



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología

“Producción de conidios de hongos entomopatógenos en estado oxidante y análisis de su respuesta a distintos tipos de estrés”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

José Francisco Miranda Hernández
Químico Farmacéutico Biólogo y
Maestro en Biotecnología

Director: Dr. Octavio Loera Corral
Asesores: Dra. Raquel Alatorre Rosas
Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

México, D.F.

Septiembre de 2014

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

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado: 224792

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

México, D.F. a 11 de Septiembre de 2014

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

Producción de conidios de hongos entomopatógenos en estado oxidante y análisis de su respuesta a distintos tipos de estrés

que presentó:

M. en B. José Francisco Miranda Hernández

Comité Tutorial

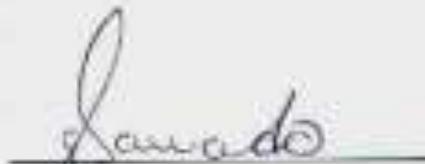
Director: Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora: Dra. Raquel Alatorre Rosas, Colegio de Posgraduados

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, Universidad Autónoma Metropolitana

Jurado:

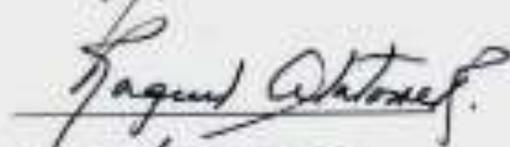
Presidente: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda



Secretario: Dr. Javier Barrios González



Vocal: Dra. Raquel Alatorre Rosas



Vocal: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00140

Matrícula 208181583

PRODUCCION DE CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS EN ESTADO OXIDANTE Y ANALISIS DE SU RESPUESTA A DISTINTOS TIPOS DE ESTRES

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 11 del mes de septiembre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ



JOSE FRANCISCO MIRANDA HERNANDEZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera 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:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: JOSE FRANCISCO MIRANDA HERNANDEZ

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

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

VOCAL

[Signature]
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

VOCAL

[Signature]
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

SECRETARIO

[Signature]
DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, es un orgullo ser egresado de esta institución.

Al CONACyT por la beca otorgada (224792).

A mi director de tesis, Dr. Octavio Loera, por la confianza y guía que me diste durante el desarrollo de esta investigación. Y también por las pláticas que no tenían nada que ver con ella, pero que me permitieron conocerte y admirarte más.

A mis asesores, Dra. Raquel Alatorre y Dr. Gerardo Saucedo, por sus comentarios y apoyo. Por su amplia y generosa contribución a este proyecto. GRACIAS.

Al Dr. Javier Barrios y Dr. Luis Gómez, ha sido un privilegio tenerlos como revisores y jurado. Mi admiración y agradecimiento a ustedes.

Al Dr. Gustavo Viniegra, una referencia para mí como investigador y persona.

Al Dr. Wilhelm Hansberg, por permitirme trabajar en su laboratorio.

A Dios, lo que sea que verdaderamente represente esa palabra.

A mi país, MÉXICO, que amo tanto y que ha soportado tantas injusticias.

A mis padres, guías y ejemplos gigantes. Con toda mi admiración y cariño SIEMPRE.

A mis hermanos, Toño, Martha, Gaby, Lourdes, Geor y Marcela, gracias por su apoyo, por sus palabras y cercanía en momentos difíciles y de alegría, por ser quienes son, INIGUALABLES.

A mis amados sobrinos, Beto, Estela, Sandy, Cris, Fernanda, Ale, Sofía, Óscar, Enrique, Pablo y Alejandro, disfruten los retos, es una de las partes más maravillosas de la vida.

A Julia, tu compañía y amistad es invaluable. Gracias por la paz que me transmites con tu sola presencia. Por tu paciencia y comprensión.

A los estimados doctores de la UAM-Xochimilco que me mostraron este camino maravilloso de la investigación científica: Aída, Jaime, Hugo, Laura y Alejandro.

A mis compañeros de laboratorio: Saúl, Marcos, Erick, Roberto, Armando, Misael, Alejandro, Jazmín y Nohemi, mi recuerdo de esta investigación será, inevitablemente, el recuerdo también de ustedes.

A Denisse Clavijo y Vanessa Vega, por su valiosa asesoría.

A todas las personas que han dejado algo bueno en mi vida, que me han dado un consejo, una sonrisa, una palmada de ánimo. **Bienhechores.**

RESUMEN

El control biológico, como parte del Manejo Integrado de Plagas (MIP), es una de las alternativas viables a considerar en busca de moderar el uso de los plaguicidas químicos, debido a que éstos han venido presentando problemas en su uso, como es: toxicidad para el ser humano y medio ambiente, desarrollo de resistencia de insectos, toneladas de plaguicidas caducados abandonados a cielo abierto en países en desarrollo, por mencionar sólo algunos ejemplos de ello. Además, en vista de las crecientes necesidades en la producción agrícola y debido al constante crecimiento poblacional a nivel mundial, es indispensable el desarrollo de técnicas alternativas eficientes en el control de plagas y responsables en el cuidado del ambiente.

Los principales puntos a considerar para el desarrollo de insecticidas biológicos basados en hongos (micoinsecticidas), son la producción y la calidad de sus conidios (unidades infectivas). Por calidad en los conidios, se entiende la capacidad que tienen éstos, tanto de infectar y matar a los insectos objetivo, como de prevalecer en el medio donde actúan. En esta investigación se evaluó el efecto de una atmósfera rica en oxígeno (26%) en la calidad de los conidios de 2 cepas de *Isaria fumosorosea*, 1 cepa de *Metarhizium anisopliae* y 1 cepa de *Beauveria bassiana*, tres de los hongos más utilizados en el control biológico de plagas. Además se presenta, a manera de antecedente, el efecto que tuvo esta atmósfera respecto a la producción de conidios.

