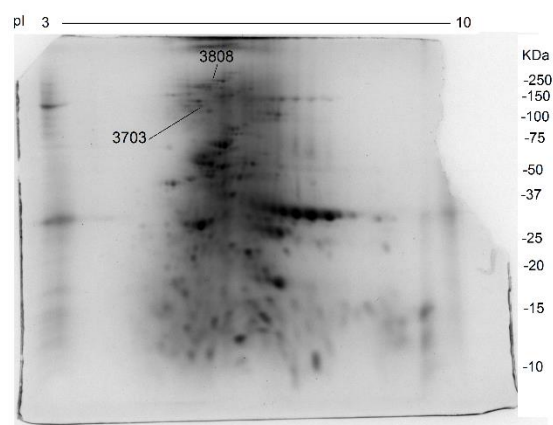
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 19. Manchas proteicas donde se identificaron (A) Carboxilesterasa, (B) Lectina de hongos específica para fucosa, (C) Proteína disulfuro isomerasa, (D) Proteasa vacuolar A, (E) Catalasa / Peroxidasa, (F) Enolasa.

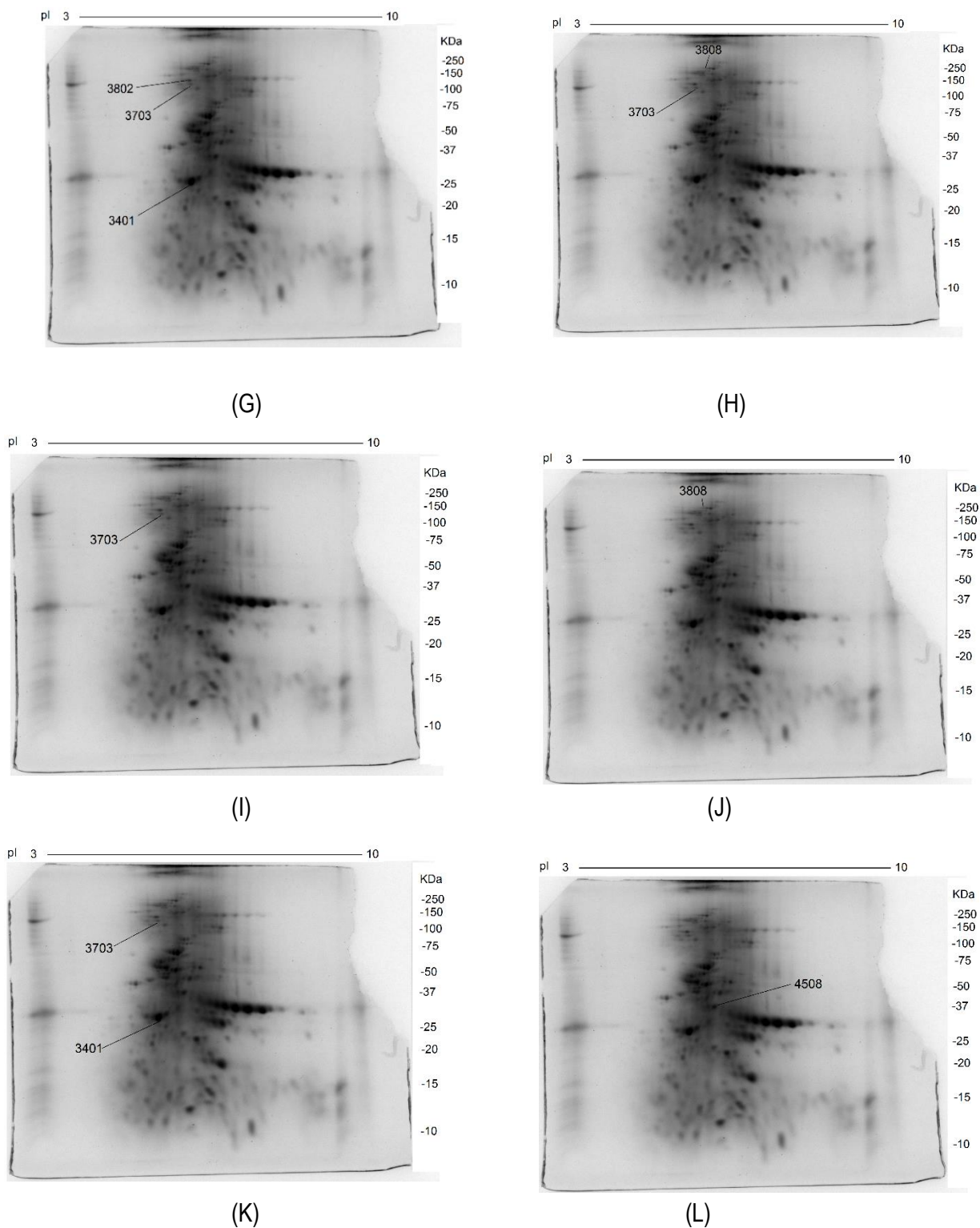
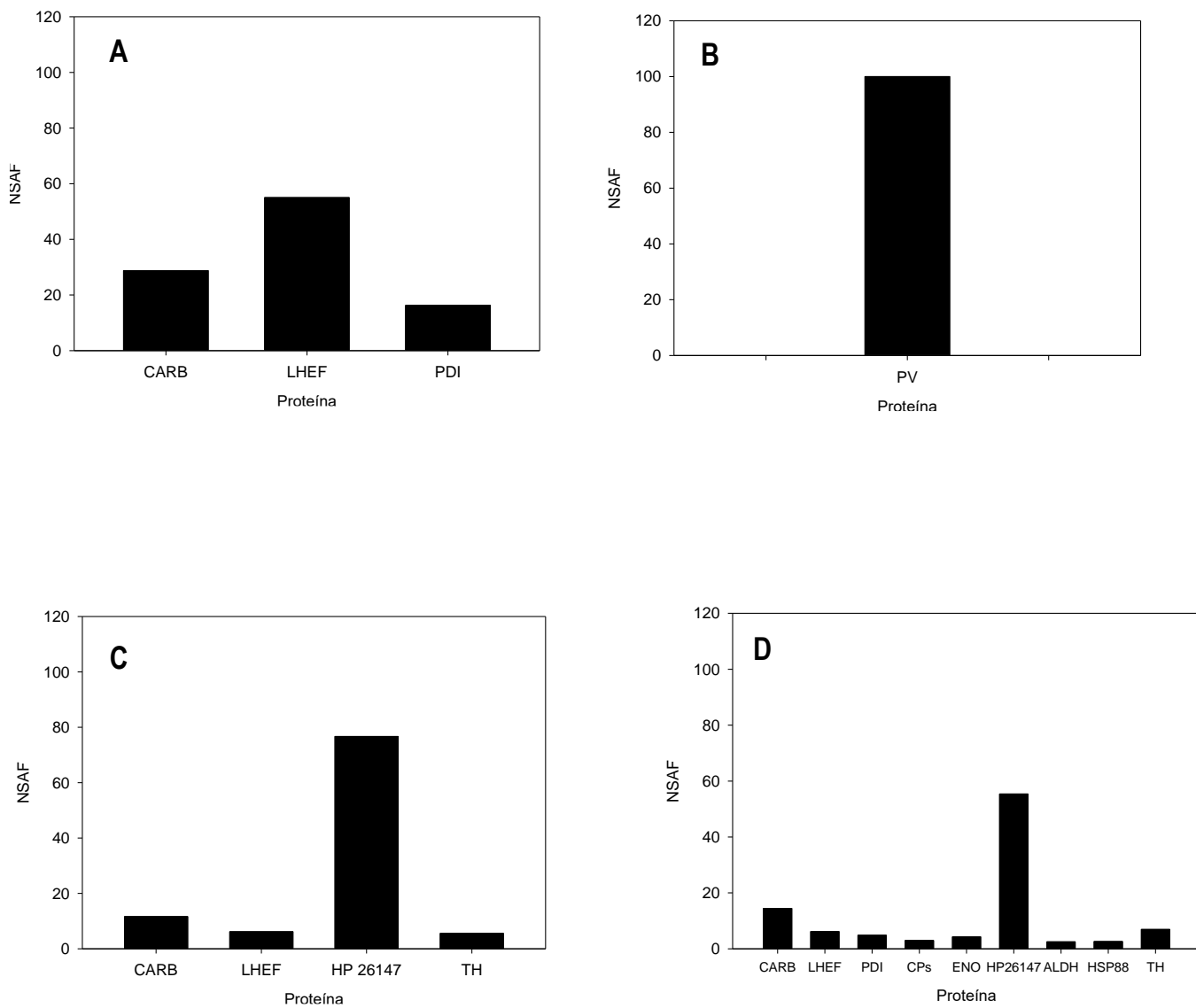
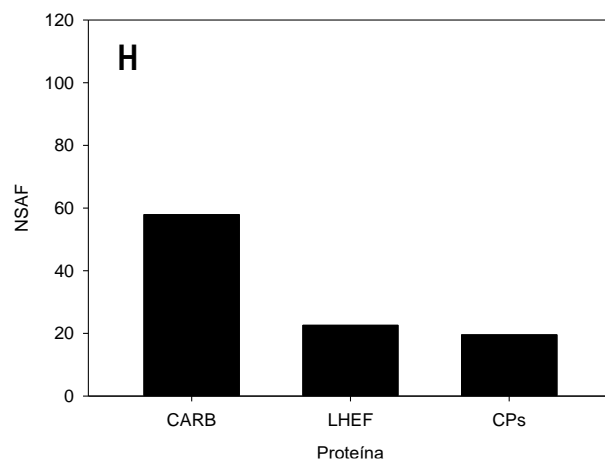
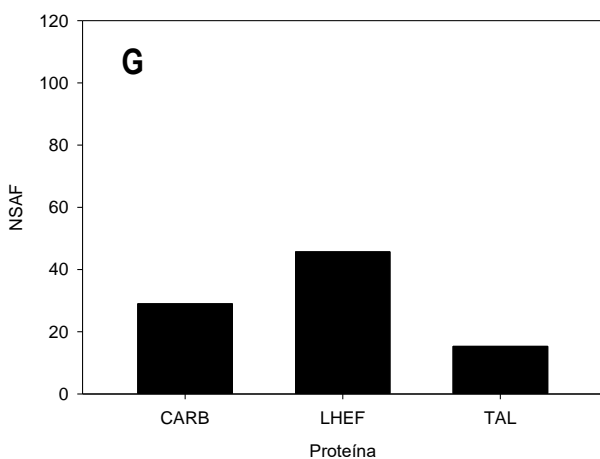
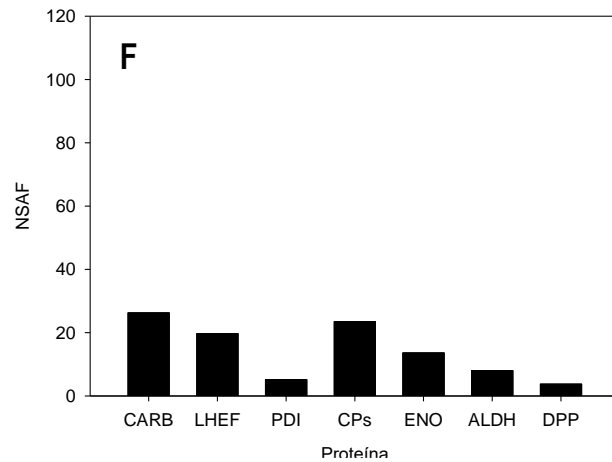
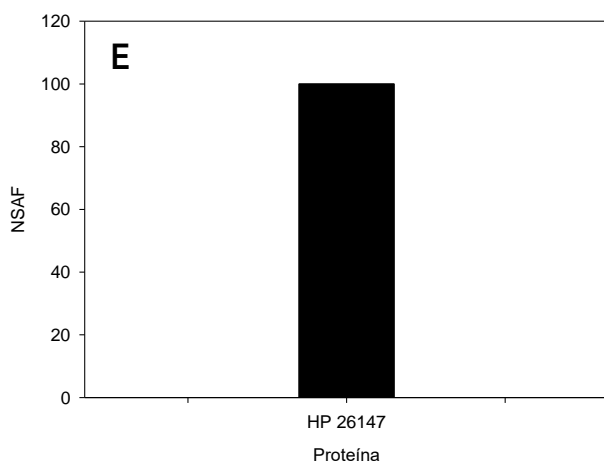


Figura 20. Manchas proteicas donde se identificaron (G) Proteína Hipotética 26147, (H) Aldehído deshidrogenasa, (I) Proteína de choque térmico 88, (J) Dipeptidil peptidasa, (K) Tirosina hidroxilasa y (L) Transaldolasa.



Gráfica 6. Factor normalizado de abundancia espectral (NSAF) para las proteínas identificadas en las manchas proteicas (A) 1802, (B) 2502, (C) 3401, (D) 3703. Para identificar el nombre de las proteínas, se utilizó el sistema de abreviaturas de que se describe en la Tabla 14.



Gráfica 7. Factor normalizado de abundancia espectral (NSAF) para las proteínas identificadas en las manchas proteicas (E) 3802, (F) 3808, (G) 4508, (H) 4608. Para identificar el nombre de las proteínas, se utilizó el sistema de abreviaturas de que se describe en la Tabla 14.

8.6.1 Grupo I: Proteínas relacionadas con infectividad

→ Carboxilesterasa

Las esterases (carboxilesterasas, lipasas, tioesterasas, y fosfolipasas) son hidrolasas (EC 3.1.1) que muestran una elevada especificidad de sustrato hacia los oxiésteres o tioésteres de diversos ácidos grasos. Algunas esterases muestran mayor actividad hacia sustratos de cadena larga de acilo (C12-C18) mientras que otras prefieren sustratos de cadena corta (C2-C6) (Kuznetsova et al., 2005).

Aunque tanto las lipasas y carboxilesterasas hidrolizan los enlaces éster de ácidos carboxílicos, las carboxilesterasas (**CARB, EC 3.1.1.1**) preferentemente actúan sobre las cadenas de acilo de hasta 12 átomos de carbonos, mientras que la actividad máxima de lipasas se exhibe en las cadenas de acilo con más de 12 átomos de carbono (Eggert et al., 2002). Se caracterizó una carboxilesterasa para el hongo *Penicillium expansum*, esta proteína era una de las bandas más intensas encontradas en geles SDS PAGE, lo cual corresponde con este estudio (Corrêa et al., 2013).

Hasta ahora no se ha caracterizado la función de esta proteína en hongos entomopatógenos, pero se puede inferir que gracias a su actividad lipolítica podría participar en el establecimiento de la infección de insectos, ya que para traspasar las estructuras de protección de los insectos son necesarias diferentes esterases, como lipasas y algunas quitinasas para descomponer la estructura epidérmica (St Leger et al., 1987).

→ Lectina de hongos específica para fucosa

Las lectinas son proteínas de unión a carbohidratos que se encuentran en una amplia gama de especies, incluyendo plantas, animales y microorganismos. La superficie de las células de los organismos están cubiertas de carbohidratos abundantes y diversos, por lo tanto, algunas lectinas son importantes debido a su especificidad por estructuras de carbohidratos definidos (Vijayan y Chandra, 1999).

Las bacterias y los hongos son organismos heterótrofos que dependen de saprofitismo, simbiosis o patogenicidad para obtener su fuente de energía. Estos estilos de vida requieren el reconocimiento específico de tejido orgánico para la adhesión y la posterior invasión. Una estrategia común adoptada por estos microorganismos implica la unión a glicoconjugados (por ejemplo glicoproteínas) (Imberty et al., 2005), que en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se han asociado estrechamente como factores

de infectividad; dos lectinas de esta bacteria se produjeron junto con otros factores de infectividad por metabolismo secundario por la detección de quórum cuando colonizaron pulmones de pacientes con fibrosis quística (Imberty et al., 2004).

Se identificaron algunas lectinas cuya unión es específica para fucosa, la lectina del hongo *Aleuria aurantia* (AAL) se une preferentemente a oligosacáridos α 1,6 fucosilados, la AAL es una lectina disponible en el mercado y es ampliamente usada para estimar el grado de α 1,6-fucosilación en glicoproteínas. También se identificó una lectina, en cultivos deficientes en hierro del hongo *Aspergillus oryzae* (AOL); esta lectina es específica para L-fucosa, y se encontró que comparte 26% de homología con AAL en estructura primaria (Matsumura et al., 2007).

→ **Proteasa vacuolar A**

La vacuola es un organelo que participa en diversos procesos celulares como degradación y almacenamiento de macromoléculas, regulación del pH, osmoregulación, almacenamiento de aminoácidos, ácidos carboxílicos, carbohidratos y algunas vitaminas (Sarry et al., 2007). Por otra parte, cuando los conidios del hongo fitopatógeno *Magnaporthe grisea* germinan, crean un apresorio que genera una presión de turgencia de 8 MPa que proporciona la fuerza suficiente para romper la cutícula de la planta del arroz, en este evento, la vacuola apoya a la formación del apresorio a través de la degradación de lípidos de reserva para generar metabolitos osmóticamente activos (Veneault-Fourrey et al., 2006; Veses et al., 2008).

Trichoderma atroviride representa una alternativa ecológica a los fungicidas químicos ya que parasita hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, una proteasa vacuolar A y otras proteasas se encontraron en el proteoma de *T. atroviride* cuando crece en la pared celular de *Rhizoctonia solani* (Grinyer et al., 2005).

Las proteasas son importantes durante la infección de insectos ya que se ha reportado que el peso seco de la cutícula de la larva de *Tenebrio molitor* tiene un 47.7 % proteína (Bidochka y Khachatourians, 1991), la cual es una barrera para el establecimiento de la infección, en el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, dos tipos de proteasas importantes se reportaron en su vacuola, Pr1 y Pr2 las cuales están relacionadas con la infectividad (St. Leger et al., 1988),

Por la función asignada a cada proteína, revisada en la literatura, es viable señalar que la carboxilesterasa, la proteasa vacuolar y la lectina, son proteínas importantes en el establecimiento de la infección de insectos para hidrolizar los ésteres de lípidos, degradar proteínas o el reconocimiento del tejido orgánico, posiblemente el incremento en la síntesis de estas tres proteínas en los conidios obtenidos bajo una atmósfera conteniendo 30 % O₂ incrementa la infectividad en la etapa final de la infección hacia larvas de *T. molitor*, puesto que la sobrevivencia de los insectos (sección 8.3.4) fue 34.12 % menor con conidios cultivados con 30 % O₂, en relación a los conidios cosechados de cultivos con una atmósfera normal (21 % O₂). Es importante recordar que estas proteínas se encontraron exclusivamente en los conidios cultivados bajo la atmósfera más oxidante (30 % O₂).

Los productos de transcripción (ARNm) de carboxilesterasas, proteasas y lectinas, se encontraron en conidios de *Aspergillus fumigatus*, que es un hongo patógeno, estas proteínas también podrían servir para la salida del estado latente (conidio), el cual es el primer paso para el establecimiento de la infección (Lamarre et al., 2008, ver el archivo 1 del material suplementario).

8.6.2 Grupo II: Proteínas implicadas en la resistencia al estrés

→ Catalasa/Peroxidasa Bifuncional

Las catalasa/peroxidasas son oxidorreductasas bifuncionales (CPs, EC 1.11.1.21) con actividad peroxidática y de oxidoreducción de H₂O₂ (Figura 21), son similares a las catalasas monofuncionales, las cuales presentan una línea evolutiva diferente (Zamocky et al., 2009). Un análisis filogenético demostró que la mayoría de las secuencias de *katG* (nombre del gen) están codificadas dentro de los genomas de eubacterias y arqueobacterias, pero las *katG* también se puede encontrar en Ascomicotas y Basidiomicotas (Passardi et al., 2007).

Las catalasa/peroxidasas participan en la degradación del H₂O₂ intracelular que deriva del metabolismo de los hongos y/o contribuyen a la protección de los hongos fitopatógenos contra las especies reactivas del oxígeno (ERO), producidas durante la interacción planta-patógeno (Zamocky et al., 2009). También durante la infección de los hongos entomopatógenos a los insectos se producen ERO en los hemocitos para tratar de destruir al patógeno (Nappi y Christensen, 2005), en el hongo fitopatógeno *Magnaporthe grisea* la expresión del gen *katG1K* incrementó 120% en presencia de paraquat en comparación con el que se cultivó en condiciones estándar (Zamocky et al., 2009).

Una catalasa/peroxidasa bifuncional (AFUA_8G01670) se identificó en los conidios y micelio de *Aspergillus fumigatus*, de hecho la abundancia de esta proteína se incrementó 4.59 veces en los conidios, con respecto a lo encontrado en el micelio (Teutschbein et al., 2010).

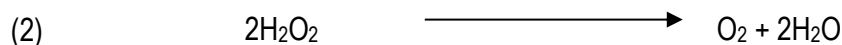
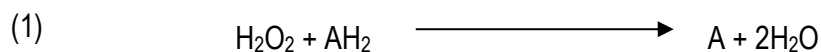


Figura 21. Reacciones que cataliza la Catalasa/Peroxidasa bifuncional, (1) actividad peroxidática y (2) la oxidoreducción de H_2O_2

→ Dipetidil peptidasa

Las dipeptidil peptidasas son un grupo de enzimas del tipo metalopeptidasa cuya función está estudiada principalmente en humanos (Prajapati y Chauhan, 2011), para hongos esta proteína sólo se ha aislado y purificado de *Saccharomyces cerevisiae*. La comparación de la secuencia de la proteína de *M. anisopliae* var. *lepidiotum* analizada en el presente estudio (utilizando BLAST) reveló un 91% de identidad con la DPP III y un 41 % de identidad con la DPP humana, la DPP III purificada existe en la forma de monómero y dímero (Jajčanin - Jozić et al., 2010).

La dipeptidil peptidasa III (**DPP III, EC 3.4.14.4**) es una enzima dependiente de zinc que escinde específicamente los dos primeros aminoácidos del amino terminal de péptidos de diferente longitud (Baral et al., 2008) y se describió como una peptidasa de citosol (Prajapati y Chauhan, 2011).

La sobreexpresión del factor de transcripción Nrf2 tanto *in vitro* como *in vivo* protege de estrés oxidante ya que se encuentra implicado en la expresión de genes de biosíntesis de glutatión (Wakabayashi et al., 2004). Se reportó la migración hacia el núcleo del factor de transcripción Nrf2 en respuesta a la sobreexpresión de DPP III en células de neuroblastoma, aunque el mecanismo por el cual la DPP III media la translocación de Nrf2 al núcleo no está claro, las células que sobreexpresan la DPP III atenúan eficazmente los efectos tóxicos de la rotenona y del H_2O_2 (Liu et al., 2007), del mismo modo, en células de hígado de ratones expuestos a condiciones de hiperoxia (100 % O_2) la DPP III se acumula en el núcleo lo que resultó en la reducción del daño oxidante (Sobočanec et al., 2016).

→ **Tirosina hidroxilasa 14-3-3**

La proteína 14-3-3 es de una familia muy conservada en organismos eucariotas, capaces de unirse a más de 200 proteínas, en su mayoría a proteínas fosforiladas, la unión de una proteína 14-3-3 puede estabilizar la forma activa o inactiva, una vez que la proteína se encuentra fosforilada (van Heusden y van Heusden, 2005).

Existen al menos dos vías de biosíntesis de melanina en hongos, una vía involucra la utilización de la 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) como intermediario y alternativamente algunos hongos utilizan la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Eisenman y Casadevall, 2012). La tirosina hidroxilasa o tirosina 3-monooxigenasa (**TH, EC 1.14.16.2**) cataliza el primer paso en la biosíntesis de dopamina que implica la hidroxilación de L-tirosina (precursor), el cual se convierte primero a L-DOPA y luego a dopaquinona (Luthra y Singh, 2010).

Esta proteína en especial no se ha estudiado en hongos entomopatógenos, pero sí el producto de la vía en la que participa, la melanina elimina los radicales libres tales como $O_2 \bullet^-$. Se clonaron genes de la biosíntesis de melanina vía DHN (policétido sintasa, scitalona dehidratasa, y los genes de 1,3,8-trihidroxinaftaleno reductasa) de *Alternaria alternaria* BCRC30501 en el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*; la transformante *M. anisopliae* MA05-169 exhibió una tasa de germinación más alta comparado con la cepa silvestre (*M. anisopliae* BCRC35505) y mostró mayor resistencia a la radiación UV-B, ya que después de la exposición de los conidios a una dosis de 46.8 mJ/cm², la transformante *M. anisopliae* MA05-169, germinó 4.8 veces más que la cepa silvestre, después de 72 h de incubación (Tseng et al., 2011).