De manera general, la atmósfera con 26% O₂ causó efectos disímiles en la calidad de los hongos entomopatógenos estudiados. Es importante destacar que, si bien no se obtuvo un efecto homogéneo, se encontraron resultados que pueden ser considerados para un estudio más profundo y poder producir micoinsecticidas de mayor calidad. Esto fue muy evidente en las dos cepas de *I. fumosorosea*, en las que la atmósfera enriquecida, propició un incremento en la infectividad, resistencia a altas temperaturas, germinación y resistencia a condiciones de hiperosmolaridad. Mientras que en el caso de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, esta atmósfera tuvo una influencia positiva respecto a resistencia a altas temperaturas (*M. anisopliae*) y en lo que respecta a germinación, resistencia a condiciones de hiperosmolaridad e hiperoxidantes (*B. bassiana*).

En la búsqueda de una posible explicación del efecto positivo de la atmósfera con 26% O₂ en las dos cepas de *I. fumosorosea*, no se pudo determinar que la trehalosa y el manitol fueran un factor a considerar para ello.

El estudio del estado oxidante en conidios, y su probable variación entre una atmósfera normal (21% O₂) y la atmósfera enriquecida (26% O₂), ofreció resultados de mayor interés. En los conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea*, se encontró un incremento, tanto en el grado general de estrés oxidante, como en la concentración del anión superóxido. El consecuente estudio de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), arrojó resultados interesantes al no encontrarse incrementos en la actividad SOD, pero sí en la actividad CAT.

Se logró la secuenciación parcial de dos genes de enzima catalasa en *I. fumosorosea*, denominadas *catA* y *catP* por su localización en el espacio celular.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Definición de plaga. Plaguicidas: definición, historia y efectos secundarios.....	16
1.2. Manejo Integrado de Plagas (MIP). Control Biológico: definición, agentes, ventajas y desventajas, comparación con el control químico.	17
1.3. Hongos entomopatógenos: características, clasificación taxonómica, proceso infeccioso, productos comerciales, caso México.	20
1.4. Factores a considerar en el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico: Sistema inmune del insecto, factores abióticos.....	26
1.5. El dióxígeno (O ₂): Importancia y efectos secundarios en organismos eucariotas. Producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Los ERO, ¿señalizadores celulares? Enzimas y compuestos antioxidantes.	27
1.6. Solutos compatibles: definición, características, presencia en hongos, naturaleza química, protección a diversas condiciones de estrés.	31
1.7. Estrés celular y protección cruzada (<i>cross protection</i>): Definición de estrés celular, factores y condiciones causantes de estrés, respuesta celular, estrés subletal, concepto de protección cruzada y ejemplos de ello en hongos entomopatógenos.	32
1.8. Expresión de genes. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35
2. ANTECEDENTES	38
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	41
5.1. General.....	41
5.2. Particulares.....	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1. Microorganismos.....	42
6.2. Medio harina de avena	43
6.3. Atmósferas estudiadas	43
6.4. Bioensayo	44
6.5. Pruebas de calidad.....	46
6.5.1. Termotolerancia	47
6.5.2. Germinación	48

6.5.3. Germinación en condiciones de hiperosmolaridad	49
6.5.4. Resistencia a peróxido de hidrógeno	49
6.6. Cuantificación de trehalosa y manitol.....	50
6.7. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)	51
6.8. Cuantificación de actividad superóxido dismutasa (SOD)	52
6.9. Cuantificación de actividad catalasa.....	53
6.10. Genes de enzima catalasa.....	53
6.10.1. Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	54
6.10.2. Secuenciación e identificación de los genes amplificados	55
6.11. Análisis estadístico	55
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
7.1. Producción de conidios (antecedentes)	56
7.2. Bioensayo	58
7.2. Pruebas de calidad.....	62
7.2.1. Termotolerancia.....	62
7.2.2. Germinación de conidios en dos condiciones: normal (G) y en hiperosmolaridad (GEO)	66
7.2.3. Resistencia a peróxido de hidrógeno	73
7.3. Cuantificación de trehalosa y manitol.....	78
7.4. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)	82
7.5. Cuantificación de actividad superóxido dismutasa (SOD)	85
7.6. Cuantificación de actividad catalasa.....	87
7.7. Genes de enzima catalasa.....	89
7.7.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	90
7.7.2. Secuenciación e identificación de los genes amplificados	95
8. CONCLUSIONES	97
9. PERSPECTIVAS.....	98
10. BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXOS.....	120
Anexo A. Cromatograma a partir del cual se determinó el tiempo de retención del manitol (21.5 min) y de la trehalosa (26.6 min).	120

Anexo B. Efecto del tratamiento 26 (26% O ₂) en la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos en comparación con el tratamiento AN (21% O ₂).	122
Anexo C. Imágenes del funcionamiento de los compuestos DCFH y DHE, para la cuantificación de ROS.	123
Anexo D. Curva estándar para la determinación de actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD).	124
Anexo E. Primers degenerados utilizados para buscar la amplificación de 5 genes de enzima catalasa en las dos cepas de <i>I. fumosorosea</i> (CNRCB1 y ARSEF 3302).	125
Anexo F. Cinéticas de viabilidad (%) de los conidios de dos cepas de <i>I. fumosorosea</i> (ARSEF3302 y CNRCB1), después de ser expuestos a dos temperaturas (38 y 40°C)...	126
Anexo G. Gráficas del segundo experimento de germinación en medio SDA (G) y germinación en medio SDA más NaCl (GEO), de los 4 hongos entomopatógenos.	128
Anexo H. Cuantificación, en Unidades de Fluorescencia (UF), del grado general de estrés oxidante (DCFH) y del anión superóxido (DHE) de los conidios de las dos cepas de <i>I. fumosorosea</i> (CNRCB1 y ARSEF 3302).	130
Anexo I. Secuencias obtenidas de los productos de PCR que evidenciaron la amplificación de <i>catA</i> y <i>catD</i> en <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1.	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Tres tipos de agentes de control biológico.....	18
Figura 1.2. Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos.....	23
Figura 1.3. Plagas combatidas con hongos entomopatógenos pertenecientes a la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB).....	25
Figura 1.4. Vías de formación de las principales especies reactivas del oxígeno.....	27
Figura 1.5. Sustratos y productos de reacción de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.....	29
Figura 1.6. Estructuras químicas del poliol manitol y el disacárido trehalosa.....	31
Figura 1.7. Efectos que inducen la activación de los Elementos de Respuesta a Estrés (STRE's) y los factores controlados por éste.....	33
Figura 1.8. Ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la amplificación de un gen objetivo.....	36
Figura 6.1. Hongos entomopatógenos <i>M. anisopliae</i> , <i>I. fumosorosea</i> y <i>B. bassiana</i> , creciendo en medio PDA.....	41
Figura 6.2. Inyección de una atmósfera enriquecida (26% O ₂) a una botella serológica con medio harina de avena en el que crece <i>M. anisopliae</i>	43
Figura 6.3. Cadáveres de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectados con <i>B. bassiana</i> y de <i>Galleria mellonella</i> infectada con <i>I. fumosorosea</i>	45
Figura 6.4. Tubos de vidrio con tapa de rosca que contienen 1 mL de suspensión de conidios de <i>I. fumosorosea</i> expuestos a un estrés térmico húmedo.....	46
Figura 7.1. Producción de conidios de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en atmósfera normal y atmósfera enriquecida.....	55
Figura 7.2. Producción de conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 e <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 en atmósfera normal y atmósfera enriquecida.....	56
Figura 7.3. Perfiles de sobrevivencia de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> al ser infectadas con <i>B. bassiana</i> 882.5.....	57
Figura 7.4. Sobrevivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> después de ser infectadas con conidios de dos cepas de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 y CNRCB1.....	59
Figura 7.5. Porcentaje de germinación en medio SDA y germinación en condiciones de hiperosmolaridad de los conidios de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX.....	66

Figura 7.6. Porcentaje de germinación en medio SDA y germinación en condiciones de hiperosmolaridad de los conidios de <i>B. bassiana</i>	67
Figura 7.7. Porcentaje de germinación en medio SDA y germinación en condiciones de hiperosmolaridad de los conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1.....	68
Figura 7.8. Porcentaje de germinación en medio SDA y germinación en condiciones de hiperosmolaridad de los conidios de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF.....	69
Figura 7.9. Porcentaje de viabilidad de los conidios de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	73
Figura 7.10. Porcentaje de viabilidad de los conidios de <i>B. bassiana</i> en diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	73
Figura 7.11. Porcentaje de viabilidad de los conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	74
Figura 7.12. Porcentaje de viabilidad de los conidios de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302 en diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	75
Figura 7.13. Cuantificación del grado general de estrés oxidante y del anión superóxido en los conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 expuestos a los tratamientos de atmósfera normal y enriquecida.....	82
Figura 7.14. Cuantificación del grado general de estrés oxidante y del anión superóxido en los conidios de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 expuestos a los tratamientos de atmósfera normal y enriquecida.....	83
Figura 7.15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 y ARSEF 3302, expuestos a una atmósfera normal y pulsos de una atmósfera enriquecida.....	85
Figura 7.16. Actividad catalasa de los conidios de las cepas de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 y CNRCB1, expuestos a una atmósfera normal y a pulsos de una atmósfera rica en oxígeno.....	87
Figura 7.17. Geles de electroforesis de productos de dos experimentos de PCR hechos a temperaturas de hibridación de 55°C y 52°C para <i>B. bassiana</i>	89
Figura 7.18. Gel de electroforesis de productos de PCR hecho a una temperatura de hibridación de 55°C.....	90
Figura 7.19. Gel de electroforesis de productos de PCR hecho a una temperatura de hibridación de 52°C.....	91