→ **Proteína de choque térmico 88**

La exposición a temperaturas elevadas induce a todos los organismos a sintetizar proteínas de choque térmico (**HSP**, Heat Shock Proteins), muchas actúan como chaperonas que ayudan en el pliegue o despliegue de otras proteínas. Estas actividades son útiles durante la exposición de las células a las altas temperaturas que desnaturalizan las proteínas y pueden conducir a la agregación de proteínas, también se requiere en condiciones de crecimiento normal (Plesofsky-Vig y Brambl, 1998).

Se identificó en los conidios y micelio de *A. fumigatus* una proteína de choque térmico 88 (**HSP 88**) (AFUA_1G12610) cuya abundancia se incrementó 4.42 veces con respecto a lo encontrado en el micelio (Teutschbein et al., 2010), sin embargo no se reportó alguna función conocida.

La HSP 88 de *Paecilomyces tenuipes* Jochoen-1 (ahora *Isaria*) mostró un incremento en el nivel de expresión relativo a 30 ° C incrementando 1.74 veces después de 8 h de exposición a esta temperatura y 2.55 veces después de 16 h con respecto al nivel de expresión encontrado a 20 ° C, es decir, el calor indujo la expresión de la HSP 88 (Liu et al., 2014). El análisis con el programa BLAST mostró que la HSP 88 de *P. tenuipes* tiene un 83% de identidad con la proteína obtenida de los conidios de *M. anisopliae* cultivados bajo una atmósfera oxidante (30 % O₂), identificada en este estudio, también los genes de HSP 88 se encuentran en cuatro hongos entomopatógenos, *Paecilomyces tenuipes* Jochoen-1, *Paecilomyces tenuipes*, *Cordyceps militaris*, y *Cordyceps pruinosa* (Liu et al., 2012).

→ **Proteína disulfuro isomerasa**

La proteína disulfuro isomerasa (**PDI, EC 5.3.4.1**) está presente en el retículo endoplásmico y cataliza la formación, la reducción e isomerización de enlaces disulfuro *in vitro* y facilita el plegamiento de proteínas con enlaces disulfuro *in vivo* (Wang et al., 2008; Conesa et al., 2001).

Una proteína disulfuro isomerasa se identificó en *Metarhizium acridum* (Barros et al., 2010), aunque en ese estudio no se menciona qué función tiene la proteína en el hongo. También se reportó que esta proteína se sobrerregula durante el crecimiento de *M. anisopliae* var. *acridum* en un medio de cultivo, que entre otros componentes, contenía cutícula de langosta adulta (*Schistocerca gregaria*) comparado con aquellos que crecieron en caldo dextrosa Sabouraud (Wang y St. Leger, 2005).

En esta sección se mostró que una elevada concentración de oxígeno (30 % O₂) indujo la síntesis de cinco proteínas que no se encontraron en los conidios cultivados bajo una atmósfera normal (21 %O₂). Es interesante que cinco, de las doce proteínas identificadas, pertenezcan al grupo II, las proteínas implicadas en la resistencia al estrés oxidante. Probablemente para combatir la formación de H₂O₂ (Boveris y Cadenas, 2001), se indujo la síntesis de la catalasa/peroxidasa bifuncional, a la vez que el incremento de oxígeno, pudo provocar la migración del factor de transcripción Nrf2 hacia el núcleo en respuesta a la sobreexpresión de DPP III (Liu et al., 2007), por lo que estas dos proteínas podrían participar como una respuesta adaptativa provocada por un estrés oxidante y/o como una forma de

enfrentar el estrés oxidante característico de la salida de la latencia o dicho de otra manera, el inicio de la germinación (Oh et al., 2010) que dará lugar a la siguiente generación.

Cabe señalar que los conidios de los hongos entomopatógenos se han utilizado para el control biológico de plagas de insectos durante décadas, sin embargo, la eficacia de este tipo de hongos en pruebas de campo se afecta, principalmente debido al estrés ambiental, como la radiación UV y temperaturas extremas (Tseng et al., 2011). En la sección 8.3.3 se mostró que los conidios obtenidos con una concentración elevada de oxígeno (30 % O₂) mejoran un 60.8 % su termotolerancia (TS₅₀) comparado con aquellos obtenidos con una concentración de oxígeno normal en la atmósfera (21 % O₂), esto coincide con la aparición de la HSP88, lo cual podría explicar la mejora de termotolerancia. Como efecto de protección cruzada (Rangel, 2011), el micelio sujeto al estrés oxidante (desde las 60 h de cultivo) produjo conidios que pueden soportar otro tipo de estrés, este efecto ya se ha reportado antes por Miranda-Hernández et al., (2014) con el hongo entomopatógeno *I. fumosorosea*.

La transcripción de los genes HSP, inducida por calor en *Saccharomyces cerevisiae* se rige por los factores de transcripción Hsf1 (factor de choque térmico), Msn2, y Msn4, en particular la actividad transcripcional de Hsf1 se induce por el estrés oxidante, por calor, tratamiento con etanol y por falta de glucosa (Yamamoto et al., 2008), dado que la acumulación de proteínas mal plegadas desencadena la activación de Hsf1 (Morano et al., 2012) es concebible que el incremento de la concentración de oxígeno indujo además de la chaperona HSP88, a la PDI, para facilitar el plegamiento de proteínas (Wang et al., 2008). Por otro lado se ha reportado que la melanina mejora la resistencia de los conidios a la radiación UV-B (Braga et al., 2006; Tseng et al., 2011); en los conidios obtenidos de una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) se identificó la tirosina hidroxilasa, que participa en la biosíntesis de melanina vía L-DOPA (Eisenman y Casadevall, 2012). En el presente estudio no se probó la resistencia a la radiación UV-B, pero, recientemente se ha reportado que los conidios de cepa de *I. fumosorosea* obtenidos bajo atmósfera enriquecida (26 % O₂) incrementaron 2 veces la resistencia a luz UV-B (Súarez-Vergel et al., 2016).

Finalmente, poco se sabe sobre el modo de acción de los sistemas de defensa antioxidante de conidios en estado latente y la forma en que pueden influir en la persistencia de conidios en el medio ambiente. Un aumento en la persistencia medioambiental de los conidios es muy deseable porque el conidio es la etapa del desarrollo de los hongos que normalmente se utiliza como inóculo en los programas de control biológico (Barros et al., 2010). Esto se relaciona con la abundancia de HSP88

(AFUA_1G12610) que se identificó en los conidios y micelio de *A. fumigatus*, se incrementó 4.42 veces en conidios con respecto a la abundancia en el micelio (Teutschbein et al., 2010) lo cual indica que esta proteína es necesaria para la sobrevivencia del conidio.

8.6.3 Grupo III: Proteínas implicadas en el metabolismo

→ Enolasa

La enolasa (**ENO, EC 4.2.1.11**), también es conocida como hidratasa fosfopiruvato o 2-fosfo-D-glicerato hidro-liasas² es una enzima clave en la ruta de la glucólisis, altamente expresada en todas las células procariontas y eucariotas, cataliza la conversión del 2-fosfatoglicerato a fosfoenolpiruvato y viceversa (Breitenbach et al., 1997).

Además de su papel en la glucólisis, se han reportado otras funciones para la enolasa; en *Saccharomyces cerevisiae* se demostró que la proteína de choque térmico HSP48 es una isoforma de la enolasa, esta proteína en *S. cerevisiae* parece ser importante para la termotolerancia y control del crecimiento, debido a que la abundancia de la enolasa se incrementó en la fase de crecimiento estacionario (Iida y Yahara, 1985). En el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* una enolasa (XM_001561215) que codifica el gen BcEnol-1 se induce por frío y posee una actividad de unión al ADN por lo que podría ser un represor de la transcripción (Pandey et al., 2009).

Esta enzima se ha encontrado en *Metarhizium anisopliae* ARSEF 23 (Gao et al., 2011) y en *Metarhizium acridum* (Barros et al., 2010); en el hongo entomopatógeno *B. bassiana* se encontró el transcrito de la enolasa en los conidios que fueron cultivados sobre cutícula del insecto *Hypothenemus hampei* (broca del café) la cual también podría estar implicada en los procesos de infección (Mantilla et al., 2012).

→ Aldehído deshidrogenasa

La aldehído deshidrogenasa (**ALDH, EC.1.2.1**) cataliza la oxidación de varios aldehídos alifáticos y aromáticos a los correspondientes ácidos carboxílicos en presencia de NAD⁺ o NADP⁺ como cofactor (Quash et al., 2002), además está implicada en la detoxificación de aldehídos endógenos, derivados

² Obtenido de la base UniProt el 21/08/2016: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9HDT3> (Consortium, 2015)

del metabolismo de los lípidos o de fuentes exógenas y desempeña un papel similar en la detoxificación de xenobióticos (Lindahl, 1992).

La degradación y/o la penetración por parte de los hongos entomopatógenos de la barrera inicial de los insectos, es la etapa inicial de la infección, esta barrera es la epicutícula y la constituyen hidrocarburos, hasta la fecha se conoce que para la degradación de estos, se lleva a cabo una hidroxilación terminal de los alcanos a alcoholes grasos por parte de la citocromo P450, los alcoholes grasos posteriormente se oxidan a aldehídos grasos y ácidos grasos por parte de la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa, se considera que los ácidos grasos posteriormente se metabolizan en la vía de la β oxidación (Pedrini et al., 2013). Se postula que en los hongos entomopatógenos existen ALDH que presentan especificidad para los aldehídos presentes o generados durante la asimilación de hidrocarburos de cutícula. En *M. anisopliae*, dos ALDH se sobregulan cuando el hongo se cultiva en presencia de cutícula (*Manduca sexta*) en comparación con el hongo que se cultiva en medios comerciales como ADS (Freimoser et al, 2005), lo mismo sucede con el hongo *M. anisopliae* var. *acidum* cuando crece en extracto de cutícula de langosta (Wang y St. Leger, 2005).

→ **Transaldolasa**

La transaldolasa (**TAL, EC 2.2.1.2**) pertenece a la clase I de la familia aldolasa, cuyos miembros son las enzimas fundamentales que catalizan las reacciones de formación de enlaces carbono-carbono más importantes (Huang et al., 2008).

La transaldolasa es una enzima clave en la ruta de las pentosas fosfato, cataliza la transferencia reversible de un resto de dihidroxiacetona a partir de fructosa 6-fosfato y eritrosa 4-fosfato para formar sedoheptulosa 7-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, respectivamente. La función más importante de esta enzima es equilibrar los niveles de NADPH en la vía de las pentosas fosfato, como parte del metabolismo de la glucosa, y la neutralización de ERO (Perl, 2007).

El NADPH es una fuente importante de electrones para el sistema glutatión que proporciona dos electrones, ya que se oxida de NADPH a NADP⁺. La mayoría de las reacciones biológicas son procesos de dos electrones, esto asegura que la mayoría de estas reacciones tiene una configuración de capa cerrada (todos los orbitales moleculares están completamente llenos), evitando así los procesos de radicales libres potencialmente peligrosos. En células y tejidos la relación NADPH/NADP⁺

tiende a ser 100: 1, el NADPH es en general un cofactor en las reacciones reductoras y sirve como fuente de electrones, mientras que el NADP⁺ sirve en las reacciones oxidativas (catabolismo) (Schafer y Buettner, 2001).

El reencaminamiento del flujo metabólico de la glucólisis a la vía de las pentosa fosfato, tiene relación directa con la generación de NADPH, y parece ser una respuesta al estrés oxidante conservada en las células eucarióticas (Ralser et al., 2007). En este sentido, es notable la elevación de la síntesis de tres proteínas implicadas en el metabolismo (ENO, ALDH, TAL), de tal modo que su presencia sólo se detectó en los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂). La transaldolasa que al equilibrar los niveles de NADPH (Perl, 2007) participa en la ruta de la pentosa fosfato, la cual está conectada directamente a la vía glucolítica, vía en la que participa la enolasa, identificada en este estudio. La clave de los cambios metabólicos parece ser la reprogramación de metabolismo de los carbohidratos, que es esencial para mantener el equilibrio redox de la célula durante las condiciones oxidativas (Ralser et al., 2007), al incrementar la síntesis de este grupo de proteínas, es viable que el estrés oxidante posiblemente provocado por la elevada concentración de oxígeno (30 % O₂) en el cultivo de *M. anisopliae*, indujo la síntesis de estas tres proteínas y también provocó que los conidios fueron más infectivos, puesto que lograron mantener un equilibrio redox durante el proceso de infección.

8.6.4 Grupo IV: Proteína con función desconocida

→ Proteína hipotética MANI_026147

Se encontró una mancha proteica obtenida de los conidios cultivados bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) que fue 34.5 ($p > 0.05$) veces mayor en abundancia normalizada que la misma mancha proteica obtenida de los conidios cultivados bajo atmósfera normal (21 % O₂) (Figura 22). Por espectrometría de masas se identificaron cuatro diferentes proteínas en esta mancha pero utilizando el factor normalizado de abundancia espectral (NSAF) observamos que la abundancia relativa que más aporta a esta mancha proteica (Gráfica 6 C) es la proteína hipotética MANI_026147, la cual al utilizar la herramienta BLAST del NCBI presentó identidad solamente con proteínas hipotéticas por lo tanto no fue posible inferir ninguna función para ella.

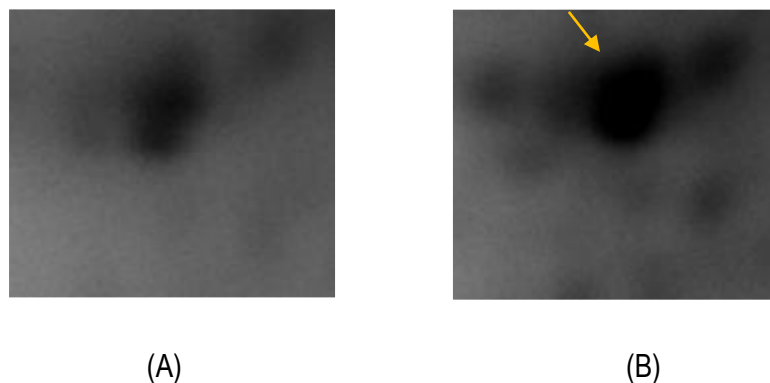


Figura 22. Mancha proteica SSP 3401 (A) proteína de conidios obtenidos bajo atmósfera normal (21 % O₂) y de (B) proteína intracelular de conidios de *M. anisopliae* obtenidos bajo atmósfera enriquecida con 30 % O₂, la flecha indica la mancha que ha cambiado incrementado 34.5 veces en abundancia ($p < 0.05$) con respecto a las condiciones atmosféricas normales

Como se mencionó antes, no es extraño encontrar proteínas hipotéticas en estudios proteómicos, aunque por ahora se desconoce su función en los conidios de *M. anisopliae* y más aún se desconoce la razón por la cual se elevó su concentración cuando el hongo se cultivó con una elevada concentración de oxígeno, este tipo de proteínas abre las puertas de estudio para analizar proteínas presentes en fenómenos importantes. (Sivashankari y Shanmughavel, 2006).

En esta sección (8.6) se mostró que la proteómica es una herramienta útil en el análisis del fenómeno observado en conidios de *M. anisopliae*, provocado por una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) comparado con una atmósfera normal (21 % O₂), debido a que explica en parte las mejoras en los parámetros de calidad, termotolerancia y infectividad, mostrado en las secciones 8.3.3 y 8.3.4, respectivamente. La termotolerancia mejorada cumple con los criterios del fenómeno de protección cruzada.

Un próximo paso será mejorar el método de empobrecimiento de las muestras, para eliminar las proteínas de elevada concentración con el objetivo de identificar proteínas de baja abundancia, además la proteína cuya función aún es desconocida, abre puertas para identificar proteínas que debido a su elevada abundancia, posiblemente sean muy importantes para este hongo entomopatógeno pero que no se ha estudiado su función.

8.7 Actividad de enzimas antioxidantes

Una de las técnicas para determinar estrés oxidante en una célula, es la medición de productos de oxidación derivados de reacciones con ERO, además de contar con una muestra experimental control, en un estado normal, para que esta se pueda comparar con la eventual situación desequilibrada de

estrés (Boveris et al., 2008). En el caso de *B. bassiana*, la modificación de la concentración de oxígeno, bajo la cual se cultivó el hongo, causó estrés oxidante, esto se evidenció con la medición de la concentración de proteínas y lípidos oxidados. Con respecto a la lipoperoxidación, se reportó que a partir del sexto día de cultivo se acumularon lípidos oxidados; al día 7, ambas atmósferas modificadas tanto la que contenía una baja concentración de oxígeno (16 %) como la que contenía una alta concentración (26 % O₂) provocaron un 30 % de incremento en la concentración de lípidos oxidados con respecto a la atmósfera normal, con respecto a las proteínas oxidadas se reportó una disminución en la concentración en ambas atmósferas modificadas (16 y 26 % O₂), pero esta posible contradicción se atribuyó a que el manitol, contribuyó a la estabilización de la proteínas (Garza-López et al., 2012). Asimismo en dos cepas de otro hongo entomopatógeno, *I. fumosorosea* CNRCB1 e *I. fumosorosea* 3302, los conidios que se obtuvieron de una atmósfera rica en oxígeno (26 % O₂) incrementaron la concentración del anión superóxido, 4 y 3 veces respectivamente, comparado con aquellos conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂) (Miranda Hernández, 2014). Por su parte, al exponer a *S. cerevisiae* a una atmósfera hiperoxidante (100 % O₂) se reportó que las células requieren una serie de factores de respuesta al estrés, incluidos los que participan en la defensa antioxidante, choque térmico, el daño del ADN para modular la sensibilidad a la hiperoxia, con estos estudios queda evidenciado que elevar la concentración del oxígeno en la atmósfera bajo la cual se cultiva a los hongos puede provocar un estrés oxidante en las células.

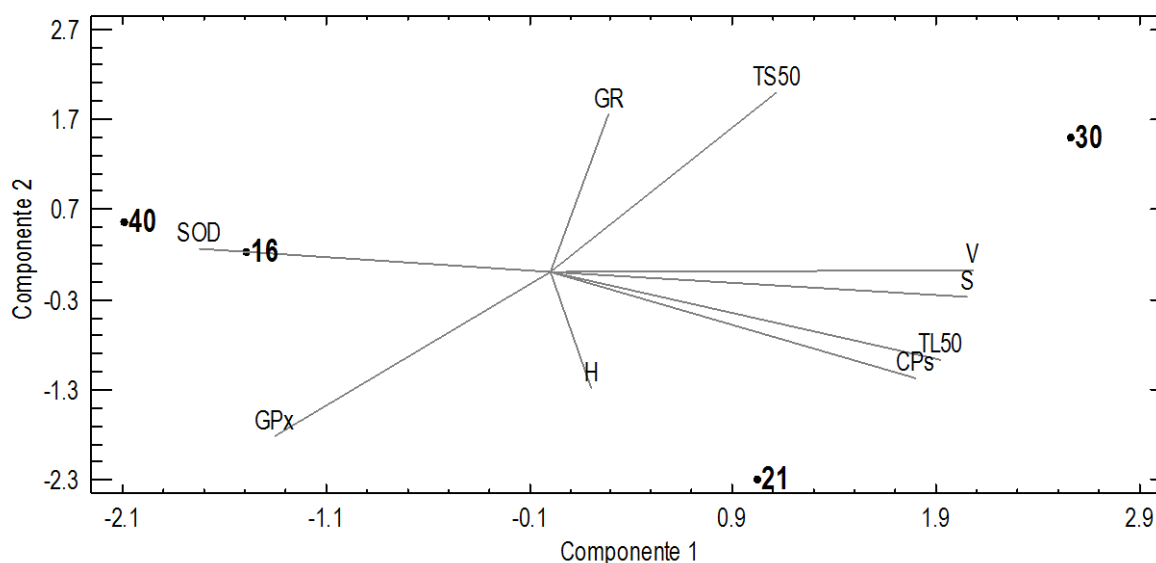
Por otra parte, se ha reportado que las enzimas antioxidantes tienen un papel fundamental en el incremento de la capacidad infectiva, por ejemplo una cepa de *M. anisopliae* incrementó su infectividad hacia larvas de *Plutella xylostella*, se sobreexpresó el gen que codifica para la enzima catalasa (*cat1*) (Morales Hernandez et al., 2010).

Conociendo los estudios antes expuestos y con base en los resultados que hemos mostrado en las secciones anteriores, se procedió a determinar si un grupo de enzimas con actividad antioxidante se relaciona con el fenómeno provocado por atmósferas enriquecidas con oxígeno, las cuales incrementaron la termotolerancia (TS₅₀), infectividad (S y TL₅₀) mientras que una de ellas (30 % O₂) no afectó los parámetros de calidad, viabilidad e hidrofobicidad, de los conidios de *M. anisopliae*.

El oxígeno entra a una célula por difusión (Hansberg, 2002) y debido a que la naturaleza de los tratamientos que provocaron los efectos antes descritos, es decir su riqueza en oxígeno, se postuló que podía deberse a que *M. anisopliae* previo a la diferenciación (60 h, creciendo como micelio), censó

una elevación en la concentración de oxígeno y como respuesta adaptativa, incrementó la actividad enzimática de alguna de sus enzimas antioxidantes, de tal modo que enfrentara un estado oxidante potencialmente dañino. En particular este estudio se enfocó en la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa/peroxidasa y superóxido dismutasa.

Con el objetivo de explorar el comportamiento de las enzimas antioxidantes antes enlistadas (a través de sus actividades enzimáticas) y de los parámetros de calidad (viabilidad, hidrofobicidad, infectividad y termotolerancia), bajo cuatro condiciones de oxígeno en la atmósfera (16, 21, 30 y 40 % O₂) se realizó un análisis de componentes principales. En las siguientes secciones se expondrá que relaciones e implicaciones puede tener este análisis, así como la actividad enzimática medida para cada uno de los ECE de los conidios de *M. anisopliae* cultivado bajo distintas atmósferas oxidantes. Mediante este análisis se lograron obtener dos componentes principales (CP), los cuales en conjunto explican el 81.67 % de la variabilidad total de los datos; donde el componente principal 1 (CP1) explicó el 52.53 % de la variabilidad y el componente principal 2 (CP2) explicó el 29.14 %. Como se puede observar en la Gráfica 8 el CP1 permitió separar a la atmósfera conteniendo 21 y 30 % O₂ de los tratamientos con atmósferas conteniendo 16 y 40 % O₂, y mientras que el CP2 separa los tratamientos con atmósferas 21, y 30 %.



Gráfica 8. Bigráfica del Análisis de Componentes Principales, Viabilidad (V,%), Hidrofobicidad (H), Supervivencia (S,%), Tiempo de supervivencia 50 (TS50, d), Tiempo letal 50 (TL50), Glutatión peroxidasa (GPx, U/mg de proteína), Glutatión reductasa (GR, U/mg de proteína), Catalasa / Peroxidasa (CPs, U/mg de proteína), Superóxido dismutasa (SOD, U/mg de proteína), 16 (16 % O₂), 21 (21 % O₂), 30 (30 % O₂) y 40 (40 % O₂).