Figura 7.20. Gel de electroforesis de productos de PCR hechos a una temperatura de hibridación de 52°C.....	92
Figura 7.21. A: Gel de electroforesis de productos de PCR hecho a una temperatura de 55°C para buscar amplificación del gen <i>catD</i>	93
Figura 7.22. Resultados de la búsqueda de homologías de la secuencia obtenida del producto de PCR de <i>catA</i> (forward) de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1, en el BLAST de nucleótidos de la página del NCBI.....	94
Figura 7.23. Resultados de la búsqueda de homologías de la secuencia obtenida del producto de PCR de <i>catD</i> (forward) de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1, en el BLAST de nucleótidos de la página del NCBI.....	94
Figura 7.24. Resultados de la búsqueda de homologías de la secuencia obtenida del producto de PCR de <i>catD</i> (forward) de <i>B. bassiana</i> 882.5, en el BLAST de nucleótidos de la página del NCBI.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Cronología del desarrollo de los plaguicidas.....	15
Tabla 1.2. Ventajas y desventajas en el uso del Control Biológico.....	18
Tabla 1.3. Comparativo entre el control biológico y químico: desventajas.....	19
Tabla 1.4. Clasificación taxonómica de <i>M. anisopliae</i> de acuerdo al NCBI.....	20
Tabla 1.5. Clasificación taxonómica de <i>B. bassiana</i> de acuerdo al NCBI.....	20
Tabla 1.6. Clasificación taxonómica de <i>I. fumosorosea</i> de acuerdo al NCBI.....	21
Tabla 1.7. Productos comerciales de micoinsecticidas en México.....	24
Tabla 1.8. Factores y condiciones causantes de estrés celular en levaduras.....	32
Tabla 1.9. Casos de protección cruzada en hongos entomopatógenos.....	34
Tabla 1.10. Componentes de la solución para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	35
Tabla 6.1. Números de acceso al GenBank de los hongos entomopatógenos estudiados y las publicaciones donde se reportaron.....	42
Tabla 6.2. Composición de la solución de PCR utilizada en la búsqueda de la amplificación de 5 genes codificantes de enzima catalasa.....	53
Tabla 6.3. Temperatura y tiempo de las etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usados en la búsqueda de amplificación de genes catalasa con primers degenerados.....	54
Tabla 7.1. Parámetros de infectividad hacia larvas de <i>T. molitor</i> , de los conidios de <i>B. bassiana</i> (tratamientos AN y 26).....	58
Tabla 7.2. Parámetros de infectividad de dos cepas de <i>I. fumosorosea</i> , en larvas de <i>G. mellonella</i>	60
Tabla 7.3. Resultados de dos experimentos de termotolerancia (38°C) para dos cepas de <i>I. fumosorosea</i>	63
Tabla 7.4. Resultados de dos experimentos de termotolerancia (40°C) para dos cepas de <i>I. fumosorosea</i>	63
Tabla 7.5. Concentración letal 50 (CL ₅₀) de H ₂ O ₂ (mM) para los conidios de los cuatro hongos entomopatógenos estudiados.....	74

Tabla 7.6. Cuantificación de la concentración del poliol manitol y el disacárido trehalosa en los conidios de los cuatro hongos entomopatógenos estudiados.....78

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de plaga. Plaguicidas: definición, historia y efectos secundarios.

En el Código Internacional de Conducta para el Manejo de Plaguicidas (FAO, 2013), se define como “plaga” a cualquier especie, cepa o biotipo de planta, animal o agente patógeno dañino para plantas y sus productos, materiales o medio ambiente e incluye vectores de parásitos o patógenos de enfermedades humanas y animales. En el caso de los insectos, de las 800,000-1,000,000 de especies que se postula que existen, no más de 1,000 ($\approx 0.1\%$) han sido consideradas como plagas (NCSU, 2014). Para combatir estas últimas, a través de la historia, se han usado varios compuestos plaguicidas. Un plaguicida se define como cualquier sustancia, o mezcla de sustancias, con ingredientes químicos o biológicos destinada para repeler, destruir o controlar cualquier plaga (FAO, 2013). En la Tabla 1, se describe una breve cronología del desarrollo de los plaguicidas.

Tabla 1.1. Cronología del desarrollo de los plaguicidas (Stephenson y Salomon, 1993).

Periodo	Tipo de plaguicida	Características
1800-1920	Nitrofenoles, clorofenoles, creosota, naftaleno, aceites de petróleo	No-específicos. Tóxicos para usuario y organismos benéficos.
1945-1955	Organoclorados, DDT, HCCH, ciclodieno clorados.	Persistentes. Inducen resistencia. Efectos dañinos al ambiente.
1945-1970	Inhibidores de colinesterasa, compuestos organofosforados, carbamatos.	Baja persistencia. Toxicidad para usuario. Problemas ambientales.
1970-1985	Piretroides sintéticos, avermectinas, plaguicidas biológicos	Baja selectividad. Desarrollo de resistencia. Costo. Persistencia Variable.
1985-	Organismos modificados genéticamente	Posibles problemas de mutación. Desequilibrio en la ecología microbiana. Monopolio de productos.

Desde hace 5 décadas, la protección de los cultivos ante las plagas ha recaído principalmente en los plaguicidas de síntesis química (Chandler *et al.*, 2011). Sin embargo, con el transcurso de los años, se han venido evidenciando las desventajas que conlleva su uso; entre las más importantes se pueden citar: incremento en la resistencia de insectos plaga (Dawkar *et al.*, 2013), toxicidad para el ser humano (Cornell University, 2014), residuos químicos tóxicos de plaguicidas caducados (FAO, 2004), entre otros.

Respecto a los daños a la salud humana, la Agencia de Protección al Medio Ambiente de los Estados Unidos, establece que esto depende del tipo de plaguicida. Por ejemplo, los organofosforados y carbamatos afectan el sistema nervioso; otros pueden ocasionar irritación en piel y ojos; algunos pueden ser considerados carcinógenos, mientras que otros pueden afectar el sistema endocrino (EPA, 2014). Recientemente, se ha evidenciado que la rotenona es un importante inductor para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Flint, 2010). Además de lo anterior, hay que considerar los daños que éstos causan al medio ambiente. En la Convención de Estocolmo se han hecho esfuerzos por eliminar el uso de los compuestos orgánicos persistentes (POP's por sus siglas en inglés) ya que, además de ser tóxicos para el ser humano y animales, se mantienen intactos por largo tiempo, distribuyéndose en el medio ambiente en suelo, agua y aire. En un primer esfuerzo por eliminar el uso de estas sustancias, se enlistaron los 12 POP's más dañinos, de estos, 9 fueron plaguicidas (Stockholm Convention, 2014).

En fechas recientes, han aparecido varios reportes en los que se relaciona la preocupante disminución en la población apícola y los plaguicidas químicos, específicamente debido a los neonicotinoides (Whitehorn et al., 2012; Henry et al., 2012). Aunado al daño que conlleva el uso de los plaguicidas, hay que considerar el daño que causan aquellos que han quedado obsoletos. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2014), se considera que aproximadamente medio millón de toneladas de plaguicidas obsoletos se encuentran dispersos en diversos países en desarrollo. De manera preocupante, estos químicos tóxicos, comúnmente expuestos en el medio ambiente, se han estado filtrando en suelos y cuerpos de agua, lo que compromete seriamente el desarrollo y bienestar de esas comunidades. Lo anterior, sólo evidencia que ha sido una constante el uso indiscriminado de este tipo de compuestos sin una seria evaluación científica respecto a sus efectos secundarios. Por ello, es indispensable encontrar alternativas efectivas en el control de plagas y amigables con el planeta.

1.2. Manejo Integrado de Plagas (MIP). Control Biológico: definición, agentes, ventajas y desventajas, comparación con el control químico.

En la década de 1970, se concertó el desarrollo de un nuevo programa para el manejo de plagas, conocido como Manejo Integrado de Plagas (MIP). De acuerdo a la FAO (2013), el MIP tiene como objetivo considerar todas las técnicas disponibles para el control de plagas, considerando la protección al medio ambiente, además de reducir al mínimo los riesgos para

la salud humana y animal. El MIP incita el desarrollo de campos saludables, disminuyendo el daño a los agro-ecosistemas al promover el uso de mecanismos naturales para el control de plagas. De acuerdo a Pretty (2008), se han desarrollado proyectos de investigación y desarrollo de MIP en 26 países de los cuales, en el 60% se logró una reducción en el uso de plaguicidas (75% en promedio) y un incremento en los rendimientos (40% en promedio). En el 20% de esos proyectos, también se disminuyó el uso de plaguicidas (60% promedio) con una pequeña pérdida en el rendimiento (5% promedio). Finalmente, en el 15% de esos proyectos, se logró un incremento en el rendimiento (45% promedio) aunque esto incluyó un aumento en el uso de plaguicidas (20% promedio). En otros proyectos, también concluyeron que la aplicación de MIP fue exitosa (FAO, 2010; Normile, 2013).

En 1919, H.S. Smith introdujo el término de “control biológico” y lo definía como el uso de enemigos naturales para el control de insectos plaga (Barrera, 2007). De manera general, este concepto puede entenderse como la reducción en la población de plagas causada por enemigos naturales y típicamente involucra un papel activo del ser humano (Hoffmann y Frodsham, 1993). Ya que, cuando las especies de insectos son eliminadas por otros organismos y factores ambientales sin intervención humana, a esto se le denomina control natural.

A los enemigos naturales de los insectos plaga (Fig. 1.1), también se les conoce como agentes de control biológico, y pueden clasificarse en tres grupos principalmente (Stehr, 1975; Van den Bosch, 1982; Greathead y Waage, 1983), a saber:

- **Depredadores:** especies de vida libre principalmente; consumen un gran número de presas durante su vida.
- **Parásitos:** en su etapa inmadura, se desarrollan sobre o dentro de un insecto hospedero, ocasionando su muerte.
- **Patógenos (entomopatógenos):** organismos causantes de enfermedades, entre los cuales se incluyen bacterias, hongos, virus y nematodos. Matan o debilitan a su hospedero siendo relativamente específicos para cierto grupo de insectos.

Hay que considerar que en la aplicación del control biológico, existen tanto ventajas como desventajas, un breve resumen de ambas se muestra en la Tabla 1.2. (Summy y French, 1988).



Figura 1.1. Tres tipos de agentes de control biológico: depredadores (A); parásitos (B) y patógenos (C).

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas en el uso del Control Biológico.

Control Biológico	
Ventajas	Desventajas
Efectos colaterales nulos o mínimos	Ignorancia sobre los principios del método
Casos de resistencia esporádicos	Apoyo económico reducido
Control a largo plazo	Escasez de personal especializado
Eliminación total o parcial del uso de insecticidas químicos	Poca disponibilidad de insumos biológicos
Favorable relación costo-beneficio	Agentes de control biológico susceptibles a plaguicidas
Evita plagas secundarias	Resultados no espectaculares (desconfianza de agricultores)
Constituye la parte central del MIP	Estudios detallados de la relación agente biológico-insecto y planta hospedera
No provoca intoxicaciones	

Debido a que la contaminación del medio ambiente es un problema prioritario a nivel mundial, resulta imprescindible evaluar los diversos métodos de control de plagas para, en lo posible, evitar el incremento del mismo. Una comparación de las desventajas entre el control biológico y químico, se presentan en la Tabla 1.3. (Debach y Rosen, 1991).

Tabla 1.3. Comparativo entre el control biológico y químico: desventajas.