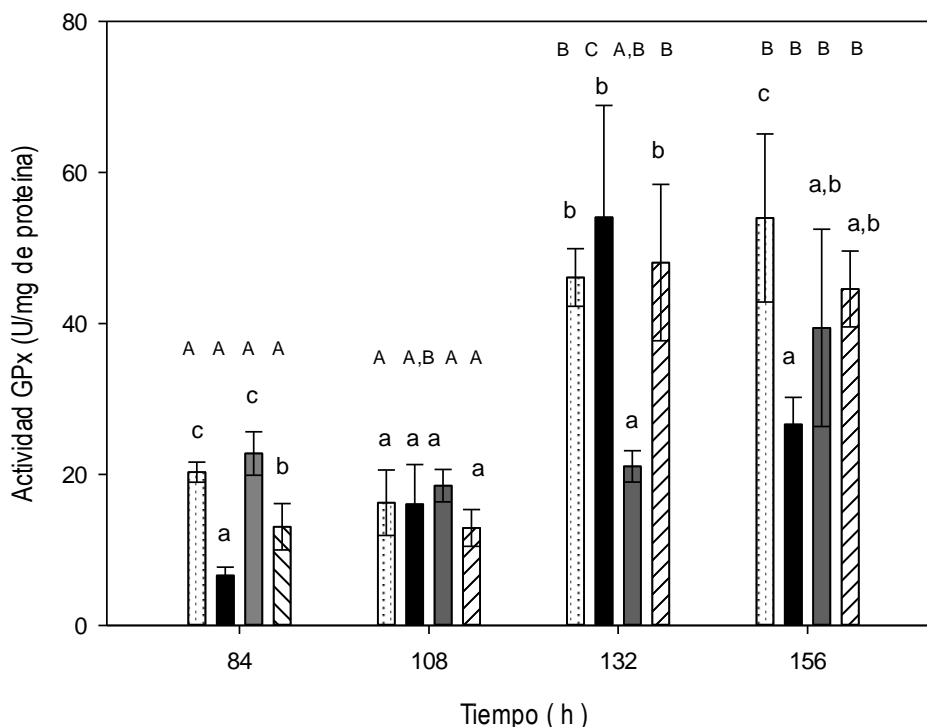
Los tratamientos con atmósferas conteniendo 21 y 30 % O₂ tienen relación positiva con la actividad catalasa/peroxidasa con la viabilidad y con los parámetros de infectividad (TL₅₀, S). El tratamiento con una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) además tiene relación positiva con la actividad glutatión reductasa y la termotolerancia (TS₅₀); mientras que los tratamientos con atmosferas conteniendo 16 y 40 % O₂ tiene una relación negativa con los parámetros de calidad, pero una relación positiva con la actividad superóxido dismutasa. Con respecto a las enzimas antioxidantes el análisis reveló que la catalasa/peroxidasa se correlaciona positivamente con los parámetros de calidad, infectividad (S, $r = 0.807$; $p \geq 0.05$), y viabilidad (V, $r = 0.859$; $p \geq 0.05$), por su parte la actividad glutatión reductasa se correlaciona positivamente con la termotolerancia (TS₅₀, $r = 0.76$; $p \geq 0.05$), mientras la superóxido dismutasa tiene una correlación negativa con la viabilidad (V, $r = -0.65$; $p \geq 0.05$) y la termotolerancia (TS₅₀, $r = -0.2711$; $p \geq 0.05$). Finalmente, la actividad glutatión peroxidasa tiene una baja relación (positiva o negativa) con los parámetros viabilidad, hidrofobicidad, infectividad y termotolerancia ($r \leq 0.5$)

8.7.1 Glutatión Peroxidasa

Se midió la Actividad Glutatión Peroxidasa (**A. Gpx**) de conidios de *M. anisopliae* obtenidos con distintas condiciones oxidantes en la atmósfera de cultivo (16, 21, 30, 40 % O₂) y se observó que la A. GPx de los conidios obtenidos con 21 % O₂ incrementó a través del tiempo, alcanzando un punto máximo (132 h) que luego descendió (156 h), este descenso no se presentó con los conidios obtenidos con el resto de los tratamientos, por lo menos hasta el tiempo muestreado.

Los conidios obtenidos de las atmósferas 16, 30 y 40 % O₂ exhiben una magnitud de cambio menor con respecto a la atmósfera normal, cuando se comparó la A. GPx de los conidios a las 84 h y luego a las 132 h (donde presentan la mayor actividad enzimática) se observó que la actividad se había incrementado 2.27, 0.92 y 3.67 veces respectivamente, mientras que la A. GPx de los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales fue 8.18 veces más elevada. Nuestros resultados sugieren que los conidios cultivados en condiciones más oxidantes que 21 % O₂ están adaptados a este tipo de condiciones ambientales, adquiriendo una alta capacidad antioxidante que se ve reflejada desde los conidios que se forman tempranamente (84h); los conidios formados en los tiempos sucesivos, tienen una capacidad enzimática GPx sostenida, la cual no cambia en los últimos puntos de la cinética ($p > 0.05$) como se puede observar en la Gráfica 9 en letras mayúsculas. Esto tiene implicaciones prácticas debido a que si todos los conidios producidos en un lote tienen una actividad

antioxidante semejante, la mayoría de ellos podrían tener mejores oportunidades de sobrevivir a un ambiente oxidante.



Gráfica 9. Actividad Glutación Peroxidasa de conidios de *M. anisopliae*, obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 % ▨, 21 % ■, 30 % ■ y 40 % ▨). Las barras con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).

Los conidios son unidades de preservación que eventualmente germinan (con estímulos ambientales específicos) para iniciar de nuevo el ciclo, estos están equipados con una maquinaria de enzimas y proteínas que les permiten interrumpir su latencia. La germinación representa un cambio hacia un metabolismo respiratorio que se ha asociado a la formación de ERO (Oh et al., 2010), por lo tanto los conidios están dotados de GPx capaz de utilizar como sustrato al H₂O₂ para reducirlo a agua, a la vez que oxida al GSH que actúa como un donador de electrones, de tal manera que esta enzima contribuye a la degradación ERO. Además de H₂O₂, la GPx es capaz de reducir lipoperoxidos producto de la oxidación de lípidos, lo cual muestra la importancia de esta enzima ya que protege a las membranas previniendo la propagación de lípidos oxidados (Michiels et al., 1994).

Cuando la actividad enzimática de la GPx en el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* disminuyó, el hongo no fue capaz de infectar a su hospedero, sin embargo en el presente trabajo a pesar de que los

conidios obtenidos de las atmósferas 21 y 30 % O₂ son capaces de matar más del 80 % de larvas de *Tenebrio molitor* (sección 8.3.4), en el análisis de componentes principales (Gráfica 8) se observó que la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa tiene una baja relación ($r \leq 0.5$) con todos los parámetros de calidad medidos en esta investigación, aunque no se descarta que los conidios obtenidos con estas condiciones se relacionen con algún otro parámetro de calidad, por ejemplo la resistencia a la luz UV.

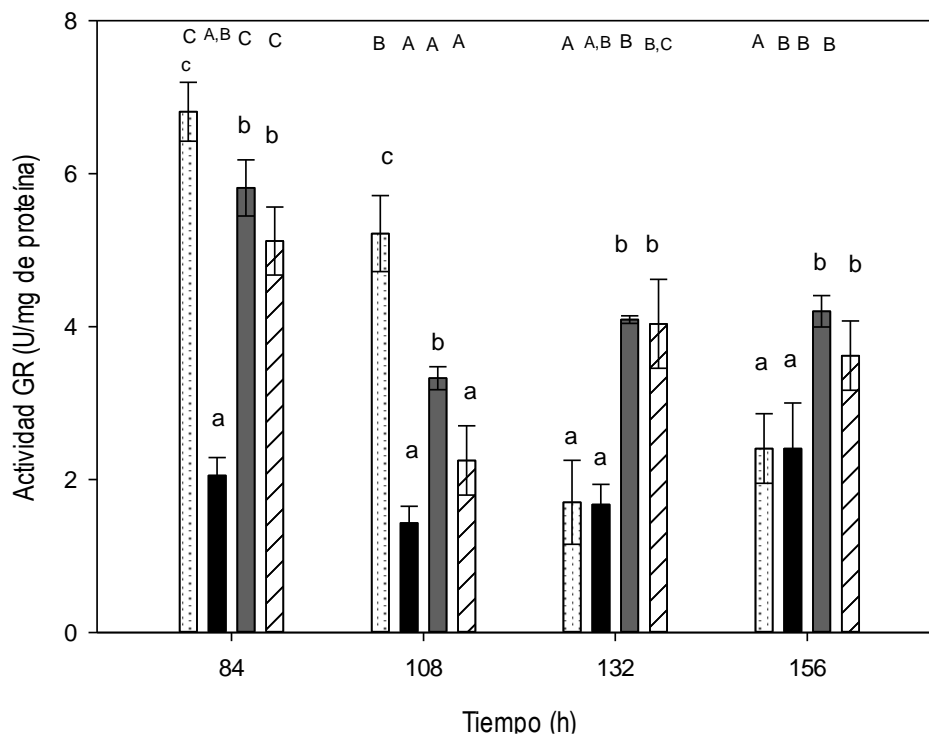
8.7.2 Glutatión Reductasa

La glutatión reductasa es la enzima que permite reciclar el GSSG oxidado por la glutatión peroxidasa (sección 8.7.1), y así recuperar el poder reductor del GSH, donde interviene un NADPH que entre otras rutas proviene de la ruta de la pentosa fosfato (Cardenas-Rodríguez et al., 2008).

La glutatión reductasa es sumamente importante debido a que permite mantener el sistema GSSG/2GSH el cual se considera el tampón de tiol-disulfuro redox más abundante en la célula, en promedio la concentración GSH en el citosol es de 1-11 mM, esta concentración es mucho más elevada que otros pares redox (Schafer y Buettner, 2001). Por otro lado se ha observado que la exposición de las células al estrés oxidante trae como consecuencia cambios rápidos en las concentraciones de GSH y GSSG, y con ello alteraciones en el ambiente oxidoreductor, además existe un rápido incremento de GSH intracelular en respuesta al estrés oxidante, también se ha demostrado que las ERO incrementan los niveles de GSH a través de la inducción de la γ -glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS), enzima que junto con la glutatión sintetasa (GS) sintetizan GSH a partir de L-glutamato, L-cisteína y L-glicina (Cardenas-Rodríguez et al., 2008).

La Actividad Glutatión Reductasa (**A. GR**) de los conidios obtenidos con las atmósferas modificadas 16, 30 y 40 % O₂ se incrementó significativamente ($p < 0.05$) 24 h después de la aplicación del primer pulso (84 h) con una concentración de oxígeno diferente a la atmósfera normal, obteniéndose así una respuesta temprana por parte del hongo a todas las atmósferas modificadas probadas (Gráfica 10). Esta respuesta temprana también se observó con la glutatión peroxidasa (sección 8.7.1). A las 84 h, la condición atmosférica que ocasionó el mayor incremento en la A.GR en comparación con los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂), fue 16% O₂ con 3.39 veces, seguido de un incremento de actividad de 2.83 veces ocasionado por la atmósfera conteniendo 30 % O₂ y finalmente un incremento de 2.49 veces ocasionado por la atmósfera conteniendo 40 % O₂. A las 108 h se observó el mismo comportamiento, mientras que a las 132 h de cultivo los conidios obtenidos

sólo bajo las atmósferas conteniendo 30 y 40 % O₂ exhibieron un incremento de 2.44 y 2.41 de A.GR respectivamente comparado con los conidios obtenidos con 21 % O₂, y finalmente a las 156 h se observó el mismo comportamiento que a las 132 h.



Gráfica 10. Actividad Glutación Reductasa de conidios de *M. anisopliae*, obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 % , 21 % , 30 % , y 40 %). Las barras con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).

La respuesta temprana que se describió sugiere que los conidios obtenidos bajo esas condiciones atmosféricas (16, 30 y 40 % O₂) necesitan del poder reductor del GSH, esto podría relacionarse con que las células que tienen una concentración de GSH más elevada podrían ser más resistentes al estrés oxidante (Schafer y Buettner, 2001), en el mismo sentido, recuperar el poder reductor es importante para los conidios de *M. anisopliae*, esto se sustenta por la proteína que participa en esta ruta de las pentosas fosfato, la transaldolasa, que se identificó en los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂, sección 8.6.3). Como se mencionó al inicio de esta sección, en la recuperación del poder reductor del GSH, interviene un NADPH que proviene de la ruta de la pentosa fosfato (Cardenas-Rodríguez et al., 2008), además el NADPH se considera como la principal fuente de equivalentes de reducción para el sistema glutatión, el cual es especialmente importante para hacer frente a un estrés oxidante (Schafer y Buettner, 2001).

La implicación que tiene el hecho que los conidios exhiban una enzima que participe en la recuperación del poder reductor, por un lado del NADPH y por otro lado del GSH, a través del incremento de la actividad glutatión reductasa, es que en la respuesta inmune del insecto a la infección por parte de los hongos entomopatógenos y en la exposición a elevadas temperaturas existen elevadas concentraciones de ERO (Abrashev et al., 2008; Kavanagh y Reeves, 2004), por lo tanto hacer frente a esta condición mejora la resistencia, esto es congruente con que existe una relación positiva entre el incremento de la actividad glutatión reductasa y la mejora de la termotolerancia (TS_{50} , $r = 0.76$; $p \geq 0.05$) en los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O_2), que reveló el análisis de componentes principales.

8.7.3 Catalasa Peroxidasa

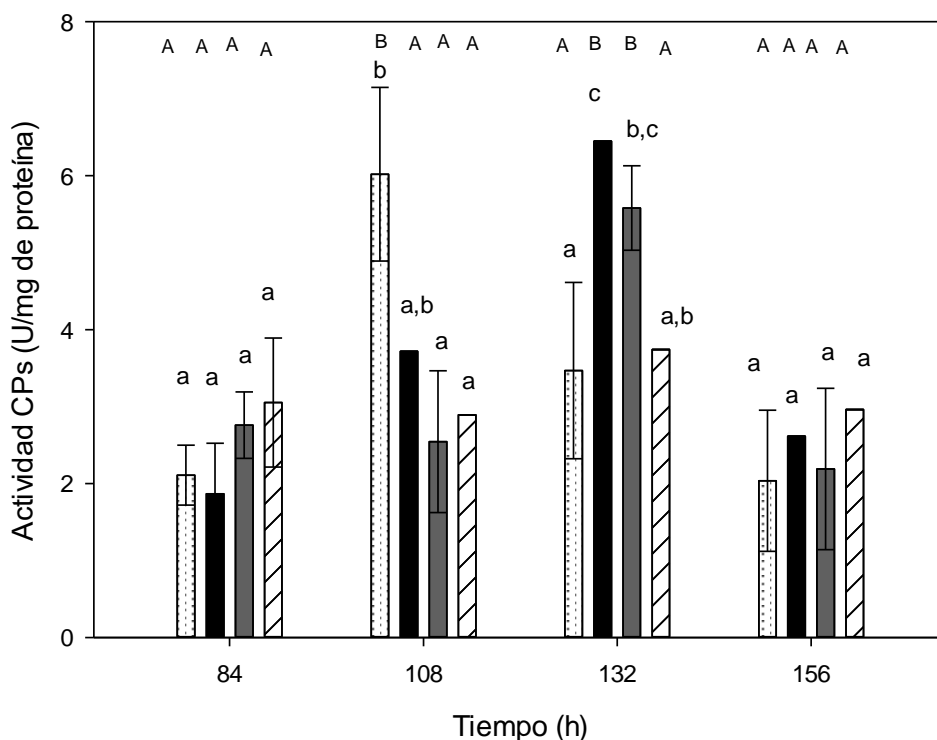
La principal fuente de H_2O_2 es la dismutación del superóxido producido en las mitocondrias, por algunas oxidasas celulares como la NADPH oxidasa y xantina oxidasa, el H_2O_2 es tóxico debido a que por medio de la reacción de Fenton, que se lleva a cabo con metales de transición Fe (II) y Cu (I). Los metales de transición pueden estar libres, unidos a proteínas o ADN y reaccionan con H_2O_2 formando radical hidroxilo que es muy reactivo y puede oxidar a los lípidos de las membranas celulares (Hansberg et al., 2012).

Varias enzimas eliminan el H_2O_2 , tales como las peroxirredoxinas, peroxidases, catalasa/peroxidases y catalasas monofuncionales. La K_M de estas enzimas varían cuatro órdenes de magnitud, lo que indica que las células tienen sistemas de eliminación de H_2O_2 a diferentes concentraciones de este. Las catalasa/peroxidases cobran importancia debido a que son enzimas bifuncionales que tienen un gran potencial para degradar H_2O_2 , más que las catalasas monofuncionales debido a que exhiben valores de K_M más bajos (Hansberg, 2002).

Se decidió medir la actividad catalasa/peroxidasa (**A. CPs**) con base en los resultados mostrados en la sección 8.6.2, donde el análisis proteómico reveló que la concentración de la catalasa/peroxidasa se incrementó en los conidios obtenidos bajo una atmósfera enriquecida con 30 % O_2 , sin embargo no se detectó la presencia de esta proteína en los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O_2) en los geles 2D SDS PAGE, aunque a la luz de los resultados mostrados en la Gráfica 11, es posible decir que la CPs se encontraba presente en los conidios obtenidos con 21 %

O₂, puesto que fue posible medir su actividad, pero el método de tinción de proteínas empleado no permitió detectarla.

En resumen, la concentración de la CPs se incrementó en los conidios obtenidos con 30% O₂, con respecto a aquellos obtenidos con 21 % O₂, sin embargo se observó que desde las 84 h y hasta las 156 h no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre estos dos tratamientos en la A. CPs (ver letras minúsculas de la Gráfica 11), posiblemente debido a la presencia de isoenzimas en los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂), es decir se elevó la concentración de una isoenzima (que fue posible detectar en los geles) pero que no presentaba la mayor actividad enzimática, de hecho hay isoenzimas de catalasas/peroxidasa que se han detectado antes en conidios de dos cepas de *M. anisopliae* (Miller et al., 2004).



Gráfica 11. Actividad Catalasa Peroxidasa de conidios de *M. anisopliae*, obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 % , 21 % , 30 % , y 40 %). Las barras con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).

El análisis de componentes principales evidenció que la actividad catalasa/peroxidasa se relaciona positivamente con los parámetros de calidad, infectividad y la viabilidad (Gráfica 8), tanto en los conidios obtenidos con atmósfera normal (21 % O₂) como con atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂).

Esta relación concuerda con el hecho de que sólo los conidios obtenidos bajo estas condiciones infectan a más del 50 % de los insectos en un bioensayo, de tal modo que sólo sobrevivieron 22.2 % y 7.6% de la población de insectos, respectivamente (sección 8.3.4), que a su vez concuerda con que los conidios obtenidos a las 132 h de las condiciones atmosféricas mencionadas, exhiben al menos un 58 % de incremento en la A. CPs, comparado con los conidios obtenidos bajo las atmósferas modificadas conteniendo 16 y 40 % O₂, las cuales disminuyeron su actividad al menos en 53.6 % comparado con la atmósfera normal y mataron menos del 50 % de las larvas de *T. molitor*. Este resultado es coherente con que sólo los conidios resisten a las condiciones oxidantes presentes durante la infección, tienen éxito en ocasionar la muerte del insecto (Kavanagh y Reeves, 2004).

De acuerdo con estos resultados, cuando los conidios de *Isaria fumosorosea* se obtuvieron a las 156 h en presencia de una atmósfera conteniendo 26 % de O₂, la actividad catalasa (total) incrementó 50 % con respecto a la atmósfera normal (Miranda-Hernández et al., 2014). En el presente estudio, este comportamiento lo ocasionó tempranamente una atmósfera pobre en oxígeno (16 % O₂), en la Gráfica 11 se observa que a las 108 h de cultivo se produce un incremento ($p < 0.05$) del 61.9 % en la A. CPs de los conidios obtenidos bajo un atmósfera conteniendo 16 % O₂, comparado con la actividad de los conidios obtenidos con atmósfera normal, en contraste, las atmósferas ricas en oxígeno (30 y 40 % O₂) no provocaron ningún incremento de la actividad significativo ($p > 0.05$) con respecto a la atmósfera normal (21 % O₂) en este tiempo de muestreo (ver letras minúsculas).

Es importante mencionar que la mayor actividad enzimática (Catalasa/Peroxidasa) exhibida por los conidios obtenidos bajo la atmósfera conteniendo 30 % O₂ se observó en un sólo punto en el tiempo (132 h, Gráfica 11, ver letras mayúsculas), para el resto de los tiempos de muestreo no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). Como se mencionó antes, la condición que provoca primero una elevación en la A. CPs es 16 % O₂ (108 h), por otro lado; la atmósfera normal (21 % O₂) y la atmósfera una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) incrementaron la actividad enzimática al mismo tiempo (132h), la atmósfera conteniendo 40 % O₂ no incrementó la A. CPs en ninguno de los puntos muestreados.

Los conidios del hongo *Isaria fumosorosea* obtenidos con 26 % O₂, tienen una viabilidad que se modifica en dos diferentes tiempos de muestreo. En cultivo superficial con la cepa *I. fumosorosea* ARSEF 3302, a las 180 h, la viabilidad de los conidios obtenidos con 26 % O₂ incrementó 27.2 % con respecto a los conidios obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂), pero el efecto

benéfico de la atmósfera rica en oxígeno desaparece a las 300 h, donde no se encontró diferencia significativa (Muñiz-Paredes et al., 2016), posiblemente porque a las 300 h disminuyó la actividad catalasa, si se relaciona ese fenómeno con el presente estudio en donde existe un incremento en la actividad de esta enzima en un sólo punto de la cinética; en el caso de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 el punto de mayor actividad CPS podría ser a las 180 h, esta es una explicación plausible puesto que el análisis de componentes principales mostró que la actividad catalasa/peroxidasa está relacionada con la viabilidad, además las catalasas son enzimas necesarias para salir de la latencia y enfrentar el nuevo metabolismo aerobio (Oh et al., 2010) y para enfrentar a las ERO que se generan por parte del insecto durante la infección (Kavanagh y Reeves, 2004).

8.7.4 Superóxido Dismutasa

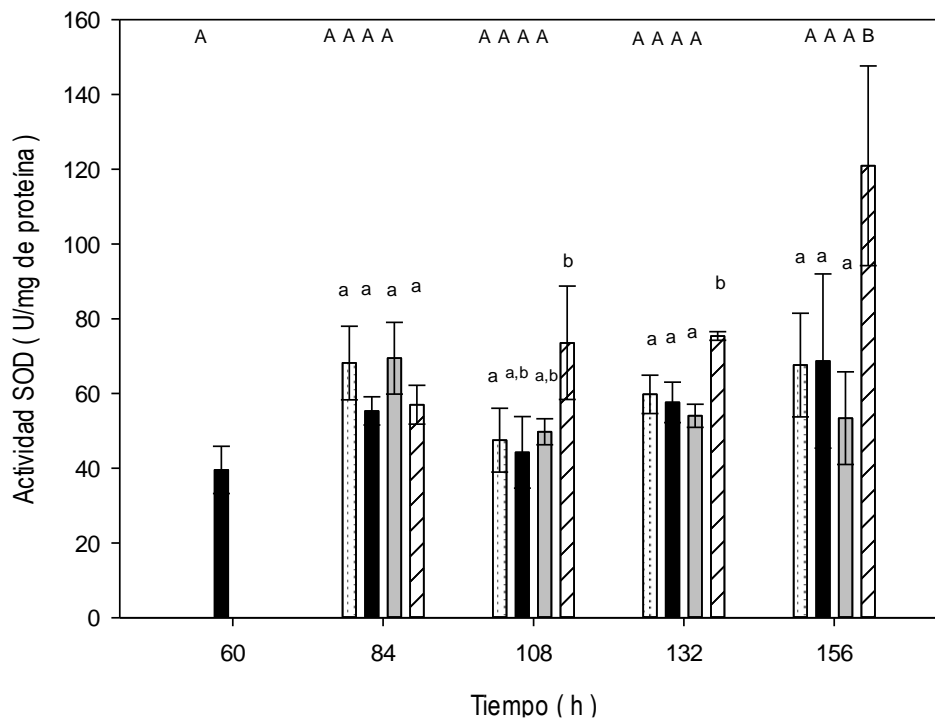
La superóxido dismutasa es una enzima antioxidante que cataliza la dismutación de dos moléculas de anión radical superóxido en moléculas de peróxido de hidrógeno y dióxígeno (Fridovich, 1989; Michiels et al., 1994), esta enzima se ha reportado como uno de los factores antioxidantes más importantes para la resistencia a la hiperoxia en células de *Saccharomyces cerevisiae* (Outten et al., 2005). Para *M. anisopliae*, esta enzima también es importante, ya que los conidios y el micelio de este hongo presenta dos isoenzimas y tres isoenzimas sólo en los conidios de la cepa *M. anisopliae* 324 (Miller et al., 2004). También se demostró que la SOD, que contiene en su centro activo Cu/Zn, juega un papel importante en el establecimiento de la infección del hongo a *Candida albicans* al protegerlo del estrés oxidante provocado por los macrófagos que producen ERO durante la infección (Hwang et al., 2002). Por su parte, los conidios de *Isaria fumosorosea* obtenidos de un medio de cultivo al cual se adicionó Cu y Zn los cuales indujeron la actividad SOD, fueron más tolerantes a la radiación UV-B, a la temperatura y exhibieron una mayor tasa de virulencia contra larvas de *Plutella xylostella*, además de que mejoró la resistencia al estrés oxidante provocado por la adición de menadiona (Ali et al., 2011).





En la presente investigación se midió la actividad total de las SOD de los conidios de *M. anisopliae*, la actividad superóxido dismutasa (**A. SOD**) de los conidios obtenidos no exhiben diferencia significativa ($p > 0.05$) en las primeras 24 h después del primer pulso (84 h), independientemente de la concentración de oxígeno bajo la cual fueron cultivados. Este efecto persiste durante toda la cinética, excepto para los conidios obtenidos bajo la atmósfera conteniendo 40 % O₂, cuyos conidios presentan la actividad enzimática más alta y que difiere de la A. SOD de los conidios obtenidos del resto de los tratamientos ($p < 0.05$); con las atmósferas modificadas (16 y 30 % O₂) y la atmósfera normal (21 %

O₂) la A. SOD exhibió valores de entre 60 y 70 U/ mg de proteína y esta actividad no difirió significativamente ($p > 0.05$) en el tiempo (Gráfica 12, ver letras mayúsculas), por otro lado la tendencia que se observa en la Gráfica 12, es que solamente la A. SOD de los conidios obtenidos bajo la atmósfera más oxidante (40 % O₂) son los que incrementan su A. SOD a través del tiempo, hasta incrementar poco más del 100 % su actividad a las 156 h. Este comportamiento se había observado antes en los conidios de *B. bassiana* que fueron expuestos a una baja (16 %) y una alta (26 %) concentración de oxígeno, comparado con la atmósfera normal, *B. bassiana* no mostró diferencias significativas entre tratamientos en 3 de los 6 días muestreados (Garza-López et al., 2012).

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indican que los conidios de *M. anisopliae* obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂), tienen una A. SOD limitada (entre 60 y 70 U/mg de proteína) y que de manera normal esta actividad es consistente en todos los conidios producidos a través del tiempo, dicho de otra manera, la A.SOD no cambia significativamente en el tiempo en estos conidios ($p < 0.05$), esto sugiere que en el momento, en que se forma un septo alrededor del cuello de la fiálide y se crea un nuevo conidio (Campbell, 1975), la enzima SOD que el micelio “preenvasa” o provee al conidio, es cuidadosamente controlada, ya que uno de sus productos (H₂O₂) podría reaccionar por medio de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, lo cual eventualmente generaría al radical hidroxilo (OH•), considerado la especie reactiva de oxígeno más peligrosa, ya que puede dañar a las membranas celulares al causar la oxidación de lípidos (Michiels et al., 1994), esta explicación podría extenderse para los conidios obtenidos bajo la atmósfera conteniendo 30 % O₂.

En contraste, los conidios obtenidos bajo un atmósfera conteniendo 40% de O₂, sí incrementan su A. SOD, esto sugiere que posiblemente hasta una concentración de 30 % O₂, *M. anisopliae* tiene la capacidad antioxidante para tolerar el incremento de oxígeno. Ali et al, (2011) y Hwang et al., (2002) reportan que la actividad superóxido dismutasa se correlacionaron positivamente con la infectividad, sin embargo en esta investigación se observó por medio del análisis de componentes principales (Gráfica 8) que actividad de la enzima superóxido dismutasa se relaciona negativamente con la infectividad (TL₅₀, $r = -0.689$ y S, $r -0.934$; $p \geq 0.05$), mientras que la A.SOD sí se relaciona con la modificación atmosférica con concentraciones de oxígeno de 16 y 40 %.



Gráfica 12. Actividad Superóxido dismutasa de conidios de *M. anisopliae*, obtenidos con distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (16 % , 21 % , 30 %  y 40 % ). Las barras con diferente letra minúscula, distinguen los grupos obtenidos entre distintos tratamientos a un solo tiempo; barras con diferente letra mayúscula distinguen los grupos obtenidos comparando el mismo tratamiento a través del tiempo (prueba de Tukey $p < 0.05$).

Recientemente se reportó que la concentración de superóxido se mantuvo alrededor de 2.5 FU/ mg de proteína en los conidios de *B. bassiana* en todos los días de muestreo, excepto en el día 7 en el que la concentración fue 25 veces mayor con los conidios obtenidos con una atmósfera rica en oxígeno (26 %) en comparación con una atmósfera normal (Pérez-Guzmán et al., 2016), este hecho podría explicar por qué en los conidios de *M. anisopliae* sólo se incrementó la actividad enzimática en el último tiempo de muestreo y con una concentración elevada de oxígeno (40 % O₂).

Apoyando la idea que el micelio “preenvasa” cuidadosamente a la SOD, es posible argumentar que especialmente en las mitocondrias debe de existir un equilibrio entre la actividad de la SOD (que genera H₂O₂) y el ciclo redox del GSH para asegurar la eliminación eficaz del H₂O₂, puesto que este organelo carece de catalasas para eliminar el H₂O₂ y cuando se disminuye la concentración de GSH mitocondrial se compromete la reducción adecuada de H₂O₂ (Fernández Checa y García Ruiz, 2008), en el presente estudio se midió la actividad SOD total, no la SOD exclusivamente mitocondrial, pero no se descarta que la falta de la elevación en la actividad SOD pueda deberse a ese hecho.

Las mitocondrias son las principales consumidoras de oxígeno molecular en la célula, y este proceso funciona como un dispositivo de transducción para promover la energía requerida para la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa. Aunque la mayor parte del oxígeno consumido durante la fosforilación oxidativa se convierte en agua, parte del oxígeno genera especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido y peróxido de hidrogeno (Fernández Checa y García Ruiz, 2008), por lo tanto es viable que las atmósfera modificadas (16, 26, 30 y 40 % O₂) ocasionen estrés oxidante en el micelio una vez que se inició la aplicación de los pulsos a las 60 h de cultivo, y como un mecanismo para aislarse de una posible elevación en las ERO, el micelio eligió la vía de la diferenciación, a conidios (Aguirre et al., 2005). Lo anterior sería la respuesta al posible estrés oxidante, previamente a la diferenciación, el micelio desarrolla varios mecanismos de respuesta para contrarrestar las consecuencias perjudiciales del estrés oxidante, entre estos procesos, las alteraciones metabólicas juegan un papel importante en las células eucariotas (Ralser et al., 2007), incluyendo a *Metarhizium anisopliae*, puesto que los resultados indican que por lo menos en los conidios obtenidos bajo una atmósfera conteniendo 30 % O₂, la síntesis de proteínas fue diferencial con respecto a aquellos obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂), sintetizando proteínas que están implicadas en el metabolismo (Grupo III, sección 8.6.3).

La formación de ERO debería disminuir con la hipoxia, ya que la concentración de oxígeno es proporcional a la formación de ERO (Turrens, 2003). Sin embargo, en esta sección se mostró que en ciertos puntos de la cinética, la atmósfera con menor concentración de oxígeno (16 %) eleva tanto las actividades enzimáticas (excepto de SOD), como lo hacen las atmósferas ricas en oxígeno (30 y 40 %), este incremento paradójico está relacionado a que en condiciones de hipoxia, se puede producir óxido nítrico, este a su vez puede reaccionar con el anión superóxido, proveniente de la cadena respiratoria mitocondrial para generar una gama de especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito (ONOO⁻), el cual puede oxidar de tioles y dañar algunas proteínas. Esto se ha demostrado en *Saccharomyces cerevisiae* (Castello et al., 2006) y es posible que este efecto se haya ocasionado en el micelio de *M. anisopliae* cuando se modificó la atmósfera (60 h) con una concentración baja de oxígeno (16 %), en consecuencia los conidios analizados muestran una mayor actividad de las enzimas antioxidantes para hacer frente a esta condición en la siguiente generación.

Finalmente, los factores que determinan el éxito de un hongo entomopatógeno son sus características de calidad, además de que los factores ambientales a los que estará expuesto y la respuesta inmune

de su hospedero responden incrementando la concentración de ERO (Inglis et al., 2001; Lovett y St. Leger, 2015). Tomando en cuenta estos factores, en este trabajo se mejoraron los parámetros de calidad por el incremento de la concentración de oxígeno bajo el cual se cultiva *M. anisopliae* (30 % O₂), esto indujo la síntesis de proteínas que participan en la resistencia al estrés, tanto al estrés oxidante (CPs) como estrés térmico (HSP88); mientras que algunas enzimas antioxidantes que también se incrementan, se relacionan con la viabilidad (CPs), la termotolerancia (GR) y la infectividad (CPs y Grupo I, sección 8.6.1).

Las cepas que no resisten a las ERO forman sectores, en los cuales no hay formación de conidios, además se nota una clara degradación de la cepa en cultivos sucesivos en medios artificiales (Wang et al., 2005). Para resolver esto, una posible aplicación, sería utilizar conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno, que serían menos sensibles a cultivos sucesivos por contener enzimas y proteínas para enfrentar el estrés oxidante, esto evitaría pérdidas económicas al evitar la formación de sectores con falta de conidios, puesto que estos son la unidad infectiva comerciable.

9 RESUMEN DE RESULTADOS

Análisis de la producción y calidad de conidios

- La mayor producción de conidios de *M. anisopliae* se encontró con atmósferas ricas en oxígeno (26 y 30 % O₂), pero la máxima productividad se encontró a las 132 h con 30 % O₂.
- El mejor punto de crecimiento del micelio de *M. anisopliae* que provoca la máxima producción de conidios (C_{max}), calculada por el modelo de Gompertz, para aplicar una atmósfera rica en oxígeno es 60 h de cultivo.
- Las atmósferas que ocasionaron que los conidios producidos por *M. anisopliae* exhiban buenos parámetros de calidad, son aquellas que contuvieron 21, 26 y 30 % de oxígeno, en especial los conidios obtenidos bajo una atmósfera conteniendo 30 % O₂ exhibieron los siguientes valores en sus parámetros, viabilidad (V, 96 %), termotolerancia (TS₅₀, 1.21 h) e infectividad (S, 22.27 %) contra una viabilidad (V, 79.66 %), termotolerancia (TS₅₀, 0.76 h) e infectividad (S, 7.6 %) presentada por los conidios obtenidos bajo una atmósfera normal (21 % O₂).
- Las atmósferas que ocasionan que los conidios producidos por *M. anisopliae* exhiban pobres valores en los parámetros de calidad, viabilidad, hidrofobicidad, e infectividad son aquellas que contienen 16 y 40 % O₂.

Análisis del perfil proteómico

- Para extraer proteína intracelular de conidios de *M. anisopliae*, fue necesario someter a rompimiento a los conidios con perlas de vidrio al menos 6 min para asegurar el rompimiento del 99 % de conidios.
- La electroforesis con geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes parece ser una buena técnica para la detección de proteínas degradadas.
- El análisis del perfil proteómico de los conidios obtenidos bajo una atmósfera rica en oxígeno, conteniendo 30% O₂ y aquellos obtenidos bajo una atmósfera normal (21 % O₂), reveló que los conidios de *M. anisopliae* obtenidos con la atmósfera rica en oxígeno contienen una dotación “preenvasada” de proteínas, principalmente aquellas que están implicadas con la infectividad, resistencia al estrés, metabolismo y con función desconocida que están relacionadas con la mejora de dos parámetros de calidad (termotolerancia e infectividad). Por otro lado, recuperar el poder reductor es importante para los conidios de *M. anisopliae*, puesto que entre las proteínas que participan en el metabolismo (Grupo II) se identificó a la transaldolasa, que participa en la ruta de las pentosas fosfato.

Análisis de las enzimas antioxidantes

- Los conidios de *M. anisopliae* cultivados en condiciones más oxidantes que 21 % O₂ adquirieron una alta capacidad antioxidante (incremento en de la actividad Glutación peroxidasa) que se ve reflejada desde los conidios que se forman tempranamente (84h), aunque el análisis de componentes principales reveló una baja relación con los parámetros de calidad con la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.
- Desde las 84 h, la actividad glutatión reductasa de los conidios que fueron cultivados en atmosferas modificadas (16, 30 y 40 % O₂) se incrementó 3.39, 2.83 y 2.49 respectivamente, respecto a la actividad de los conidios cultivados bajo una condición atmosférica (21 % O₂), este comportamiento se mantuvo hasta las 156h en los conidios cultivados bajo las atmósferas más oxidantes (30 y 40 % O₂), por otro lado el análisis de componentes principales mostró que existe relación positiva entre el incremento de la actividad glutatión reductasa y la mejora en la termotolerancia de los conidios de *M. anisopliae* obtenidos bajo una atmósfera conteniendo 30 % de O₂
- La mayor actividad enzimática (Catalasa/Peroxidasa) exhibida por los conidios obtenidos bajo la atmósfera conteniendo 30 % O₂ con respecto a la atmósfera normal, se observó en un solo punto de la cinética (132 h). El análisis de componentes principales evidenció que la actividad catalasa/peroxidasa se relaciona con los parámetros de calidad, infectividad y viabilidad, tanto en los conidios obtenidos con atmósfera normal (21 % O₂) como con atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂), esta relación concuerda con el hecho de que sólo los conidios obtenidos bajo estas condiciones infectan a más del 80 % de los insectos en un bioensayo.
- Los conidios de *M. anisopliae* obtenidos no exhiben diferencia significativa ($p > 0.05$) en su actividad superóxido dismutasa en las primeras 24 h después del primer pulso (84 h), independientemente de la concentración de oxígeno bajo la cual fueron cultivados, este efecto persiste durante toda la cinética, excepto para los conidios obtenidos bajo la atmósfera conteniendo 40 % O₂, la actividad de la enzima se encontró limitada entre 60 y 70 U/mg de proteína, por su parte, se observó por medio del análisis de componentes principales que actividad de la enzima SOD se ve relacionada negativamente con la infectividad.

10 CONCLUSIÓN

La exposición de un micelio competente de *Metarhizium anisopliae* (60 h) a una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) mejoró la producción y calidad de sus conidios con respecto aquellos obtenidos bajo condiciones atmosféricas normales (21 % O₂), debido al incremento de la síntesis de un grupo de enzimas (II) que le permitieron resistir al estrés (oxidante o por temperatura).

La modificación de la atmósfera con oxígeno conteniendo 30 % resultó ser una buena estrategia para mejorar la infectividad de los conidios con respecto aquellos cultivados bajo una atmósfera conteniendo 21 % O₂, debido a que estos sintetizan diferencialmente un grupo de proteínas (I) implicadas en la infectividad, a la vez que la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa y catalasa / peroxidasa se elevan y se relacionan con los parámetros de calidad virulencia e infectividad. Por un lado, la atmósfera modificada conteniendo 16 % O₂ no mejoró ningún parámetro de calidad de los conidios de *M. anisopliae*, debido a que no se relacionan con ninguna enzima antioxidante que mejore estos parámetros, y por otro lado, la atmósfera modificada conteniendo 40 % O₂ sólo mejoró la termotolerancia de los conidios debido a que este tratamiento se relaciona con la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.

Es importante mantener el poder reductor del NADPH y el GSH para *M. anisopliae* debido a que provee a sus conidios obtenidos con una atmósfera rica en oxígeno (30 % O₂) de dos proteínas importantes, una que participan en la vía de la pentosa fosfato (transaldolasa) y otra en el ciclo del glutatión (glutatión reductasa), en la cual se eleva la actividad.

La modificación atmosférica en el cultivo de *M. anisopliae* es un fenómeno que involucra respuestas multifactoriales para la síntesis de proteínas, incluyendo enzimas antioxidantes. Algunas de estas proteínas participan en la reprogramación de metabolismo de carbohidratos para recuperar el poder reductor.

11 PERSPECTIVAS

- ▶ Realizar pruebas de resistencia a la luz UV- B, para determinar si una elevada concentración (30 % O₂) de oxígeno puede incrementar la resistencia de los conidios
- ▶ Cuantificación de especies reactivas de oxígeno
- ▶ Analizar si el efecto benéfico sobre parámetros de calidad ocasionado por una concentración elevada de oxígeno puede transmitirse a la siguiente generación de conidios de *M. anisopliae*.
- ▶ Evaluar si los conidios que presentan enzimas de protección contra estrés (Grupo II) pueden ser más estables cuando son cultivados sucesivamente en medios de cultivo artificiales.
- ▶ Agotar en las muestras de proteína intracelular de conidios de *M. anisopliae* las proteínas más abundantes y realizar nuevamente geles 2D SDS PAGE
- ▶ Corroborar el incremento de la expresión de los genes de las proteínas identificadas por qPCR (quantitative polymerase chain reaction)
- ▶ Realizar el análisis proteómico de los conidios de *M. anisopliae* obtenidos bajo las atmósferas modificadas 16 y 40 % O₂ que pueda dar indicios del porque estos conidios tienen en general una mala calidad.
- ▶ Determinar el estado oxido reducción con los pares GSSG/ 2GSH y NAPD+/NADPH

12 REFERENCIAS

- Abrashev, R. I. A. I., Pashova, S. B. P. B., Stefanova, L. N. S. N., Vassilev, S. V. V. V., Dolashka-Angelova, P. A. D.-A. A., & Angelova, M. B. A. B. (2008). Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(12), 977–983. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1139/W08-091>
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3), 111–118. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>
- Ahsan, N., Lee, S.-H., Lee, D.-G., Lee, H., Lee, S. W., Bahk, J. D., & Lee, B.-H. (2007). Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *Comptes Rendus Biologies*, 330(10), 735–46. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2007.08.001>
- Alatorre-Rosas, R. (2007). Hongos entomopatógenos. In L. A. Arredondo-Bernal & R.-B. H.C. (Eds.), *Teoría y aplicación del control biológico*. (pp. 127–143). México: Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Ali, S., Wang, Z., Ren, S., & Huang, Z. (2011). Superoxide dismutase production by *Isaria fumosorosea* on metals and its role in stress tolerance and fungal virulence. *Biocontrol Science and Technology*, 21(12), 1457–1469. <http://doi.org/10.1080/09583157.2011.635784>
- Altre, J. ., & Vandenberg, J. . (2001). Penetration of Cuticle and Proliferation in Hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates That Differ in Virulence against Lepidopteran Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 81–86. <http://doi.org/10.1006/jipa.2001.5046>
- Altre, J. ., Vandenberg, J. ., & Cantone, F. . (1999). Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback Moth, *Plutella xylostella*: Correlation with Spore Size, Germination Speed, and Attachment to Cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(3), 332–338. <http://doi.org/10.1006/jipa.1999.4844>
- Amanatidou, A., Slump, R. A., Gorris, L. G. M., & Smid, E. J. (2000). High Oxygen and High Carbon Dioxide Modified Atmospheres for Shelf-life Extension of Minimally Processed Carrots. *Journal of Food Science*, 65(1), 61–66. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15956.x>
- Amanatidou, A., Smid, E. J., & Gorris, L. G. M. (1999). Effect of elevated oxygen and carbon dioxide on the surface growth of vegetable-associated micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 429–438. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00682.x>
- Baral, P. K., Jajčanin-Jozić, N., Deller, S., Macheroux, P., Abramić, M., & Gruber, K. (2008). The First Structure of Dipeptidyl-peptidase III Provides Insight into the Catalytic Mechanism and Mode of Substrate Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 283(32), 22316–22324. <http://doi.org/10.1074/jbc.M803522200>
- Barros, B. H. R., da Silva, S. H., Marques, E. dos R., Rosa, J. C., Yatsuda, A. P., Roberts, D. W., & Braga, G. U. L. (2010). A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Fungal Biology*, 114(7), 572–579. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.04.007>
- Belozerskaya, T. A., & Gessler, N. N. (2006). Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 75(4), 427–431. <http://doi.org/10.1134/S0026261706040102>
- Bergin, D., Reeves, E. P., Renwick, J., Wientjes, F. B., & Kavanagh, K. (2005). Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infection and Immunity*, 73(7), 4161–70. <http://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4161-4170.2005>
- Bidochka, M. J., Clark, D. C., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2010). Could insect phagocytic avoidance by entomogenous fungi have evolved via selection against soil amoeboid predators? *Microbiology*, 156(7), 2164–2171. <http://doi.org/10.1099/mic.0.038216-0>
- Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G. (1991). The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in

- pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(1), 106–117. [http://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90168-P](http://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90168-P)
- Bidochka, M. J., St Leger, R. J., Joshi, L., & Roberts, D. W. (1995). The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycological Research*, 99(4), 403–406. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80637-0](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80637-0)
- Björhall, K., Miliotis, T., & Davidsson, P. (2005). Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*, 5(1), 307–17. <http://doi.org/10.1002/pmic.200400900>
- Blanford, S., & Thomas, M. B. (2000). Thermal Behavior of Two Acridid Species: Effects of Habitat and Season on Body Temperature and the Potential Impact on Biocontrol with Pathogens. *Environmental Entomology*, 29(5).
- 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(7), 1795–805. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347689>
- Boveris, A., & Cadenas, E. (2001). Mitochondrial Production of Hydrogen Peroxide Regulation by Nitric Oxide and the Role of Ubisemiquinone. *IUBMB Life*, 50(4), 245–250. <http://doi.org/10.1080/713803732>
- Boveris, A., Repetto, M. G., Boveris, A. D., & Valdéz, L. B. (2008). Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. In M. Konigsberg-Fainstein (Ed.), *Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas*. (El manual moderno, pp. 319–328). México.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braga, G. U. ., Destéfano, R. H. ., & Messias, C. L. (1999). Oxygen Consumption by *Metarhizium anisopliae* during Germination and Growth on Different Carbon Sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(2), 112–119. <http://doi.org/10.1006/jipa.1999.4872>
- Braga, G. U. L., Rangel, D. E. N., Flint, S. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2006). Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 82(2), 418. <http://doi.org/10.1562/2005-05-08-RA-52>
- Breitenbach, M., Simon, B., Probst, G., Oberkofler, H., Ferreira, F., Briza, P., ... Hirschwehr, R. (1997). Enolases Are Highly Conserved Fungal Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 113(1-3), 114–117. <http://doi.org/10.1159/000237521>
- Brownbridge, M., Costa, S., & Jaronski, S. T. (2001). Effects of in Vitro Passage of *Beauveria bassiana* on Virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(4), 280–283. <http://doi.org/10.1006/jipa.2001.5020>
- Butt, T. M., & Goettel, M. S. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. In A. Navon & K. R. S. Ascher (Eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. (pp. 141–195). Wallingford: CABI. <http://doi.org/10.1079/9780851994222.0141>
- Campbell, R. (1975). The Ultrastructure of the Formation of Chains of Conidia in *Memnoniella echinata*. *Mycologia*, 67(4), 760. <http://doi.org/10.2307/3758337>
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., ... Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327–33. <http://doi.org/10.1002/elps.200305844>
- Cardenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O. N., & Pedraza-Chaverrí, J. (2008). Glutación peroxidasas: una familia de enzimas. In M. Konigsberg Fainstein (Ed.), *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*. (El manual moderno, pp. 201–216). México.