Categoría	Control biológico	Control químico
Contaminación ambiental; riesgos para el ser humano, animales, organismos no objetivo, suelos, etc.	Ninguno	Considerable
Trastornos en el equilibrio natural y otros daños en la ecología	Ninguno	Común
Permanencia en el control	Permanente	Temporal. Debe repetirse una o varias veces al año
Desarrollo de resistencia del factor de mortalidad	Extremadamente raro	Común. Incrementándose rápidamente
Aplicación general hacia un amplio espectro de control de plagas	Teóricamente ilimitado, pero sin esperar que se aplique a todas las plagas. Aún sin desarrollar. El control inicialmente toma de uno a dos años, pero después la plaga permanece en bajos niveles.	Empíricamente se aplica a casi todos los insectos, aunque en algunos casos resulta insatisfactorio. Para el usuario resulta satisfactorio en el inicio.

1.3. Hongos entomopatógenos: características, clasificación taxonómica, proceso infectivo, productos comerciales, caso México.

A nivel mundial, se considera que existen entre 1.5-5.1 millones de especies de hongos (Hawksworth, 1991; O'Brien *et al.*, 2005), de las cuales sólo 100,000 han sido descritas. Respecto a los hongos entomopatógenos, se sabe que existen entre 750-1000 especies, distribuidos en 100 géneros (Roberts y Humber, 1981). Entre ellos, los más utilizados para la fabricación comercial de micoinsecticidas son *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* (Faria y Wright, 2007).

Metarhizium anisopliae. Forma conidióforos simples o agregados; sus conidios son alargados, de forma ovoide, formando cadenas de ellos dispuestas en conidióforos en forma de botella. El tamaño de los conidios es de 6-8 micras, de color verde olivo, por ello, la enfermedad que provocan a los insectos se ha denominado "muscardina verde" (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999a). En 1883, Sorokin fue el primero en establecer el género *Metarhizium* (Zimmermann, 2007a). Se sabe que *M. anisopliae* fue el primer hongo, a nivel mundial, en producirse de manera masiva y ser utilizado para el control de insectos plaga (Krassiltschik, 1888; Steinhaus, 1975). Se ha reportado que este hongo es un

patógeno natural para más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, entre ellos, algunos de importancia económica (McCoy et al., 1988). La clasificación taxonómica de este hongo, de acuerdo al National Center for Biotechnology Information (NCBI), se presenta en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Clasificación taxonómica de *M. anisopliae* de acuerdo al NCBI.

<i>Metarhizium anisopliae</i>	Reino	Fungi
	Phylum	<i>Ascomycota</i>
	Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
	Clase	<i>Sordariomycetes</i>
	Orden	<i>Hypocreales</i>
	Familia	<i>Clavicipitaceae</i>
	Género	<i>Metarhizium</i>
	Especie	<i>anisopliae</i>

Beauveria bassiana. Su apariencia es polvosa, de color blanco o amarillento cremoso, tiene hifas septadas que contienen los conidióforos (estructuras reproductivas) en los que se desarrollan los conidios, que tienen un tamaño de entre 2-3 micras (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999b). El descubrimiento de este hongo como un agente patógeno a insectos ocurrió en el S. XIX, cuando Agostino Bassi estudió la enfermedad llamada “muscardina blanca” en los gusanos de la seda (*Bombyx mori*). Uno de los primeros estudios, se hizo para evaluar el uso de este hongo para infectar al llamado gusano blanco *Melolontha melolontha* (plaga en campos de vid y olivo), y se realizó a finales del S. XIX (Zimmermann, 2007b). Una de las características más importantes de este hongo, es el amplio rango de insectos a los que afecta, estimándose hasta 707 especies (Li, 1988). La clasificación taxonómica de este hongo se muestra en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Clasificación taxonómica de *B. bassiana* de acuerdo al NCBI.

<i>Beauveria bassiana</i>	Reino	Fungi
	Phylum	<i>Ascomycota</i>
	Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
	Clase	<i>Sordariomycetes</i>
	Orden	<i>Hypocreales</i>
	Familia	<i>Cordycipitaceae</i>
	Género	<i>Beauveria</i>
	Especie	<i>bassiana</i>

Isaria fumosorosea. Es un hongo cuyas colonias presentan un micelio blanco que puede cambiar a púrpura o rosa. Sus fiálides tienen forma de botella y sus conidios son cilíndricos, con un tamaño de 3-4 micras. La primera descripción de este hongo fue hecha por Wize y ocurrió en el inicio del S XX. Por muchos años fue incluido en la sección *Paecilomyces*, por lo que fue conocido como *Paecilomyces fumosoroseus* (Zimmermann, 2008). Los estudios taxonómicos posteriores, determinaron que este hongo debía ser agrupado dentro del género *Isaria* (Luangsa-ard *et al.*, 2004, 2005), por ello, ahora es conocido con este nombre. Se ha reportado que el número de especies de insectos que pueden ser hospederos de este hongo es de 40 (Smith, 1993). A pesar de infectar a un menor número de insectos hospederos, la efectividad de *I. fumosorosea* ha sido evaluada en insectos plaga de gran importancia agrícola como *Bemisia tabaci* y *Diaphorina citri* (Macias *et al.*, 2013; Mascarini *et al.*, 2013; Stauderman *et al.*, 2012). La clasificación taxonómica de este hongo se muestra en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Clasificación taxonómica de *I. fumosorosea* de acuerdo al NCBI.