- Castello, P. R., David, P. S., McClure, T., Crook, Z., Poyton, R. O., Agani, F. H., ... Poyton, R. O. (2006). Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism*, 3(4), 277–287. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.011>
- Chalabi, M., Khademi, F., Yarani, R., & Mostafaie, A. (2014). Proteolytic Activities of Kiwifruit Actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on Different Fibrous and Globular Proteins: A Comparative Study of Actinidin with Papain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 4025–4037. <http://doi.org/10.1007/s12010-014-0812-7>
- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., & Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11715–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751731>
- Cherry, A. J., Jenkins, N. E., Hevief, G., Bateman, R., & Lomer, C. J. (1999). Operational and Economic Analysis of a West African Pilotscale Production Plant for Aerial Conidia of *Metarhizium* spp. for Use as a Mycoinsecticide Against Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), 35–51. <http://doi.org/10.1080/09583159929893>
- Conesa, A., Punt, P. J., van Lwijk, N., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (2001). The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. *Fungal Genetics and Biology*, 33(3), 155–171. <http://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1276>
- Consortium, T. U. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D204–D212. <http://doi.org/10.1093/nar/gku989>
- Coon, M. J., Ding, X. X., Pernecky, S. J., & Vaz, A. D. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB Journal*, 6(2), 669–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537454>
- Corrêa, T. L. R., Zubieta, M. P., Teixeira, J. A., de Queiroz, M. V., & de Araújo, E. F. (2013). Carboxyl ester hydrolase from *Penicillium expansum*: cloning, characterization and overproduction by *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 114–124. <http://doi.org/10.1111/jam.12215>
- Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N., Santi, L., Broetto, L., Vainstein, M. H., Meyer-Fernandes, J. R., ... Beys-da-Silva, W. O. (2013). Inhibition of Ecto-Phosphatase Activity in Conidia Reduces Adhesion and Virulence of *Metarhizium anisopliae* on the Host Insect *Dysdercus peruvianus*. *Current Microbiology*, 66(5), 467–474. <http://doi.org/10.1007/s00284-012-0296-z>
- Crespo, R., Pedrini, N., Juárez, M. P., & Dal Bello, G. M. (2008). Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research*, 163(2), 148–151. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.013>
- Culotta, V. C. (2001). Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current Topics in Cellular Regulation*, 36, 117–132. [http://doi.org/10.1016/S0070-2137\(01\)80005-4](http://doi.org/10.1016/S0070-2137(01)80005-4)
- Dawkar, V. V., Chikate, Y. R., Lomate, P. R., Dholakia, B. B., Gupta, V. S., & Giri, A. P. (2013). Molecular Insights into Resistance Mechanisms of Lepidopteran Insect Pests against Toxicants. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 4727–4737. <http://doi.org/10.1021/pr400642p>
- Díaz, A., Muñoz-Clares, R. A., Rangel, P., Valdés, V.-J., & Hansberg, W. (2005). Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie*, 87(2), 205–214. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.014>
- Dorta, B., Ertola, R. J., & Arcas, J. (1996). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), 434–439. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00017-8](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00017-8)
- Dunlap, C. A., Evans, K. O., Theelen, B., Boekhout, T., & Schisler, D. A. (2007). Osmotic shock tolerance and membrane fluidity of cold-adapted *Cryptococcus flavescens* OH 182.9, previously reported as *C. nodaensis*, a biocontrol agent of *Fusarium* head blight. *FEMS Yeast Research*, 7(3), 449–458. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00193.x>

- Echan, L. A., Tang, H.-Y., Ali-Khan, N., Lee, K., & Speicher, D. W. (2005). Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *PROTEOMICS*, 5(13), 3292–3303. <http://doi.org/10.1002/pmic.200401228>
- Eggert, T., van Pouderooyen, G., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B. W., & Jaeger, K.-E. (2002). Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26(1), 37–46. [http://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00033-4](http://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00033-4)
- Eisenman, H. C., & Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 931–40. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3777-2>
- Evans, M. V., Turton, H. E., Grant, C. M., & Dawes, I. W. (1998). Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 483–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457848>
- Faria, M. R. de, & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Faria, M., Hotchkiss, J. H., & Wraight, S. P. (2012). Application of modified atmosphere packaging (gas flushing and active packaging) for extending the shelf life of *Beauveria bassiana* conidia at high temperatures. *Biological Control*, 61(1), 78–88. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.008>
- Farenhorst, M., Mouatcho, J. C., Kikankie, C. K., Brooke, B. D., Hunt, R. H., Thomas, M. B., ... Coetzee, M. (2009). Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), 17443–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0908530106>
- Fernández Checa, J. C., & García Ruiz, A. (2008). Glutación. In M. Konigsberg-Fainstein (Ed.), *Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas*. (El manual moderno, pp. 253–266). México.
- Fernández-Acero, F. J., Colby, T., Harzen, A., Carbú, M., Wieneke, U., Cantoral, J. M., & Schmidt, J. (2010). 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *PROTEOMICS*, 10(12), 2270–2280. <http://doi.org/10.1002/pmic.200900408>
- Ferreira de Oliveira, J. M. P., van Passel, M. W. J., Schaap, P. J., & de Graaff, L. H. (2011). Proteomic Analysis of the Secretory Response of *Aspergillus niger* to D-Maltose and D-Xylose. *PLoS ONE*, 6(6), e20865. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020865>
- Fischer, R., & Kües, U. (2006). Asexual Sporulation in Mycelial Fungi. In *Growth, Differentiation and Sexuality* (pp. 263–292). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. http://doi.org/10.1007/3-540-28135-5_14
- Freimoser, F. M., Hu, G., & Leger, R. J. S. (2005). Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*, 151(2), 361–371. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27560-0>
- Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 7761–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2542241>
- Fridovich, I. (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 97–112. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Fuchs, F., Prokisch, H., Neupert, W., & Westermann, B. (2002). Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Journal of Cell Science*, 115(9).
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S.-H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., ... Wang, C. (2011). Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*, 7(1), e1001264. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>

- García Ortiz, N. (2012). *Producción de conidios de Metarhizium anisopliae var. Lepidiotum en atmósferas oxidantes*. Universidad Autónoma Metropolitana. Obtenido de <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=210389335&docs=210389335.PDF>
- 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(1), 353–359. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0827-y>
- Garza-López, P. M., Suárez-Vergel, G., Hamdan-Partida, A., & Loera, O. (2015). Variations in oxygen concentration cause differential antioxidant response and expression of related genes in *Beauveria bassiana*. *Fungal Biology*, 119(4), 257–263. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.012>
- Goettel, M. S., & Inglis, G. D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 213–249). San Diego: Academic Press.
- Grant, C. M., MacIver, F. H., & Dawes, I. W. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 29(6), 511–515. <http://doi.org/10.1007/BF02426954>
- Graves, P. R., & Haystead, T. A. J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 66(1), 39–63; table of contents. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002>
- Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, B. R., & Nevalainen, H. (2005). Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 47(6), 381–388. <http://doi.org/10.1007/s00294-005-0575-3>
- Halliwell, B. (1995). The Biological Significance of Oxygen-Derived Species. In *Active Oxygen in Biochemistry* (pp. 313–335). Dordrecht: Springer Netherlands. http://doi.org/10.1007/978-94-011-0609-2_7
- Hallsworth, J. E., & Magan, N. (1995). Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology*, 141(5), 1109–1115. <http://doi.org/10.1099/13500872-141-5-1109>
- Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico, UNAM*, 19–54.
- Hansberg, W., & Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology*, 142(2), 201–221. [http://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80222-X](http://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80222-X)
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 170–180. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.014>
- Hu, S., Loo, J. A., & Wong, D. T. (2006). Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*, 6(23), 6326–53. <http://doi.org/10.1002/pmic.200600284>
- Huang, H., Rong, H., Li, X., Tong, S., Zhu, Z., Niu, L., & Teng, M. (2008). The crystal structure and identification of NQM1/YGR043C, a transaldolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73(4), 1076–1081. <http://doi.org/10.1002/prot.22237>
- Hunt, S. M. N., Thomas, M. R., Sebastian, L. T., Pedersen, S. K., Harcourt, R. L., Sloane, A. J., & Wilkins, M. R. (2005). Optimal Replication and the Importance of Experimental Design for Gel-Based Quantitative Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 4(3), 809–819. <http://doi.org/10.1021/pr049758y>
- Hwang, C.-S., Rhie, G., Oh, J.-H., Huh, W.-K., Yim, H.-S., & Kang, S.-O. (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*, 148(11), 3705–3713. <http://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3705>
- Iida, H., & Yahara, I. (1985). Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature*, 315(6021), 688–690. <http://doi.org/10.1038/315688a0>

- Imberty, A., Mitchell, E. P., & Wimmerová, M. (2005). Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(5), 525–534. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.08.003>
- Imberty, A., Wimmerová, M., Mitchell, E. P., & Gilboa-Garber, N. (2004). Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes and Infection*, 6(2), 221–228. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.10.016>
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential* (pp. 23–55). New York: CABI Publishing.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 23–69). Wallingford: CABI. <http://doi.org/10.1079/9780851993560.0023>
- Inglis, G. D., Johnson, D. L., & Goettel, M. S. (1996). Effects of Temperature and Thermoregulation on Mycosis by *Beauveria bassianai* Grasshoppers. *Biological Control*, 7(2), 131–139. <http://doi.org/10.1006/bcon.1996.0076>
- Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113(8), 842–850. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Van der Steen, C., & Debevere, J. (2001). Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2), 197–210. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00616-X](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00616-X)
- Jajčanin - Jozić, N., Deller, S., Pavkov, T., Macheroux, P., & Abramić, M. (2010). Identification of the reactive cysteine residues in yeast dipeptidyl peptidase III. *Biochimie*, 92(1), 89–96. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.09.014>
- Jaronski, S. T., & Jackson, M. A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In *Manual of techniques in invertebrate pathology, 2nd ed. Academic Press, London, UK* (pp. 255–284,).
- Jeffs, 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 general *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolyocladium*, and *Verticillium*. <http://dx.doi.org/10.1139/w99-097>.
- Jenkins, N. E., & Grzywacz, D. (2000). Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753–777. <http://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Johansson, L. H., & Håkan Borg, L. A. (1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, 174(1), 331–336. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90554-4](http://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90554-4)
- Juárez, M. P., & Fernández, G. C. (2007). Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(3), 711–730. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.031>
- Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B. L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., ... Hata, T. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 112(5), 583–591. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.12.004>
- Kavanagh, K., & Reeves, E. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(1), 101–12. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002>
- Khachatourians, G. G. (1996). Biochemistry and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. In *Human and Animal Relationships* (pp. 331–363). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-662-10373-9_17
- Kniemeyer, O., Lessing, F., & Brakhage, A. A. (2009). Proteome analysis for pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 47 Suppl 1, S248–54. <http://doi.org/10.1080/13693780802169138>

- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S. A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C. H., ... Koonin, E. V. (2005). Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 263–79. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.006>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- Lalucque, H., Silar, P., Meier, B., Bolwell, G. ., al., et, Lambeth, J., ... al., et. (2003). NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends in Microbiology*, 11(1), 9–12. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)00007-0](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00007-0)
- Lamarre, C., Sokol, S., Debeaupuis, J.-P., Henry, C., Lacroix, C., Glaser, P., ... Buchrieser, C. (2008). Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics*, 9(1), 417. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-417>
- Lastra, C. C. L., Hajek, A. E., & Humber, R. A. (2011). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. <http://dx.doi.org/10.1139/b02-090>.
- Lee, K. H., Lockhart, D., Winzeler, E., Selinger, D., al., et, Anderson, L., ... Strohman, R. . (2001). Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends in Biotechnology*, 19(6), 217–22. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01639-0](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01639-0)
- Li, B., Lai, T., Qin, G., & Tian, S. (2010). Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: a proteomic-based study. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 298–307. <http://doi.org/10.1021/pr900622j>
- Li, J., & Feng, M.-G. (2009). Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research*, 113(1), 93–99. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.08.006>
- Lindahl, R. (1992). Aldehyde Dehydrogenases and Their Role in Carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4-5), 283–335. <http://doi.org/10.3109/10409239209082565>
- Linke, T., Doraiswamy, S., & Harrison, E. H. (2007). Rat plasma proteomics: Effects of abundant protein depletion on proteomic analysis. *Journal of Chromatography B*, 849(1), 273–281. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.051>
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., Tian, S., & Farrell, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 578–590. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01324.x>
- Liu, Y., Kern, J. T., Walker, J. R., Johnson, J. A., Schultz, P. G., & Luesch, H. (2007). A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5205–10. <http://doi.org/10.1073/pnas.0700898104>
- Liu, Y.-Q., Park, N. S., Kim, Y. G., Kim, K. K., Park, H. C., Son, H. J., ... Lee, S. M. (2014). Molecular Cloning of the cDNA of Heat Shock Protein 88 Gene from the Entomopathogenic Fungus, *Paecilomyces tenuipes* Jocheon-1. *International Journal of Industrial Entomology*, 28(2), 71–84. <http://doi.org/10.7852/ijie.2014.28.2.71>
- Liu, Y.-Q., Park, N.-S., Kim, Y.-G., Kim, K.-K., Park, H.-C., Son, H.-J., & Lee, S.-M. (2012). Comparison of the Genomic Structure of the Heat Shock Protein-88(Hsp88) Genes in the Four Entomopathogenic Fungal Strains, *Paecilomyces tenuipes* Jocheon-1, *P. tenuipes*, *Cordyceps militaris*, and *C. pruinosa*. *International Journal of Industrial Entomology*, 25(1), 99–110. <http://doi.org/10.7852/ijie.2012.25.1.099>
- Lovett, B., & St. Leger, R. J. (2015). Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. *Current Genetics*, 61(3), 253–261. <http://doi.org/10.1007/s00294-014-0447-9>
- Lubec, G., Afjehi-Sadat, L., Yang, J.-W., & John, J. P. P. (2005). Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. *Progress in Neurobiology*, 77(1), 90–127.

<http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.10.001>

- Luthra, P. M., & Singh, S. (2010). Identification and optimization of tyrosine hydroxylase activity in *Mucuna pruriens* DC. var. utilis. *Planta*, 231(6), 1361–1369. <http://doi.org/10.1007/s00425-010-1140-y>
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., ... Yamamoto, T. (2014). Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical Proteomics*, 11(1), 16. <http://doi.org/10.1186/1559-0275-11-16>
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., & Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 982–997. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.07.008>
- Mantilla, J. G., Galeano, N. F., Gaitan, A. L., Cristancho, M. A., Keyhani, N. O., & Gongora, C. E. (2012). Transcriptome analysis of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* grown on cuticular extracts of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Microbiology*, 158(Pt_7), 1826–1842. <http://doi.org/10.1099/mic.0.051664-0>
- Marcus, R., & Eaves, D. M. (2000). Statistical and computational analysis of bioassay data. In *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. (pp. 249–293). Wallingford: CABI. <http://doi.org/10.1079/9780851994222.0249>
- Matsumura, K., Higashida, K., Ishida, H., Hata, Y., Yamamoto, K., Shigeta, M., ... Taniguchi, N. (2007). Carbohydrate Binding Specificity of a Fucose-specific Lectin from *Aspergillus oryzae*: A novel probe for core fucose. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15700–15708. <http://doi.org/10.1074/jbc.M701195200>
- McCune, B., Grace, J. B., & Urban, D. L. (2002). Data transformations. In *Analysis of ecological communities* (pp. 67–79). MjM software design Gleneden Beach, OR.
- Menonides, F. I. C., Brul, S., Klis, F. M., Hellingwerf, K. J., & Teixeira de Mattos, M. J. (2005). Activation of the Protein Kinase C1 Pathway upon Continuous Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae* Is Triggered by an Intracellular Increase in Osmolarity due to Trehalose Accumulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4531–4538. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4531-4538.2005>
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., & Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 17(3), 235–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7982629>
- Miller, C. D., Rangel, D., Braga, G. U., Flint, S., Kwon, S.-I., Messias, C. L., ... 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(1), 41–49. <http://doi.org/10.1139/w03-097>
- Miranda Hernández, J. F. (2014). Producción de conidios de hongos entomopatógenos en estado oxidante y análisis de su respuesta a distintos tipos de estrés. Universidad Autónoma Metropolitana. Obtenido de <http://tesiामी.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=16535&docs=UAMI16535.pdf>
- Miranda-Hernández, F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2014). Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Science*, 70(4), 661–666. <http://doi.org/10.1002/ps.3605>
- Montesinos-Matías, R., Viniestra-González, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2011a). 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(9), 2095–2102. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0672-z>
- 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(3), 1033–1044. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2517-3>

- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*(4), 1157–95. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Muñiz-Paredes, F., Garza-López, P. M., Viniegra-González, G., & Loera, O. (2016). Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(7), 111. <http://doi.org/10.1007/s11274-016-2072-x>
- Murad, A. M., Noronha, E. F., Miller, R. N. G., Costa, F. T., Pereira, C. D., Mehta, A., ... Franco, O. L. (2008). Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*. *Microbiology*, *154*(12), 3766–3774. <http://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022913-0>
- Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2002). Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis*, *23*(14), 2216–22. [http://doi.org/10.1002/1522-2683\(200207\)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y](http://doi.org/10.1002/1522-2683(200207)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y)
- Napolitano, R., & Juárez, M. P. (1997). Entomopathogenous Fungi Degrade Epicuticular Hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *344*(1), 208–214. <http://doi.org/10.1006/abbi.1997.0163>
- Nappi, A. J., & Christensen, B. M. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *35*(5), 443–459. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014>
- Oh, Y. T., Ahn, C.-S., Kim, J. G., Ro, H.-S., Lee, C.-W., & Kim, J. W. (2010). Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, *47*(3), 246–253. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.11.002>
- Outten, C. E., Falk, R. L., Culotta, V. C., O'Reilly, M. A., Boveris, A., Chance, B., ... Welty, S. E. (2005). Cellular factors required for protection from hyperoxia toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*, *388*(Pt 1), 93–101. <http://doi.org/10.1042/BJ20041914>
- Pandey, A. K., Jain, P., Podila, G. K., Tudzynski, B., & Davis, M. R. (2009). Cold induced *Botrytis cinerea* enolase (BcEnol-1) functions as a transcriptional regulator and is controlled by cAMP. *Molecular Genetics and Genomics*, *281*(2), 135–146. <http://doi.org/10.1007/s00438-008-0397-3>
- Papapostolou, I., & Georgiou, C. D. (2010). Superoxide radical is involved in the sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi: identification of a fungal xanthine oxidase. *Fungal Biology*, *114*(5), 387–395. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.01.010>
- Passardi, F., Zamocky, M., Favet, J., Jakopitsch, C., Penel, C., Obinger, C., & Dunand, C. (2007). Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: Are there patches of order in chaos? *Gene*, *397*(1), 101–113. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.016>
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., & Keyhani, N. O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 24. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00024>
- Pérez-Guzmán, D., Montesinos-Matías, R., Arce-Cervantes, O., Gómez-Quiroz, L. E., Loera, O., & Garza-López, P. M. (2016). Reactive oxygen species production, induced by atmospheric modification, alter conidial quality of *Beauveria bassiana*. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(2), 453–60. <http://doi.org/10.1111/jam.13156>
- Perl, A. (2007). The pathogenesis of transaldolase deficiency. *IUBMB Life*, *59*(6), 365–373. <http://doi.org/10.1080/15216540701387188>
- Perrone, G. G., Tan, S.-X., & Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1783*(7), 1354–1368. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>
- Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*, *293*(1), 157–166. [http://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00246-6](http://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00246-6)

- Plesofsky-Vig, N., & Brambl, R. (1998). Characterization of an 88-kDa heat shock protein of *Neurospora crassa* that interacts with Hsp30. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11335–41. <http://doi.org/10.1074/JBC.273.18.11335>
- Pócsi, I., Prade, R. A., & Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49, 1–76. [http://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49001-8](http://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49001-8)
- Prajapati, S. C., & Chauhan, S. S. (2011). Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS Journal*, 278(18), 3256–3276. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08275.x>
- Pucheta Díaz, M., Flores Macias, A., Rodríguez Navarro, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismos de acción de los Hongos Entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856–860.
- Quash, G., Fournet, G., Chantepie, J., Gore, J., Ardiet, C., Ardail, D., ... Reichert, U. (2002). Novel competitive irreversible inhibitors of aldehyde dehydrogenase (ALDH1): restoration of chemosensitivity of L1210 cells overexpressing ALDH1 and induction of apoptosis in BAF3 cells overexpressing bcl2. *Biochemical Pharmacology*, 64(8), 1279–1292. [http://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01294-7](http://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01294-7)
- Quesenberry, M. S., & Lee, Y. C. (1996). A Rapid Formaldehyde Assay Using Purpald Reagent: Application under Periodation Conditions. *Analytical Biochemistry*, 234(1), 50–55. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0048>
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142–60. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Ralsler, M., Heeren, G., Breitenbach, M., Lehrach, H., & Krobitsch, S. (2006). Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization—not catalytic inactivity—of the mutant enzymes. *PLoS One*, 1(1), e30. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000030>
- Ralsler, M., Wamelink, M. M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E. A., ... Stryer, L. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, 6(4), 10. <http://doi.org/10.1186/jbiol61>
- Rangel, D. E. N. (2011). Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1281–1296. <http://doi.org/10.1007/s11274-010-0584-3>
- Rangel, D. E. N., Alston, D. G., & Roberts, D. W. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*, 112(11), 1355–1361. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.04.011>
- Rangel, D. E. N., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2006). Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2), 127–134. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.011>
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(2), 116–125. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2004.11.007>
- Ravensberg, W. J. (2011). A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. Dordrecht: Springer Netherlands. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-0437-4>
- Raynal, B., Lenormand, P., Baron, B., Hoos, S., & England, P. (2014). Quality assessment and optimization of purified protein samples: why and how? *Microbial Cell Factories*, 13, 180. <http://doi.org/10.1186/s12934-014-0180-6>
- Reed, P. W., Densmore, A., & Bloch, R. J. (2012). Optimization of large gel 2D electrophoresis for proteomic studies of skeletal muscle. *Electrophoresis*, 33(8), 1263–70. <http://doi.org/10.1002/elps.201100642>
- Richter, C., Gogvadze, V., Laffranchi, R., Schlapbach, R., Schweizer, M., Suter, M., ... Yaffee, M. (1995). Oxidants in

- mitochondria: from physiology to diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1271(1), 67–74. [http://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00012-S](http://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00012-S)
- Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 513–518. <http://doi.org/10.1007/s11274-008-9917-x>
- Roncal, T., & Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*, 154(8), 539–546. [http://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00168-2](http://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00168-2)
- Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasouljan, G., Bandani, A. R., Butt, T. M., ... DeValerio, J. T. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116–23. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x>
- Sahayaraj, K., & Namasivayam, S. K. R. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1907–1910. <http://doi.org/10.5897/AJB07.778>
- Samuels, R., Paula, A., Carolino, A., Gomes, S., Paula, C., Cypriano, M., ... Peres, C. (2016). Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control. *Open Access Insect Physiology*, Volume 6, 25. <http://doi.org/10.2147/OAIP.S68850>
- Sanchez-Murillo, R. I., Torre-Martínez, M. de la, Aguirre-Linares, J., & Herrera-Estrella, A. (2004). Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiology*, 150(2), 311–319. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26717-0>
- Sarry, J.-E., Chen, S., Collum, R. P., Liang, S., Peng, M., Lang, A., ... Rea, P. A. (2007). Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal*, 274(16), 4287–4305. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05959.x>
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191–1212. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4)
- Schumacker, P. T. (2002). Hypoxia, anoxia, and O₂ sensing: the search continues. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(5).
- Shah, F. A., Allen, N., Wright, C. J., Butt, T. M., Altre, J. A., Vandenberg, J. D., ... Zacharuk, R. Y. (2007). Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), 60–6. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00927.x>
- Shah, F. A., Wang, C. S., Butt, T. M., Butt, T. M., Hallsworth, J. E., Magan, N., ... Kock, S. L. De. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 259–66. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
- Shahid, A., Rao, Q., Bakhsh, A., & Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 21–42. <http://doi.org/10.2298/ABS1201021S>
- Shan, L.-T., Wang, Z.-L., Ying, S.-H., & Feng, M.-G. (2010). Hydrophobicity-related protein contents and surface areas of aerial conidia are useful traits for formulation design of fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*, 169(6), 483–94. <http://doi.org/10.1007/s11046-010-9283-8>
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850–858. <http://doi.org/10.1021/ac950914h>
- Shimizu, M., Fujii, T., Masuo, S., Fujita, K., & Takaya, N. (2009). Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *PROTEOMICS*, 9(1), 7–19. <http://doi.org/10.1002/pmic.200701163>
- Sivashankari, S., & Shanmughavel, P. (2006). Functional annotation of hypothetical proteins - A review. *Bioinformation*,

- 1(8), 335–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597916>
- Slekar, K. H., Kosman, D. J., & Culotta, V. C. (1996). The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 28831–6. <http://doi.org/10.1074/JBC.271.46.28831>
- Sobočanec, S., Filić, V., Matovina, M., Majhen, D., Šafranko, Ž. M., Hadžija, M. P., ... Balog, T. (2016). Prominent role of exopeptidase DPP III in estrogen-mediated protection against hyperoxia in vivo. *Redox Biology*, 8, 149–159. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.003>
- Solomon, P. S., Waters, O. D. C., Oliver, R. P., Brimacombe, J. S., Webber, J. M., Lewis, D., ... al., et. (2007). Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, 15(6), 257–62. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.002>
- St Leger, R. J., Cooper, R. M., & Charnley, A. K. (1987). Production of Cuticle-degrading Enzymes by the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during Infection of Cuticles from *Caliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology*, 133, 137–1.
- St. Leger, R. J., Durrands, P. K., Cooper, R. M., & Charnley, A. K. (1988). Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology*, 150(4), 413–416. <http://doi.org/10.1007/BF00408316>
- St. Leger, R. J., & Wang, C. (2010). Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 901–907. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2306-z>
- Suárez-Vergel, G., García Ortiz, N., Garza López, P. M., Miranda Hernández, J. F., & Loera Corral, O. (2016). Effect of hyperoxidising atmosphere on UVB radiation resistance and its relationship with the activity of the enzyme Gpx in conidia of two strains *I. fumosorosea*. In *XXXI Congreso Nacional de Bioquímica*. Aguascalientes, Aguascalientes:6-11de noviembre de 2016.
- Suh, M.-J., Fedorova, N. D., Cagas, S. E., Hastings, S., Fleischmann, R. D., Peterson, S. N., ... Binkley, G. (2012). Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. *Proteome Science*, 10(1), 30. <http://doi.org/10.1186/1477-5956-10-30>
- Tamez-Guerra, P., Galán-Wong, M., & 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*.
- Taubitz, A., Bauer, B., Heesemann, J., & Ebel, F. (2007). Role of Respiration in the Germination Process of the Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Current Microbiology*, 54(5), 354–360. <http://doi.org/10.1007/s00284-006-0413-y>
- Teutschbein, J., Albrecht, D., Poitsch, M., Guthke, R., Amanianda, V., Clavaud, C., ... Kniemeyer, O. (2010). Proteome Profiling and Functional Classification of Intracellular Proteins from Conidia of the Human-Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Proteome Research*, 9(7), 3427–3442. <http://doi.org/10.1021/pr9010684>
- Thines, E., Weber, R. W., & Talbot, N. J. (2000). MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 12(9), 1703–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006342>
- Thomas, A., Kohler, M., Walpurgis, K., Schänzer, W., & Thevis, M. (2009). Proteolysis and autolysis of proteases and the detection of degradation products in doping control. *Drug Testing and Analysis*, 1(2), 81–86. <http://doi.org/10.1002/dta.20>
- Thomas, M. B., & Jenkins, N. E. (1997). Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Mycological Research*, 101(12), 1469–1474. <http://doi.org/10.1017/S0953756297004401>
- Tlecuitl-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(5), 387–394. <http://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>
- Toledo, I., Aguirre, J., & Hansberg, W. (1994). Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 140(9), 2391–2397. <http://doi.org/10.1099/13500872-140-9-2391>
- Tseng, M. N., Chung, P. C., & Tzean, S. S. (2011). Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4508–19. <http://doi.org/10.1128/AEM.02033-10>
- Tseng, M.-N., Chung, C.-L., Tzean, S.-S., Braga, G., Flint, S., Miller, C., ... Roberts, D. (2014). Mechanisms Relevant to the Enhanced Virulence of a Dihydroxynaphthalene-Melanin Metabolically Engineered Entomopathogen. *PLoS ONE*, 9(3), e90473. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0090473>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335–44. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. <http://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Valledor, L., & Jorrin, J. (2011). Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *Journal of Proteomics*, 74(1), 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.007>
- van Heusden, G., & van Heusden, H. (2005). 14-3-3 Proteins: Regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 57(9), 623–629. <http://doi.org/10.1080/15216540500252666>
- Vandenberg, J. D., & Cantone, F. A. (2004). Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(1), 40–45. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.004>
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal Entomopathogens. In *Insect Pathology* (pp. 171–220). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>
- Veneault-Fourrey, C., Barooah, M., Egan, M., Wakley, G., & Talbot, N. J. (2006). Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5773), 580–3. <http://doi.org/10.1126/science.1124550>
- Verma, N. C., & Singh, R. K. (2001). Stress-Inducible DNA Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 20(1), 7. <http://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v20.i1.10>
- Veses, V., Richards, A., & Gow, N. A. (2008). Vacuoles and fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 503–510. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.017>
- Vijayan, M., & Chandra, N. (1999). Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 707–714. [http://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00034-2](http://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00034-2)
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2009). Proteínas: estructura primaria. In *Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular* (pp. 105–107). Médica Panamericana.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., ... Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2040–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0307301101>
- Wang, C., Butt, T. M., & St Leger, R. J. (2005). Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 10), 3223–36. <http://doi.org/10.1099/mic.0.28148-0>

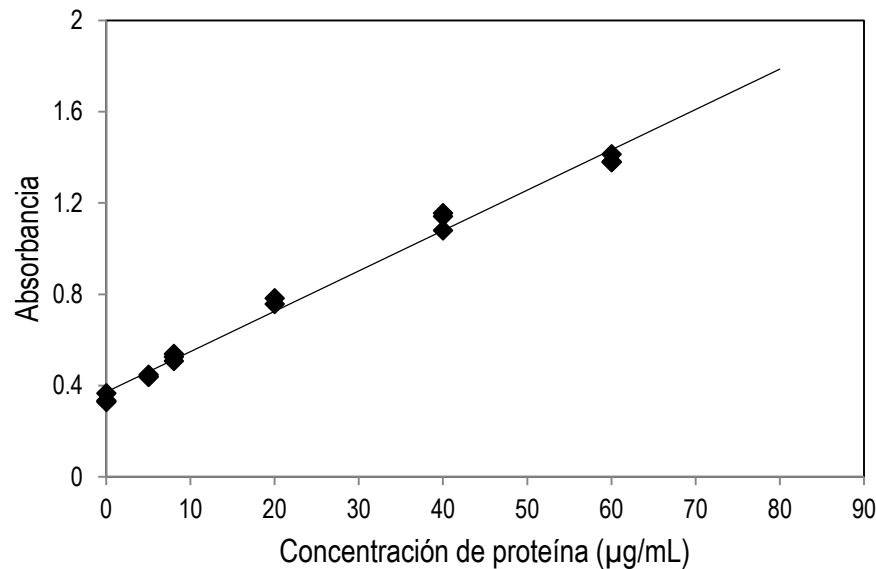
- Wang, C., Butt, T. M., & St. Leger, R. J. (2005). Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*, 151(10), 3223–3236. <http://doi.org/10.1099/mic.0.28148-0>
- Wang, C., & St Leger, R. J. (2007). The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. *Eukaryotic Cell*, 6(5), 808–816. <http://doi.org/10.1128/EC.00409-06>
- Wang, C., & St. Leger, R. J. (2005). Developmental and Transcriptional Responses to Host and Nonhost Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Eukaryotic Cell*, 4(5), 937–947. <http://doi.org/10.1128/EC.4.5.937-947.2005>
- Wang, L., Shimizu, Y., Mizunaga, T., Matsumoto, S., & Otsuka, Y. (2008). Expression, purification and characterization of yeast protein disulfide isomerase produced by a recombinant baculovirus-mediated silkworm, *Bombyx mori*, pupae expression system. *Biotechnology Letters*, 30(4), 625–630. <http://doi.org/10.1007/s10529-007-9582-4>
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244–252. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
- Wang, Y., Wang, P., Xia, J., Yu, T., Lou, B., Wang, J., & Zheng, X. D. (2010). Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 103–108. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.035>
- Warner, B. B., Stuart, L., Gebb, S., & Wispe, J. R. (1996). Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 271(1).
- Wilkins, M. R., Sanchez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. (1996). Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 19–50. <http://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
- Yamamoto, N., Maeda, Y., Ikeda, A., & Sakurai, H. (2008). Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(5), 783–90. <http://doi.org/10.1128/EC.00029-08>
- Yang, H., & Lucas, G. B. (1970). Effects of N₂-O₂ and CO₂-O₂ tensions on growth of fungi isolated from damaged flue-cured tobacco. *Applied Microbiology*, 19, 271-277.
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Bellei, M., Battistuzzi, G., Stadlmann, J., Vlasits, J., ... Loewen, P. C. (2009). Intracellular catalase/peroxidase from the phytopathogenic rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: expression analysis and biochemical characterization of the recombinant protein. *The Biochemical Journal*, 418(2), 443–51. <http://doi.org/10.1042/BJ20081478>
- Zhang, Y.-J., Li, Z.-H., Luo, Z.-B., Zhang, J.-Q., Fan, Y.-H., & Pei, Y. (2009). Light stimulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/09583150802588516>
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375–379. <http://doi.org/10.1002/ps.2780370410>
- Zolotarjova, N., Martosella, J., Nicol, G., Bailey, J., Boyes, B. E., & Barrett, W. C. (2005). Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics*, 5(13), 3304–13. <http://doi.org/10.1002/pmic.200402021>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van 'A. K., & Riet, T. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1875–1881.

13 ANEXO I

13.1 Curva estándar de proteína

Se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de proteína intracelular extraída de los conidios, los datos se interpolaron con la siguiente ecuación, lo datos se ajustaron a una línea recta con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9902. Se realizaron los cálculos necesarios para depositar 200 μ g de proteína en un tubo de 2.0 mL, las muestras fueron liofilizadas como se describió en la sección de materiales y métodos.

$$ABS = 0.0177 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ de proteína} \right) + 0.3714$$

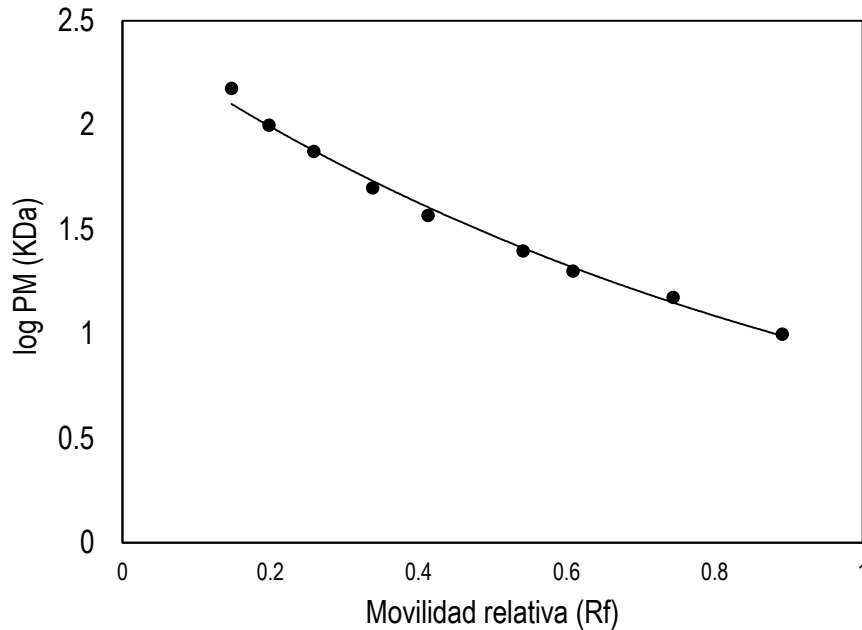


Gráfica 13. Curva estándar de albúmina sérica bovina.

Este fue un paso previo para realizar los siguientes experimentos, a cada tubo con 200 μ g de proteína se rehidrató y se procedió a realizar la primera dimensión (separación por punto isoelectrico) de tres replicas biológicas y dos réplicas técnicas de cada condición seguido de la separación por peso molecular en la segunda dimensión.

13.2 Curvas estándar de Peso Molecular y Punto Isoeléctrico

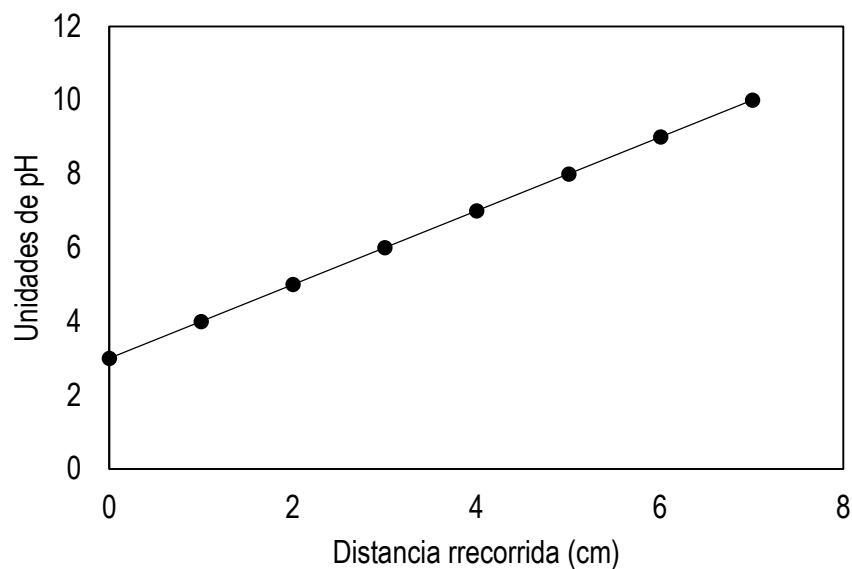
El peso molecular experimental de cada mancha se determinó por interpolación de los log del Peso Molecular del marcador de peso molecular (Figura 9) contra su Rf, con la siguiente ecuación $\log PM = 2.438 e^{-1.01 Rf}$ con un coeficiente de variación (R^2) de 0.9943. En la Gráfica 14 se muestra una línea sólida que indica el ajuste de los datos experimentales a la ecuación exponencial.



Gráfica 14. Curva estándar de movilidad relativa de proteínas.

Para determinar el punto isoelectrico de cada proteína se sirvió del hecho de que el gradiente de pH en la tira con acrilamida es de tipo lineal, por lo que se graficó la distancia recorrida (cm) contra las unidades de pH y los datos se ajustaron la siguiente ecuación con un coeficiente de variación (R^2) 0.999.

$$\text{pH} = 0.9987 * \text{distancia recorrida (cm)} + 3$$



Gráfica 15. Curva estándar del punto isoeléctrico de proteínas.

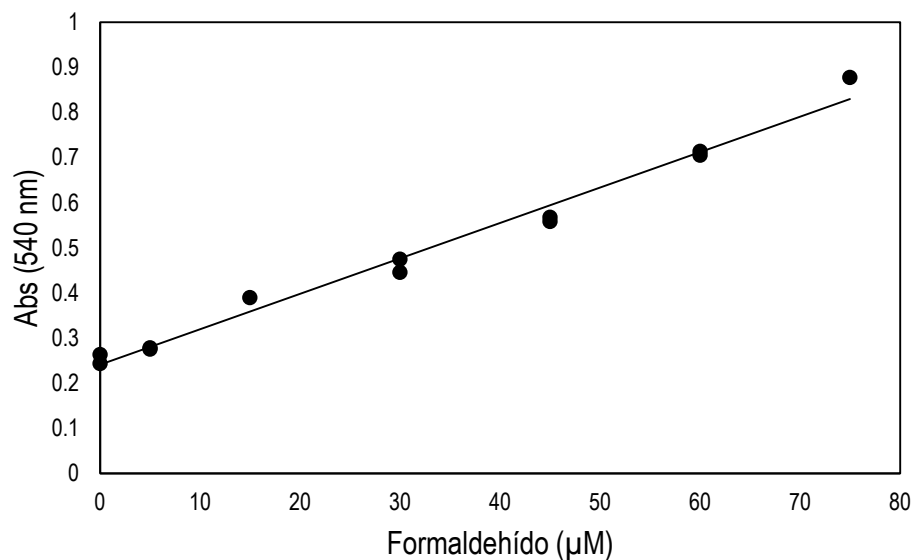
13.3 Curva estándar CPs

Se construyó una curva estándar de formaldehído, se realizaron 7 diluciones que se muestran en la Tabla 14, de una solución de formaldehído estándar que tenía una concentración de 4.25 mM, las absorbancias de las soluciones estándar diluidas sirvieron para construir la Gráfica 17, los datos se ajustaron a un modelo lineal con una R^2 de 0.9857, cuya ecuación (9) se ocupó para calcular la concentración de formaldehído (μM) de los ECE de conidios de *M. anisopliae*, posteriormente se calculó la A. CPs con la ecuación 10 descrita en la sección 7.18.4 de materiales y métodos.

$$[\text{Formaldehído}] = \frac{Abs_{muestra} - 0.2411}{0.0079} = \mu\text{M} \quad (10)$$

Tabla 14. Soluciones estándar de formaldehído

Tubo	Solución estándar de Formaldehído (μL)	Solución amortiguadora de muestra (μL)	[Formaldehído] final (μM)
1	0	1000	0
2	10	990	5
3	30	970	15
4	60	940	30
5	90	910	45
6	120	880	60
7	150	850	75
8	170	830	85



Gráfica 16. Curva estándar de Formaldehído.

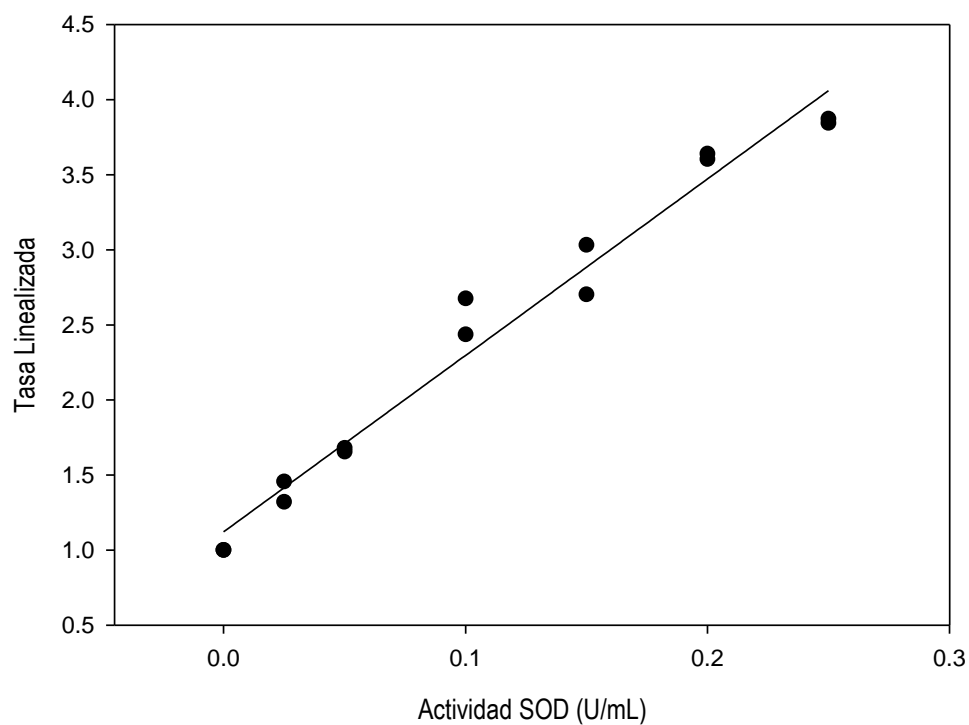
13.4 Curva estándar SOD

Se construyó una curva estándar con superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos que tenía una actividad de 1.25 U/mL, se realizaron 7 diluciones que se muestran en la Tabla 15 cuyas absorbancias sirvieron para calcular la Tasa linealizada (TL) y construir la Gráfica 17. Los datos se ajustaron a un modelo lineal con una R^2 de 0.9833, cuya ecuación (11) se ocupó para calcular la A. SOD de los ECE de conidios de *M. anisopliae*

$$\text{Actividad.SOD} = \frac{TL - 1.0782}{12.213} = U / mL \quad (12)$$

Tabla 15. Estándares de actividad SOD

Tubo	Estándar de SOD (μL)	Solución amortiguadora de muestra (μL)	A. SOD final (U/mL)
1	0	1000	0
2	20	980	0.025
3	40	960	0.05
4	80	920	0.1
5	120	880	0.15
6	160	840	0.2
7	200	800	0.25
8	240	760	0.3

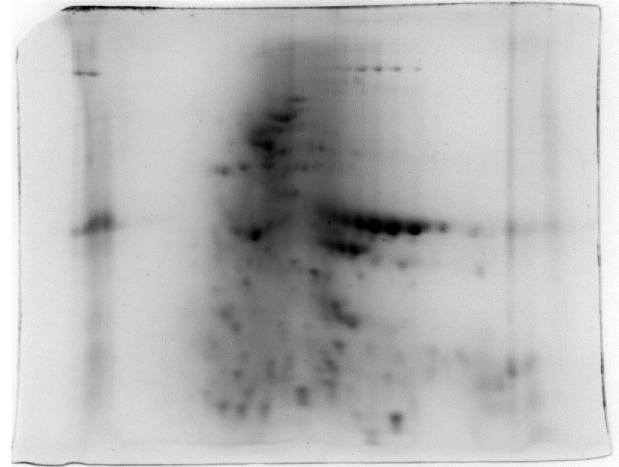
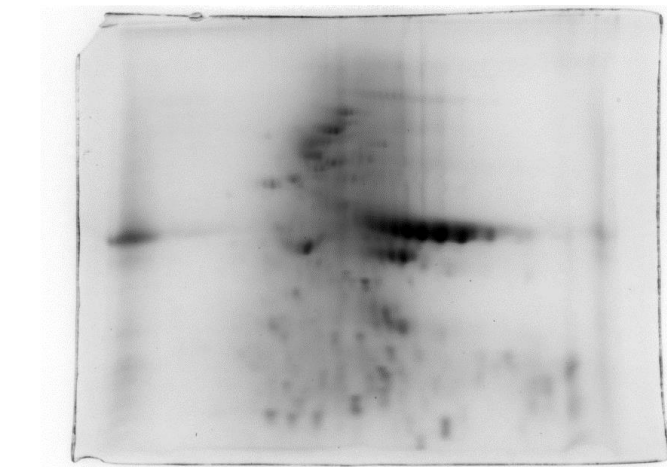
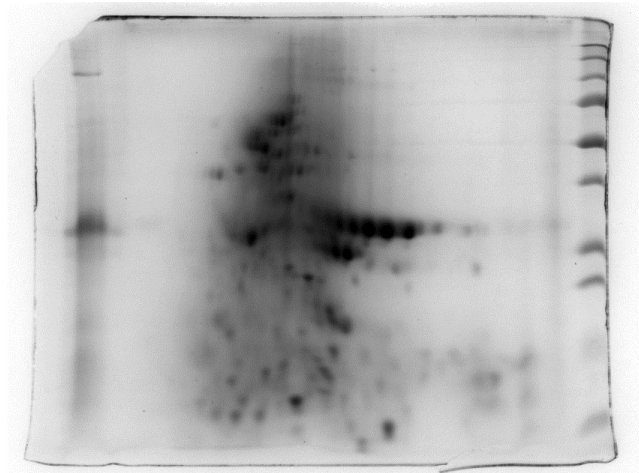
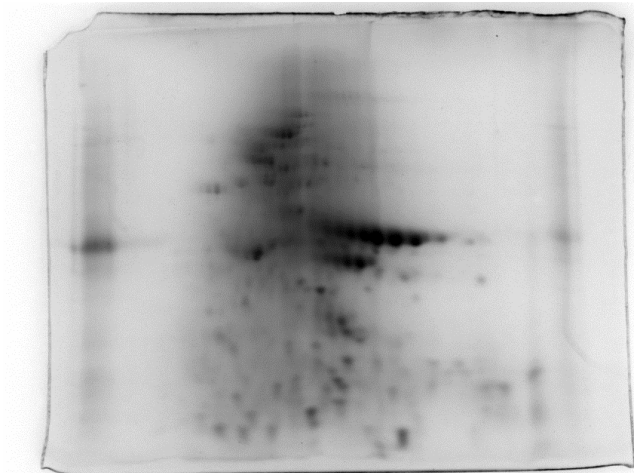
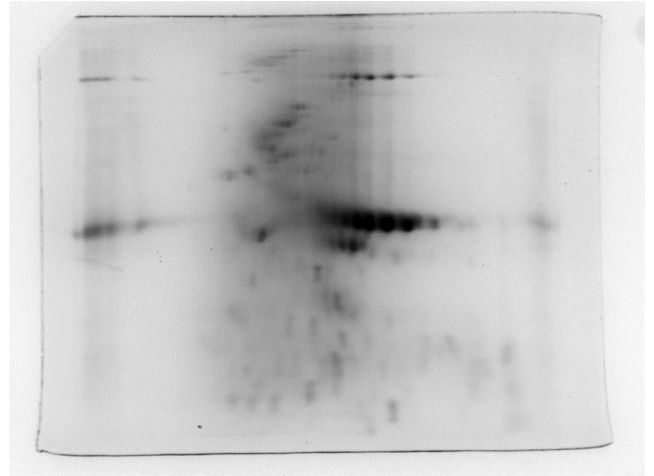