<i>Isaria fumosorosea</i>	Reino	Fungi
	Phylum	<i>Ascomycota</i>
	Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
	Clase	<i>Sordariomycetes</i>
	Orden	<i>Hypocreales</i>
	Familia	<i>Cordycipitaceae</i>
	Género	<i>Isaria</i>
	Especie	<i>fumosorosea</i>

Proceso infeccioso. Se ha descrito un proceso de infección general de los hongos entomopatógenos, el cual se muestra en la Figura 1.2. Las principales etapas son:

1. **Adhesión.** Una infección exitosa requiere, en el inicio, la adhesión del conidio a la cutícula del insecto. Para ello, son necesarias interacciones hidrofóbicas (Holder y Keyhani, 2005), las cuales son mediadas por proteínas parecidas a adhesinas, como las MAD1 y MAD2 en el caso de *M. anisopliae* (Wang y St. Leger, 2007).
2. **Germinación.** Este es un paso crítico durante el proceso y se caracteriza por la formación del tubo germinativo, con la subsecuente formación, o no, de una estructura llamada apresorio que ejercerá una fuerza opresiva en la superficie del insecto (Vega *et al.*, 2012). Entre los principales factores que afectan la germinación están la temperatura y la humedad (Gottlieb, 1978). La rapidez con que suceda este

proceso, repercute no sólo en reducir la exposición de los conidios a los factores ambientales, sino también para evitar una respuesta del insecto, lo que afectaría el éxito en el proceso infectivo. Este paso es de tal importancia, que en algunas investigaciones, se ha relacionado una rápida germinación con un incremento en la infectividad (Milner *et al.*, 1991; Morales-Hernández *et al.*, 2010; Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

3. *Penetración de la cutícula*. El éxito de esta etapa recae, principalmente, en la presión mecánica y en la producción de enzimas como proteasas, quitinasas y lipasas (Vega *et al.*, 2012).
4. *Proliferación en hemocele*. Una vez que el hongo ha alcanzado el hemocele, su proliferación propicia la enfermedad del insecto y su muerte. En estudios realizados con *M. anisopliae*, se ha teorizado una “estrategia de crecimiento” y otra llamada “estrategia de toxinas”. La primera, refiere al consumo de los nutrientes y al daño de los tejidos del insecto por parte del hongo. La segunda, enfatiza la producción de metabolitos secundarios (toxinas) para matar al hospedero (Charnley, 1984; Clarkson y Charnley, 1996; Kershaw *et al.*, 1999).

Una vez muerto el insecto, pueden emerger las hifas del hongo desde el interior del cadáver, esporular y producir nuevos conidios.

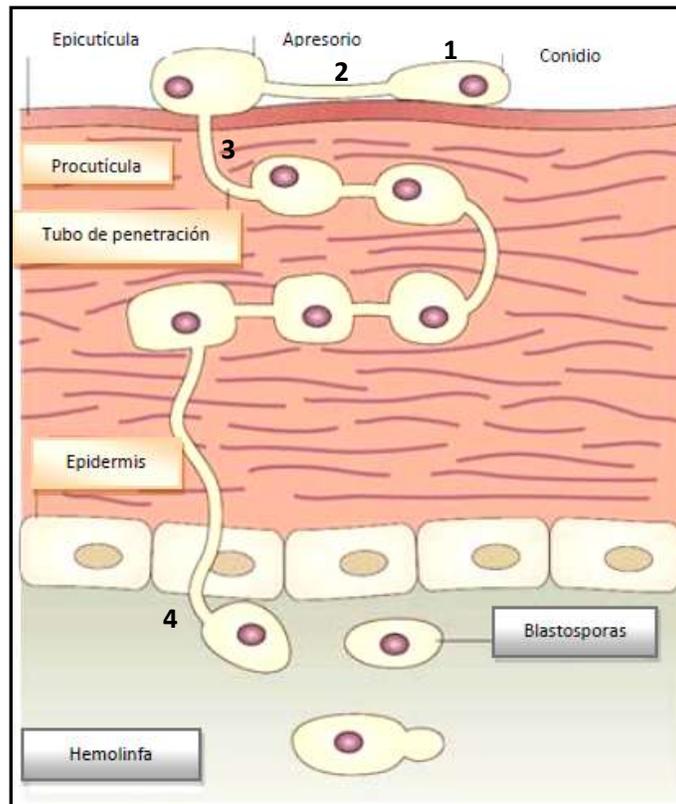


Figura 1.2. Proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos. Se indican las principales etapas: **1** Adhesión del conidio a la epicutícula, **2** Germinación, **3** Penetración de la cutícula, **4** Proliferación en el hemocele (Modificado de Thomas y Read, 2007).

Productos comerciales. De acuerdo a de Faria y Wright (2007), desde 1960 se han desarrollado 171 productos micoinsecticidas y micoacaricidas, de los cuales, el 75% continúan en el mercado. En tal investigación se reporta que los principales hongos en los que se basan estos productos son: *M. anisopliae* (33.9%), *B. bassiana* (33.9%), *I. fumosorosea* (5.8%) y *B. brongniartii* (4.1%). En términos geográficos, la distribución de estos es de 42.7% en Sudamérica, 20.5% en Norteamérica, 12.3% en Europa y Asia, 7% en América Central, 2.9% en África y 2.3% en Oceanía. En el caso de México, en la tabla 1.7. se relacionan algunos de los productos comerciales presentes en el mercado.

Tabla 1.7. Productos comerciales de micoinsecticidas en México (Arredondo-Bernal, 2013).