Gráfica 17. Curva estándar de Actividad SOD

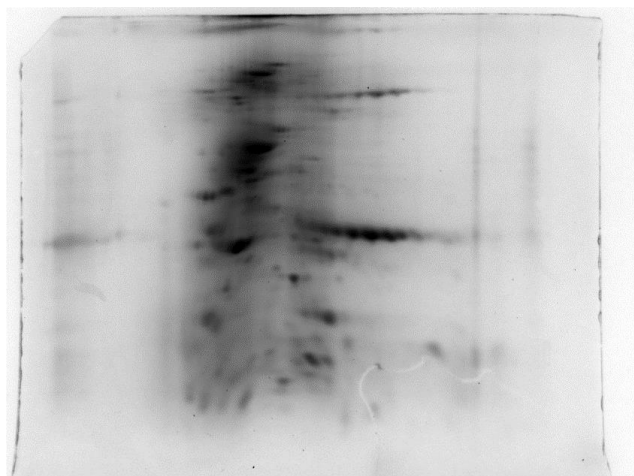
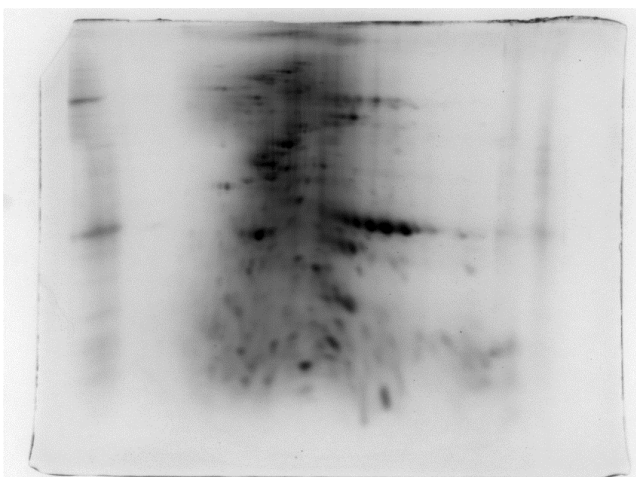
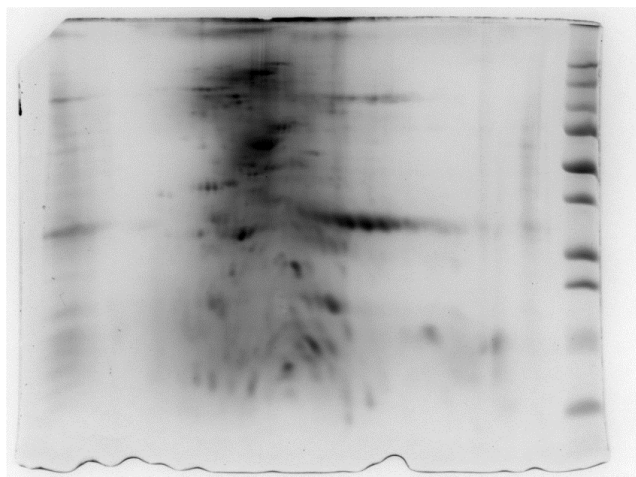
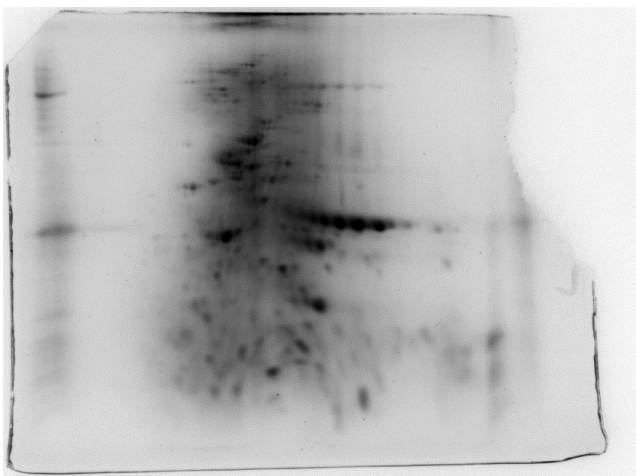
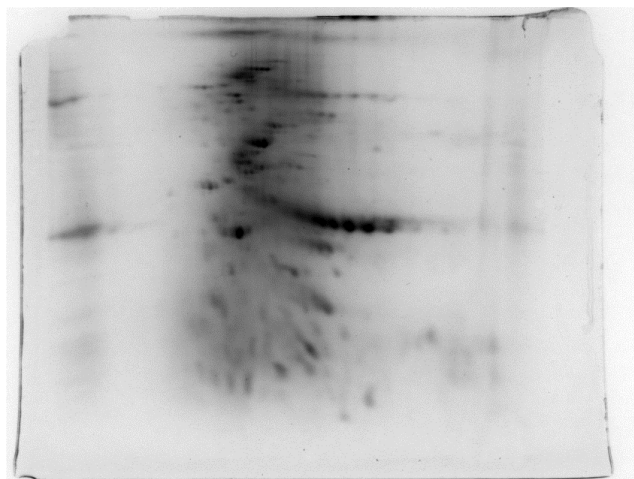
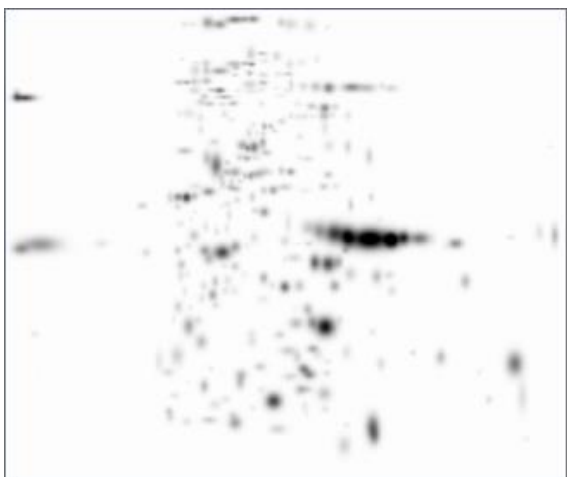
14 ANEXO II

14.1 Análisis de imágenes

Gel maestro 21% obtenido con PDQuest Advanced 8.0.1



Gel maestro **30%** obtenido con PDQuest Advanced 8.0.1



15 ANEXO III

15.1 Trabajos presentados en congresos

- ▶ Effect of oxidant pulses in *Metarhizium anisopliae* cultures: Conidial production and infectivity.

VX National congress of biotechnology and bioengineering and 12 th International symposium on the genetics of industrial microorganisms, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, 23-28 de Junio de 2013, Cancún, Quintana Roo, México

- ▶ Una elevada concentración de oxígeno en la atmósfera del cultivo de *Metarhizium anisopliae* mejora la termotolerancia de los conidios.

3er Simposio: Perspectivas en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Posgrado en Biotecnología, 28 Marzo 2014, Ciudad de México, México

- ▶ Modulación de la superóxido dismutasa en conidios de *Metarhizium anisopliae* por concentraciones de oxígeno en el cultivo

XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, 21-26 de Junio de 2015, Guadalajara, Jalisco, México

- ▶ Oxygen concentration in culture of *Metarhizium anisopliae* generates conidia with uniform antioxidant activity.

XXXI Congreso Nacional de Bioquímica, Sociedad Mexicana de Bioquímica, 6 al 11 de Noviembre del 2016, Aguascalientes, Aguascalientes, México

15.2 Publicación internacional

García-Ortiz, N., Tlecuítl-Beristain, S., Favela-Torres, E., Loera O. (2015) Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae*: critical oxygen level and period of mycelium competence. Applied Microbiology and Biotechnology 99(6): 2783- 2791. doi:10.1007/s00253-014-6225-2

Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence

Nohemi Garcia-Ortiz · Saúl Tlecuil-Beristain ·
Ernesto Favela-Torres · Octavio Loera

Received: 18 July 2014 / Revised: 7 November 2014 / Accepted: 10 November 2014 / Published online: 4 December 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Mycoinsecticides application within Integral Pest Management requires high quantities of conidia, with the proper quality and resistance against environmental conditions. *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidia were produced in normal atmospheric conditions (21 % O₂) and different concentrations of oxygen pulses (16, 26, 30, and 40 %); conidia obtained under hypoxic conditions showed significantly lower viability, hydrophobicity, and virulence against *Tenebrio molitor* larvae or mealworm, compared with those obtained under normal atmospheric conditions. Higher concentrations of oxygen (26 and 30 %) improved conidial production. However, when a 30 % oxygen concentration was applied, maximal conidial yields were obtained at earlier times (132 h) relative to 26 % oxygen pulses (156 h); additionally, with 30 % oxygen pulses, conidia thermotolerance was improved, maintaining viability, hydrophobicity, and virulence. Although conidial production was not affected when 40 % oxygen pulses were applied, viability and virulence were diminished in those conidia. In order to find a critical time for mycelia competence to respond to these oxidant conditions, oxygen pulses were first applied either at 36, 48, 60, and 72 h. A critical time of 60 h was determined to be the best time for the *M. anisopliae* var. *lepidiotum* mycelia to respond to oxygen pulses in order to increase conidial production and also to maintain the quality features. Therefore, oxygen-enriched (30 %) pulses starting at 60 h are recommended for a high production without the impairment of quality of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* conidia.

Keywords Mycoinsecticide · Mass production · Oxygen · Conidial quality · Virulence

Introduction

Entomopathogenic fungi have received considerable interest because of their capacity to control insect pests, and thus may be considered as an alternative to chemical insecticides. These biological control agents can be produced and then integrated into agro systems as a part of the integrated pest management (IPM) programs (Faria and Wraight 2007). Entomopathogenic fungi application in some inoculative strategies requires levels of conidia of about 10¹² conidia per hectare, and thus it is very important to have an appropriate method for conidial production (Dorta et al. 1996). Recently, many studies have focused on achieving high conidial yields. Nevertheless, a few reports have considered the quality of the conidia produced, in addition to resistance to abiotic factors, where the temperature plays an important role (Kamp and Bidochka 2002; Prakash et al. 2008; Tarocco et al. 2005; Li and Feng 2009).

In general, molecular O₂ has been considered harmless, since this compound is required by aerobic organisms. Reactive oxygen species (ROS) are generated in aerobic organisms either as by-products of normal metabolism (respiratory chain) or by the activity of NADPH oxidases. However, under certain environmental conditions, molecular O₂ can promote the generation of high levels of ROS in amounts representing a significant toxicity against the cells (Hansberg et al. 1993). ROS such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical can damage DNA, lipids, and proteins (Garza-López et al. 2012). Nevertheless, these radicals are also related to cell differentiation in some fungal microorganisms (Aguirre et al. 2005; Belozerskaya and Gessler 2006).

N. Garcia-Ortiz · E. Favela-Torres · O. Loera (✉)
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, 09340 Mexico, DF, Mexico
e-mail: loera@xanum.uam.mx

S. Tlecuil-Beristain
Programa Educativo de Ingeniería en Biotecnología, Universidad
Politécnica de Tlaxcala, 90180 Tlaxcala, Mexico

Different studies have probed the effectiveness of modified atmospheres to reduce the germination of fungal spores during the treatment of minimally processed vegetables; in fact, those treatments are based on increasing the O₂ concentration in the atmosphere (Jacxsens et al. 2001). In the case of entomopathogenic fungi, oxygen-rich atmospheres enhance the conidial production in *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (Tlecuil-Beristain et al. 2010), cause moderate stress in *Beauveria bassiana* (Garza-López et al. 2012) and/or improve the thermotolerance and the virulence parameters in *Isaria fumosorosea* (Miranda-Hernández et al. 2014). These studies with entomopathogenic fungi have been performed only under either normal atmospheric conditions or 26 % O₂ pulses; the effects of hypoxia pulses (16 % O₂) have been reported only for *B. bassiana* growing in solid culture.

Hence, the aim of this work was to explore wider ranges of O₂ pulses (from 16 to 40 %), and then to determine the best O₂ concentration to improve the conidial production of *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, and to evaluate the quality of the produced conidia. In addition, there are no studies describing the critical time for initiating these atmospheric pulses, since mycelia competence might vary before the onset of conidiation (Sánchez-Murillo et al. 2004). Another goal was to establish the competence time for the mycelia to respond to such oxidant conditions, which would be essential in current strategies of conidial production.

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

The fungal strain *M. anisopliae* CP-OAX was obtained from the culture collection of the Colegio de Posgraduados (Texcoco, Mexico) and identified as *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (Tlecuil-Beristain et al. 2010). This strain has been deposited into the Culture Collection ENCB-IPN WDCM449 with the identification number ENCB-MG-81. Maintenance was carried out using vials with deionized water at 4 °C (López Lastra et al. 2002). The initial inoculum was obtained by propagating the fungus in Petri dishes containing oat-peptone agar (oat flour 33.3 g L⁻¹ [Grupo industrial Vida, Jalisco, Mexico], meat peptone 10 g L⁻¹ [Bioxon, Estado de Mexico, Mexico], and agar 15 g L⁻¹ [Bioxon, Estado de Mexico, Mexico]). Incubations were carried out at 28±1 °C with a 12/12 h light/dark photoperiod. The conidia obtained after 7 incubation days were used as the inocula during the conidial production assays.

Conidial production under modified atmospheric conditions

The conidial production assays were carried out in 120-mL serological bottles (Distbrand, Mexico City, Mexico)

containing 10 mL of oat-peptone agar. The medium was inoculated with a conidial suspension prepared with Tween 80 (0.1 k% v/v) (Amresco, Solon, USA); the conidia concentration was 1×10^7 con mL⁻¹ corresponding to 5.7×10^5 con cm⁻². All bottles were closed with cotton stoppers to allow continuous gas exchange with the external environment and were incubated as previously described. After 60 h, the stoppers were replaced by hermetic rubber seals, and the atmosphere was displaced and replaced by the corresponding modified atmosphere (Tlecuil-Beristain et al. 2010). Four modified atmospheres (Praxair Mexico, Monterrey, Mexico) were used, one of them with a low oxygen concentration (16 % O₂) and the rest of them with high oxygen concentrations (26, 30, and 40 % O₂), all of them balanced with N₂. The modified atmosphere application was carried out as follows: two needles were simultaneously placed in the rubber seals, the modified atmosphere was passed through the first needle for 1.2 min (flow rate, 13.8 cm³ s⁻¹), and the second needle functioned as the outlet during the continuous replacement of the atmosphere. This procedure was carried out daily for 6 days. Serological bottles with cotton stoppers and no atmospheric modifications (21 % O₂) were used as the control. All assays were carried out in triplicate. Conidia produced were harvested every day by adding 20 ml of Tween 80 to each bottle (0.1 % v/v) under vigorous magnetic stirring for 10 min, every day three new bottles were used for harvesting conidia, which were counted in a Neubauer chamber (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). First, harvesting correspond to 60 h post-inoculation, before this time conidia were not detected, and finally the results are reported as conidia per square centimeter. In order to better visualize the magnitude of the changes, the data showed are the result from normalize conidial production from each treatment, it means that all values were divided by the maximal conidial production obtained in normal atmosphere conditions (21 % O₂), rendering dimensionless units (conidia per squared centimeter divided by conidia per squared centimeter).

Determination of the competence time to start the atmospheric modifications

In order to determine the optimal response time of the fungus to the atmospheric modification, these replacements were initiated at different culture times. The strain *M. anisopliae* var. *lepidiotum* was cultivated in serological bottles as previously described, although in these assays the first atmospheric replacement was done after 36, 48, 60, or 72 h. These tests were carried out only in a 30 % O₂ atmosphere. Conidia quantification was performed as previously mentioned. Results corresponding to conidial production (C) were fitted by the Gompertz model (Eq. 1) to determine the maximum conidial production obtained due to the changes on the initial time of atmospheric replacement (Zwietering et al. 1990).

$$y = a * \exp[-\exp(b-ct)] \quad (1)$$

Where y is the $\ln C/C_0$ at time t , a (adimensional), b (adimensional), and c (h^{-1}) are the parameters of the Gompertz model; and t is the time (h).

The biological parameter C_{\max} was determined by Eq. 2:

$$C_{\max} = \exp(a) * C_0 \quad (2)$$

Where C_{\max} is the maximum conidia concentration (con cm^{-2}), a (adimensional) is the mathematical parameter of the Gompertz model, and C_0 (con cm^{-2}) is the initial conidia concentration.

Quality tests

Viability

The viability of the *M. anisopliae* var. *lepidiotum* conidia was determined using maltose Sabouraud agar (MSA) containing sodium deoxycholate (0.5 g L^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Petri dishes containing MSA were inoculated with $30 \mu\text{L}$ of a conidial suspension ($1 \times 10^4 \text{ con mL}^{-1}$, corresponding to 300 conidia per dish). The conidia were spread on the agar surface using a glass rod. Incubation was carried out at $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ for 72 h. Subsequently, the colony-forming units were counted and the results were reported as a viability percentage considering the initial 300 colonies as 100 % (Montesinos-Matias et al. 2011b).

Hydrophobicity

Conidial hydrophobicity was determined by aqueous-solvent partitioning assays (Shah et al. 2007). The conidia obtained from the different conidial production assays were centrifuged (5000 rpm, 30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) and the supernatant was discarded. The conidia pellet was washed with distilled water and centrifuged again. In order to neutralize the surface charges, after discarding the supernatant, the conidia were suspended in a 0.1 M KNO_3 (J.T. Baker, Estado de Mexico, Mexico) solution. The conidial suspension was standardized to a final concentration of $1 \times 10^7 \text{ con mL}^{-1}$, and the optical density (OD) was determined at 660 nm using a UV/Visible Spectrophotometer (Beckman, Fullerton, USA). This value corresponded to the total optical density (OD_{total}). The conidial suspension (3 mL) and 1 mL of *n*-hexadecane (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) were transferred to assay tubes and stirred for 20 s. The suspension was held at room temperature for 30 min, and then the aqueous phase was collected with a Pasteur pipette and the optical density in the aqueous phase (OD_{aq}) was recorded.

Relative hydrophobicity (H) was determined by Eq. 3:

$$H(\%) = \left(1 - \frac{OD_{\text{aq}}}{OD_{\text{total}}}\right) * 100 \quad (3)$$

Where the OD_{total} represents the optical density of the original conidial suspension, and the OD_{aq} represents the optical density of the resultant aqueous phase after *n*-hexadecane addition (Shah et al. 2007).

Virulence bioassays

In order to probe if conidia virulence was negatively altered by the modified atmospheres, virulence bioassays were carried out using *T. molitor* larvae (mealworm) (Petmmal, Estado de Mexico, Mexico). The conidia produced under the modified atmospheres (16, 21, 26, 30, or 40 % O_2) were collected and used to prepare conidial suspensions standardized only by concentration ($1 \times 10^8 \text{ con mL}^{-1}$). The larvae were submerged for 15 s in these conidial suspensions and then were placed in Petri dishes ($90 \times 15 \text{ mm}$); each Petri dish contained 12 larvae and a mixture of wheat bran/oat flakes (1:1 *w/w*) as feed. As a control, a set of larvae was submerged into a sterile solution of Tween 80 (0.1 %). The Petri dishes were placed into a transparent plastic vessel containing a wet filter paper bed and then incubated at $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ with a 12/12 h light/dark photoperiod; the survival percentage was registered daily. To verify mycosis, dead larvae were transferred individually to new Petri dishes and incubated in a plastic container as previously described (Goettel and Inglis 1997). The experimental data were fitted to a decay model proposed by Rodríguez-Gómez et al. (2009) (Eq. 4).

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

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

Where Y is the percentage of survival at time t ; k is the specific death rate (d^{-1}); t_0 is the time of the first insect death (days); and S is the final asymptotic survival (%). The survival time 50 (ST_{50}) was also calculated when $Y=50 \text{ } \%$.

Thermal tolerance of conidia

The conidia obtained under the different modified atmospheres were subjected to thermal tolerance tests. The assays were performed according to Rangel et al. (2005). Assay tubes containing a conidial suspension standardized to $1 \times 10^4 \text{ con mL}^{-1}$ were incubated in a water bath at $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Periodically, samples of the conidial suspension were collected, cultured in Petri dishes containing MSA medium, and incubated for 72 h at $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ with a 12/12 h light/dark photoperiod. After the incubation period, the colony-forming

units were counted, then the survival percentage was plotted against the time of heat treatment, and finally the results were fitted to an exponential decay model according to Eq. 5:

$$S = S_0 * e^{-(k't)} \quad (5)$$

Where S is the viability of the conidia at time t , S_0 is the initial viability (%), k' is the specific viability decay rate (h^{-1}), and t is the time (h). The ST'_{50} was also estimated and defined as the time at which 50 % of the initial conidia were still viable, relative to the number of conidia able to form a colony before applying the thermal stress (initial time).

Statistical analysis

All assays were carried out at least in triplicates. The results obtained during the determination of the competence time, the virulence assays, and the thermal tolerance test were fitted to the corresponding models by using the estimation model of Levenberg–Maquard, using the statistical software SPSS v.18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. In all cases, the set point of significance was $\alpha=0.05$, and the analysis was conducted with the SPSS software as well.

Results

Conidial production under modified atmospheric conditions

The effects of different O_2 concentrations in the conidial production of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* were studied by applying pulses of different modified atmospheres every 24 h. The results are shown in Fig. 1, where values were normalized relative to the maximal value (at 156 h) obtained under normal atmospheric conditions (5.43×10^7 con cm^{-2}). The conidial production obtained using 16 % O_2 was not affected ($p>0.05$) in comparison with that registered under the normal atmosphere. On the other hand, both oxygen-rich atmospheres (26 and 30 % O_2) caused an increase ($p<0.05$) in conidial production, up to 86 % after 180 h (with 26 % O_2) and up to 120 % after only 132 h (with 30 % O_2). These results showed the effectiveness of these oxygen concentrations to enhance conidial production levels and also the productivity relative to the normal atmosphere. By contrast, conidial production was not improved by applying a higher oxygen concentration (40 % O_2), as the yield obtained was not different ($p>0.05$) from that registered under the normal atmosphere (21 % O_2). Among all the experiments, the highest ($p<0.05$) conidial yield was obtained at 132 h (Fig. 1), therefore all the subsequent assays were carried out using the conidia obtained at this specific time.

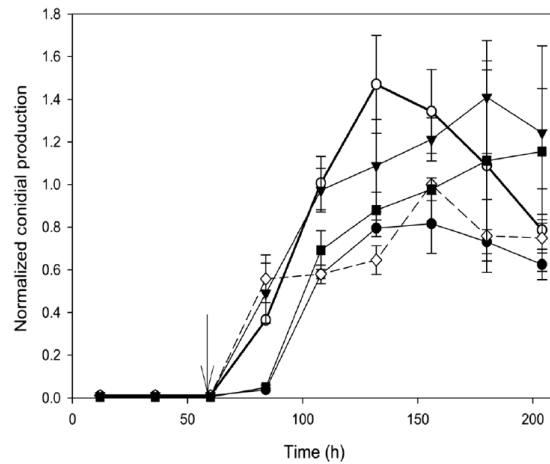


Fig. 1 Time course of conidial production by *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (average±standard deviation) grown under O_2 -modified atmospheres: 16 % O_2 (black circle); 21 % O_2 (Lozenge, dotted line); 26 % O_2 (black down-pointing triangle); 30 % O_2 (dotted circle, darker line); and 40 % O_2 (black square). The arrow shows the time at which the first atmosphere exchange was applied. Values were normalized relative to the maximal value (at 156 h) obtained under normal atmospheric conditions (5.43×10^7 con cm^{-2})

Determination of the mycelium competence time to begin the atmospheric modifications

According to the previous results, applying pulses of a modified atmosphere containing 30 % O_2 improved the conidial production in *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, and the application of these O_2 pulses started after 60 h of incubation under normal atmospheric conditions (21 % of O_2). In order to determine if the culture response to the oxidizing atmosphere depends on the physiological stage of the fungus at the moment of the first O_2 pulse application, the atmosphere replacements were initiated at different times: 36, 48, and 72 h, in addition to 60 h.

Maximum conidial production (C_{max}) was estimated by fitting the data obtained during the growth kinetics of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* to the Gompertz model (Zwietering et al. 1990). The model was able to explain 99 % of the analysed data ($R^2 \geq 0.99$). The conidial production obtained by applying the first O_2 pulse after 36 h was $1.1 \times 10^8 \pm 6.2 \times 10^5$ con cm^{-2} (Fig. 2). When the first O_2 pulse was applied after 48 or 72 h of incubation, conidial production decreased by 3.7 % in both cases. By contrast, under the same culture conditions, the application of the first O_2 pulse after 60 h caused a 40 % increase ($p<0.05$) of conidial production in comparison with that registered by applying the first pulse after 36 h. These results showed that the fungal response to the oxidizing atmosphere (30 % of O_2) depends on the specific time at which the first O_2 pulse is applied, as conidial production was not improved ($p<0.05$) when the first O_2 pulse was

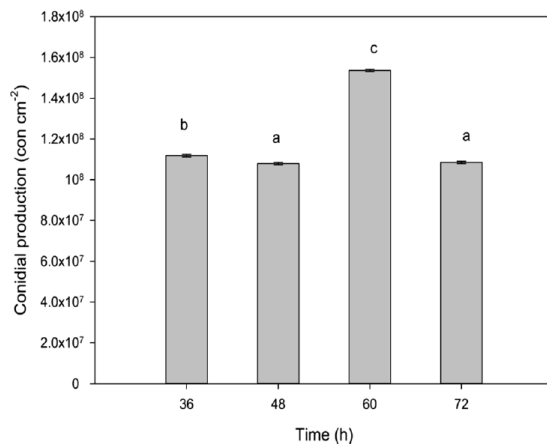


Fig. 2 Maximal conidial production (C_{max}) as function of time of the first atmosphere exchange to a modified atmosphere containing 30 % O_2 (average±standard errors). Incubation C_{max} values were estimated with the Gompertz model. Bars with different letters show significant differences (Tukey's test $p<0.05$)

applied before or after 60 h; thus, mycelia reach a “competence” level to respond to the oxidant atmosphere at 60 h. Therefore, conidial production improvement depends on the fungal physiological stage at the moment of the first atmosphere exchange.

Viability and hydrophobicity

In this work, we carried out two important conidia quality control procedures, viability, and hydrophobicity (Fig. 3). The

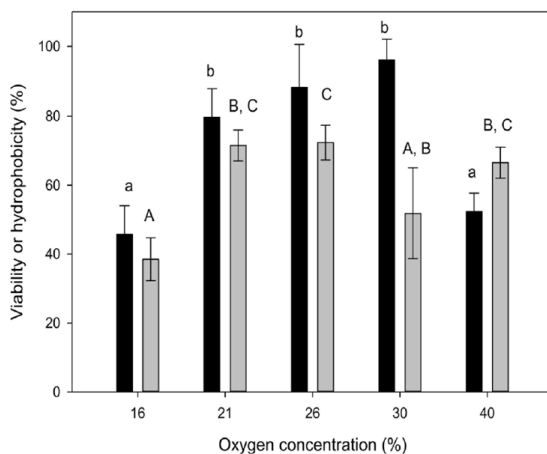


Fig. 3 Percentage of viability (black) and relative hydrophobicity (gray) of the *M. anisopliae* var. *lepidiotum* conidia (average±standard deviation) produced under modified atmospheres containing different O_2 concentrations. Bars with different lowercase letters show significant differences between the viability values and bars with different uppercase letters show significant differences between the hydrophobicity values (Tukey's test $p<0.05$)

viability of the conidia obtained under normal atmospheric conditions was $79.6\pm 8.1\%$. On the other hand, the viability registered for the conidia produced under extremely oxidant conditions (16 and 40 % O_2) was significantly lower ($p<0.05$) than that obtained under normal atmospheric conditions (21 % O_2). On the contrary, the viabilities of the conidia produced under higher oxidizing atmospheres, 26 and 30 % O_2 , were not significantly different ($p>0.05$) from those registered for the conidia produced under normal atmospheric conditions; the viabilities registered were 88.1 ± 12.4 and $96\pm 6.1\%$, respectively. These results are favorable since the highest conidial production was also obtained by applying a modified atmosphere containing 30 % O_2 (previous section).

Regarding the conidial hydrophobicity, the conidia produced under hypoxic conditions (16 % O_2) or under an atmosphere containing 30 % O_2 exhibited the lowest hydrophobicity ($38.4\pm 6.2\%$) ($p<0.05$). The conidia produced under the normal atmosphere showed a hydrophobicity value of $71.4\pm 4.5\%$, and no significant differences were observed ($p>0.05$) relative to those registered for the conidia produced by applying the atmospheres containing 26 and 40 % O_2 ; the hydrophobicity values were 72.3 ± 5.1 and $66.5\pm 4.5\%$, respectively. These results are in accordance with those reported by Tleucitl-Beristain et al. (2010), where no changes were reported between the hydrophobicity of the conidia produced under normal atmospheric conditions and those from the conidia obtained under an atmosphere containing 26 % O_2 .

Virulence bioassays

In order to describe the mortality profiles of the *T. molitor* larvae infected with the conidia produced under the different modified atmospheres, and to calculate the corresponding virulence parameters, the results obtained during the bioassays were fitted to the model proposed by Rodríguez-Gómez et al. (2009). The results showed a high degree of fitting to the model ($R^2\geq 0.91$), and the virulence parameters are presented in Table 1. Those findings show that no significant differences ($p>0.05$) were registered between the ST_{50} values from the conidia obtained under the normal atmosphere, and those from the atmospheres containing 26 or 30 % O_2 . However, the conidia obtained under extreme values (16 and 40 % O_2) significantly decreased the virulence ($p<0.05$); in fact, these conidia were not able to infect 50 % of the insects during the time of the bioassays.

Besides the ST_{50} , another important virulence parameter is the time of the death onset (t_0). Regarding to this, the conidia produced under the highest oxidizing atmosphere (40 % O_2) showed the lowest capacity to infect the *T. molitor* larvae; estimated t_0 values for these conidia were twofold higher ($p<0.05$) than those from the conidia obtained under the normal atmosphere. On the other hand, in terms of the specific death rate (k), no significant differences ($p>0.05$) were found

Table 1 Virulence parameters of the *M. anisopliae* var. *lepidiotum* conidia obtained under the different modified atmospheres with *T. molitor* larvae as the host

O ₂ (%)	<i>k</i> (d ⁻¹)	<i>t</i> ₀ (d)	ST ₅₀ (d)
16	0.20±0.07 a	4.71±1.56 a	NR
21	0.24±0.10 a	3.49±0.72 a	9.87±1.99 a
26	0.14±0.08 a	3.69±0.35 a	10.63±1.95 a
30	0.22±0.07 a	4.14±0.056 a	8.0±1.29 a
40	0.34±0.07 a	7.32±0.34 b	NR

NR, Not reached, the conidia were not able to kill 50 % of the insects during the time of the bioassays

Where *k* is the specific death rate, *t*₀ is the time of the first insect death, and ST₅₀ is the survival time 50. Different lower case letters represent significant differences among oxygen treatments for each parameter (Tukey's test *p*<0.05)

among treatments, showing that after the infection all the conidia were able to kill the larvae at a similar rate.

Thermal tolerance of conidia

Temperature is one of the factors affecting the survival of the conidia during storage, transport, or field application (Faria et al. 2012). Hence, it is desirable that the conidia exhibit a high thermotolerance. The conidia produced by *M. anisopliae* var. *lepidiotum* under the different modified atmospheres were analysed, and the experimental data were fitted to the model proposed by Miranda-Hernández et al. (2014) ($R^2 \geq 0.95$). The specific viability decay rate (*k*') significantly varied among the conidia (*p*<0.05) from the different treatments (Table 2). The *k*' value for the conidia produced under the normal atmosphere was $0.95 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ and no significant differences were observed (*p*<0.05) between this value and that exhibited by the conidia produced under the atmosphere containing 26 % O₂ ($k' = 0.95 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$). Interestingly, the conidia produced under the modified atmospheres containing 16, 30, or 40 % O₂

Table 2 Thermotolerance parameters from the conidia produced by *M. anisopliae* var. *lepidiotum* under modified atmospheres containing different O₂ concentrations

O ₂ (%)	<i>k</i> ' (h ⁻¹)	ST ₅₀ (h)
16	0.79±0.02 b	0.87±0.02 a, b
21	0.95±0.07 c	0.76±0.03 a
26	0.95±0.04 c	0.79±0.05 a
30	0.57±0.02 a	1.21±0.04 c
40	0.82±0.04 b	0.92±0.05 b

Where *k*' is the specific viability decay rate and ST₅₀ is the time at which 50 % of the initial conidia were still viable

Different lower case letters represent significant differences among oxygen treatments for each parameter (Tukey's test *p*<0.05)

showed significantly lower *k*' values (*p*<0.05); conidia from the 30 % O₂ atmosphere exhibited higher thermotolerance (*p*<0.05) with $k' = 0.57 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$, thus, the rate of viability loss was 66.6 % slower compared to that under normal atmospheric conditions. In comparison to the ST₅₀ obtained under normal atmospheric conditions (0.76 h), this value was higher (*p*<0.05) in conidia obtained under 30 % O₂ pulses (1.21 h); similarly, the ST₅₀ of conidia obtained under 40 % O₂ increased by 20 %. These results showed that applying a modified atmosphere containing 30 or 40 % O₂ improved conidia thermotolerance in *M. anisopliae* var. *lepidiotum*.

Discussion

The application of modified atmospheres to cultures of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* for higher conidial productions was originally proposed by Tlecuitl-Beristain et al. (2010). In that work, the conidial production of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* was significantly improved when an oxygen-rich atmosphere containing 26 % O₂ was applied. On the other hand, a number of authors have studied the effects of oxygen-rich atmospheres (>70 % O₂) on the shelf life of vegetables by inhibiting the growth of fungi and bacteria (Amanatidou et al. 1999, 2000; Jacxsens et al. 2001).

In the present work, the application of modified atmospheres containing 26 or 30 % O₂ improved the conidial production and/or productivity in *M. anisopliae* var. *lepidiotum*. The application of oxidizing atmospheres during the growth of entomopathogenic fungi may affect the conidial production yields in a strain-dependent manner, showing differences between strains of the same species (Miranda-Hernández et al. 2014). Similarly to *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 increased the conidial production from 3.38×10^7 to 1.69×10^8 con cm⁻² when it was exposed to an atmosphere containing 26 % O₂. By contrast, the conidial production of *B. bassiana* was not affected by this kind of treatment, even worse the quality of the conidia produced was diminished due to the oxidative stress induced by the oxygen-rich atmosphere (Garza-López et al. 2012).

Interestingly, in the present work, the conidial production of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* was not affected by the application of an atmosphere containing up to 40 % O₂, as the conidial production was not significantly different from that observed under the normal atmosphere. The spore production of *Botrytis cinerea* can be negatively affected by the application of high O₂ concentrations (80–95 %) resulting in a spore production decrease from 1.4×10^6 to 4.5×10^5 spores mL⁻¹ (Jacxsens et al. 2001). Fungi that grew on the tobacco leaves increased their radial growth when exposed to high O₂ concentrations (40 % O₂) (Yang and Lucas 1970). The effect

of O₂ on bacterial growth varied significantly affecting the shelf life of minimally processed carrots (Amanatidou et al. 1999).

The fact that *M. anisopliae* var. *lepidiotum* can tolerate the application of high O₂ concentrations after 60 h of culture suggest that this fungi have developed substantial protective mechanisms against oxidative stress. This mechanism can include either ROS-decomposing enzymes generated by O₂ excess (e.g., catalases, peroxidases, and superoxide dismutases) or radical scavengers (e.g., glutathione) to avoid lethal damage by O₂ (Amanatidou et al. 1999; Garza-López et al. 2012). Similarly, when *Saccharomyces cerevisiae* is exposed to 100 % O₂ (hyperoxia), this microorganism develops a number of stress response factors, including those involved in antioxidant defence, heat shock, DNA and protein damage repair (Outten et al. 2005). In a similar way, when the *I. fumosorosea* conidia were obtained in the presence of an atmosphere containing 26 % O₂, the catalase activity increased by 50 % (Miranda-Hernández et al. 2014), and this same response was reported for *Neurospora crassa* when the strain was exposed to H₂O₂ (Aguirre et al. 2005; Angelova et al. 2005).

During the assays to determine the competence time to initiate the atmospheric modifications, the conidial production was positively affected only if the oxygen pulses begin at 60 h of growth under the normal atmosphere. This fact suggests a role of the physiological stage of the mycelia in the response to oxidizing atmospheres. Thus, in order to tolerate and obtain a positive response to the presence of high O₂ concentrations, it is necessary to have a “competent” fungal biomass before the first O₂ pulse application. This positive response consisted of the increase in conidial production without affecting their quality and virulence. To the best of our knowledge, this is the first time that a critical period is reported, for a positive effect to occur on conidiation of *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, applying oxidant atmospheres. However, other factors can trigger the conidiation process when applied at specific critical period of the fungal cultures (Sánchez-Murillo et al. 2004; Zhang et al. 2009). Sánchez-Murillo et al. (2004) working with a *I. fumosorosea* strain found that the conidiation can be improved by photoinduction with blue light pulses, only if those pulses were applied in a competent mycelia grown at least 72 h under darkness, before this critical time the blue light failed to induce conidiation. Therefore, it is possible that in our work the O₂ pulses play a role as a conidiation inducer in a similar way as the blue light. Indeed, some authors have observed that *N. crassa* hyphae directly exposed to air can develop a hyper-oxidant state and that this state is characterized by an increase of ROS. Previous findings suggested that the cellular differentiation mechanisms are triggered by processes designed to avoid cellular oxidative imbalance (Toledo et al. 1994; Aguirre et al. 2005).

Regarding to conidia quality, the viability is one of the most important quality tests. According to Jenkins and Grzywacz (2000), in order to guarantee the quality of a batch of conidia, the viability of the product, measured as germinated conidia, must be higher than 80 %; nevertheless, in this work, the viability was measured in terms of CFU, showing that conidia not only germinate, but also they were able to form a colony.

The decrease on the quality, specifically the viability of the conidia of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* produced under extreme oxidant conditions (16 or 40 % O₂), suggests that the fungus was suffering some kind of damage due to the O₂ itself or because of the formation of ROS. The ROS can damage different macromolecules leading to multiple metabolic alterations, including growth inhibition and possibly cellular oxidative imbalance (Amanatidou et al. 1999), this effect has been observed in *B. bassiana* biomass in cultures exposed to 16 % O₂ (Garza-López et al. 2012).

On the other hand, the low viability observed for the conidia obtained under atmospheres containing 16 or 40 % O₂ may be related to the failure to reach ST₅₀ during bioassays in both cases, since conidial virulence is directly correlated to viability (Safavi et al. 2007). According to Montesinos-Matías et al. (2011a), conidial germination in *B. bassiana* is well correlated to the conidial virulence against *T. molitor* larvae. Also, it has been showed that the conidial hydrophobicity is partially correlated to the virulence parameters (Montesinos-Matías et al. 2011b). Similarly in this study, we observed that the conidial hydrophobicity and the virulence of the conidia against *T. molitor* larvae were not strongly associated. In a recent report by Miranda-Hernández et al. (2014), conidia of *I. fumosorosea* obtained under a modified atmosphere containing 26 % O₂ exhibited high virulence against *Galleria melonella* larvae (waxworm), and also that these conidia developed a cross protection mechanism against other kinds of stresses, although this phenomenon was not detected in the present study with *M. anisopliae* var. *lepidiotum*.

Our results show that the application of modified atmospheres, containing high oxygen concentrations (e.g., 30 or 40 % O₂), improves the thermotolerance of the conidia produced. In fact, ST₅₀ values for conidia from 30 % O₂ were significantly higher than for other treatments. These results could be explained by the accumulation of trehalose, since it is known that this disaccharide can protect the cells against high temperatures (Abrashv et al. 2008); additionally, mutant cells that are incapable of accumulating trehalose are also incapable of developing thermotolerance when repeatedly exposed to high temperatures (Mensonides et al. 2005). In addition, the exposure of bacterial cells or fungal mycelia to a specific kind of environmental stress can promote the development of tolerance against other kinds of stresses; this phenomenon is known as cross protection (Rangel 2011).

It is also important to remark that the atmosphere composition is involved during the complete process of

mycoinsecticides production or conidiogenesis. In this regard, Faria et al. (2010) determined that the atmosphere modifications are also important during the storage, once conidia were harvested, as conidial viability was prolonged in low-O₂ atmospheres.

As concluding remarks, an increase in the oxygen concentration (up to 30 % O₂) improves the production and quality of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* conidia. This improvement could be achieved only if the O₂ pulse was applied after a critical preincubation period (60 h) under normal conditions (21 % O₂). Besides, the application of a modified atmosphere containing 30 % O₂ enhanced the quality of the conidia produced. On the other hand, the use of the modified atmosphere promoted a higher conidia thermotolerance perhaps due to a cross protection mechanism. Finally, the application of a modified atmosphere containing extreme oxygen concentrations (16 or 40 % O₂) negatively affected all the conidia quality parameters evaluated. These results have practical approaches in the design of production systems, since oxygen concentration is a controllable variable in a large-scale process.

Acknowledgments The authors thank the National Council for Science and Technology (CONACyT) for the scholarship to N. Garcia-Ortiz (248839), the Basic Science Project 152420-Z, and the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa).

References

- Abrashev RI, Pashova SB, Stefanova LN, Vassilev SV, Dolashka-Angelova PA, Angelova MB (2008) Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Can J Microbiol* 54(12):977–983. doi:10.1139/W08-091
- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13(3):111–118. doi:10.1016/j.tim.2005.01.007
- Amanatidou A, Smid E, Gorris L (1999) Effect of elevated oxygen and carbon dioxide on the surface growth of vegetable associated microorganisms. *J Appl Microbiol* 86(3):429–438. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00682.x
- Amanatidou A, Slump R, Gorris L, Smid E (2000) High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf life extension of minimally processed carrots. *J Food Sci* 65(1):61–66. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb15956.x
- Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Slokoska LS (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res* 109(2):150–158. doi:10.1017/S0953756204001352
- Belozerskaya T, Gessler N (2006) Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiol* 75(4):427–431. doi:10.1134/S0026261706040102
- Dorta B, Ertola RJ, Arcas J (1996) Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzym Microbiol Tech* 19(6):434–439. doi:10.1016/S0141-0229(96)00017-8
- Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43(3):237–256. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.08.001
- Faria M, Hotchkiss JH, Hajek AE, Wraight SP (2010) Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *J Invertebr Pathol* 105(1):74–83. doi:10.1016/j.jip.2010.05.011
- Faria M, Hotchkiss JH, Wraight SP (2012) Application of modified atmosphere packaging (gas flushing and active packaging) for extending the shelf life of *Beauveria bassiana* conidia at high temperatures. *Biol Control* 61(1):78–88. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.12.008
- Garza-López PM, Konigsberg M, Gómez-Quiroz LE, Loera O (2012) Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World J Microbiol Biotechnol* 28(1):353–359. doi:10.1007/s11274-011-0827-y
- Goettel MS, Inglis GD (1997) Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA (ed) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic, San Diego, pp 213–249
- Hansberg W, de Groot H, Sies H (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* 14(3):287. doi:10.1016/0891-5849(93)90025-P
- Jacxsens L, Devlieghere F, Van der Steen C, Debevere J (2001) Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *Int J Food Microbiol* 71(2):197–210. doi:10.1016/S0168-1605(01)00616-X
- Jenkins NE, Grzywacz D (2000) Quality control of fungal and viral biocontrol agents—assurance of product performance. *Biocontrol Sci Technol* 10(6):753–777. doi:10.1080/09583150020011717
- Kamp A, Bidochka M (2002) Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett Appl Microbiol* 35(1):74–77. doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01128.x
- Li J, Feng MG (2009) Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycol Res* 113(1):93–99. doi:10.1016/j.mycres.2008.08.006
- López Lastra CC, Hajek AE, Humber RA (2002) Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Can J Bot* 80(10):1126–1130. doi:10.1139/B02-090
- Mensonides FI, Brul S, Klis FM, Hellingwerf KJ, de Mattos MJT (2005) Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl Environ Microb* 71(8):4531–4538. doi:10.1128/AEM.71.8.4531-4538.2005
- Miranda-Hernández F, Saucedo-Castañeda G, Alatorre-Rosas R, Loera O (2014) Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Manag Sci* 70:661–666. doi:10.1002/ps.3605
- Montesinos-Matias R, Viniestra-Gonzalez G, Alatorre-Rosas R, Gallardo-Escamilla F, Loera O (2011a) Virulence and growth phenotypes variation in mutant strains of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. resistant to 2-deoxy-D-glucose. *Agrociencia* 45(8):929–942
- Montesinos-Matias R, Viniestra-González G, Alatorre-Rosas R, Loera O (2011b) 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 J Microbiol Biotechnol* 27(9):2095–2102. doi:10.1007/s11274-011-0672-z
- Outten C, Falk R, Culotta V (2005) Cellular factors required for protection from hyperoxia toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 388(1):93–101. doi:10.1042/BJ20041914
- Prakash GVB, Padmaja V, Kiran RRS (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 99(6):1530–1537. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.031

- Rangel DE (2011) Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World J Microbiol Biotechnol* 27(6):1281–1296. doi:10.1007/s11274-010-0584-3
- Rangel DE, Braga GU, Anderson AJ, Roberts DW (2005) Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J Invertebr Pathol* 88(2):116–125. doi:10.1016/j.jip.2004.11.007
- Rodríguez-Gómez D, Loera O, Saucedo-Castañeda G, Viniestra-González G (2009) Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World J Microbiol Biotechnol* 25(3):513–518. doi:10.1007/s11274-008-9917-x
- Safavi S, Shah FA, Pakdel AK, Reza Rasoulian G, Bandani AR, Butt TM (2007) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol Lett* 270(1):116–123. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x
- Sánchez-Murillo RI, de la Torre-Martínez M, Aguirre-Linares J, Herrera-Estrella A (2004) Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiol* 150(2):311–319. doi:10.1099/mic.0.26717-0
- Shah FA, Allen N, Wright CJ, Butt TM (2007) Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 276(1):60–66. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00927.x
- Tarocco F, Lecuona RE, Couto AS, Arcas JA (2005) Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol* 68(4):481–488. doi:10.1007/s00253-005-1901-x
- Tlecuitl-Beristain S, Viniestra-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. *Mycopathol* 169(5):387–394. doi:10.1007/s11046-009-9268-7
- Toledo I, Aguirre J, Hansberg W (1994) Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiol* 140(9):2391–2397. doi:10.1099/13500872-140-9-2391
- Yang H, Lucas G (1970) Effects of N₂-O₂ and CO₂-O₂ tensions on growth of fungi isolated from damaged flue-cured tobacco. *Appl Microbiol* 19(2):271–277
- Zhang YJ, Li ZH, Luo ZB, Zhang JQ, Fan YH, Pei Y (2009) Light stimulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci Technol* 19(1):91–101. doi:10.1080/09583150802588516
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56(6):1875–1881