Nombre de la empresa	Hongos entomopatógenos comercializados	Estado
TIEMELONLA NICK K LUM S. DE S.S.	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	Chiapas
DESARROLLO LÁCTEO, S.P.R. DE R.L. (DESLAC)	<i>Isaria fumosorosea</i> <i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Durango
BIOKRONE, S.A. de C.V.	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Guanajuato
ALTA TECNOLÓGICA AGROTÉCNICA SPR. DE R.L. DE C.V.	<i>Lecanicillium lecanii</i> <i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Jalisco
LABORATORIO REPRODUCTOR DE ORGANISMOS BENÉFICOS NOCON, S. A. DE C.V.	<i>Lecanicillium lecanii</i> <i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	México
ULTRAQUIMIA AGRÍCOLA S.A. DE C.V.	<i>Paecilomyces lilacinus</i> <i>L. lecanii</i> <i>I. fumosorosea</i> <i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Morelos
AGROBIOLÓGICOS DEL NOROESTE S.A. DE C.V	<i>P. lilacinus</i> <i>L. lecanii</i> <i>I. fumosorosea</i> <i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Sinaloa
AGROBIOSOL DE MÉXICO S.A DE C.V.	<i>P. lilacinus</i> <i>I. fumosorosea</i> <i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	
BIOTECNOLOGÍA ANDREB S.A. DE C.V.	<i>I. fumosorosea</i> <i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Veracruz

Caso México. De acuerdo a un reporte del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2009), para combatir diversas plagas se utilizaron hongos entomopatógenos pertenecientes al CNRCB, en un área de 63,180 ha siendo las

más importantes, por la extensión tratada, la mosca pinta (24,000 ha), broca del café (8,320 ha) y mosquita blanca (6,491 ha). Un desglose de ello, puede observarse en la Fig. 1.3.

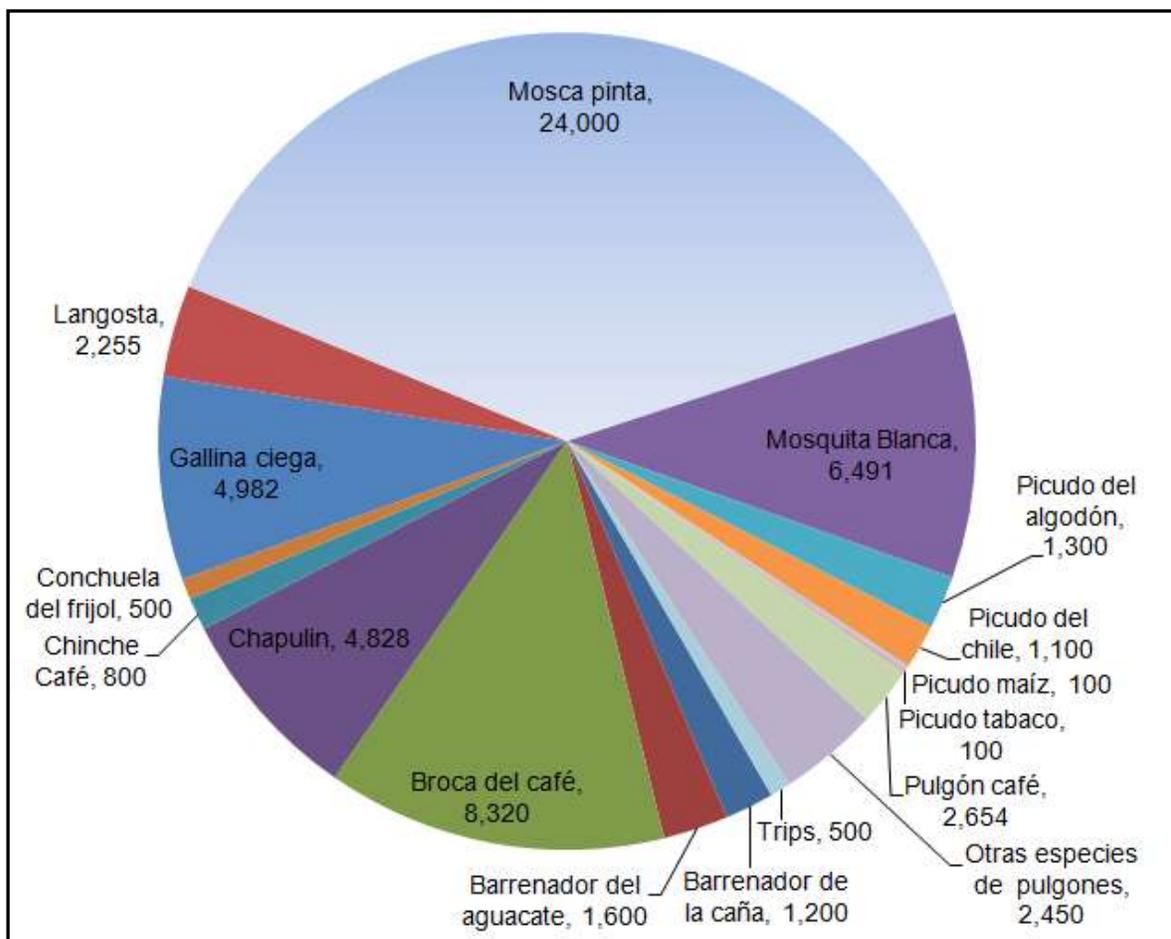


Figura 1.3. Plagas combatidas con hongos entomopatógenos pertenecientes a la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB). Se muestran las diversas plagas tratadas y las hectáreas cubiertas (SENASICA, 2009).

1.4. Factores a considerar en el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico: Sistema inmune del insecto, factores abióticos.

Sistema inmune del insecto. Una vez reconocido el antígeno por el sistema inmune del insecto, se desencadenan diversas respuestas para combatir la infección. Entre las más importantes se pueden citar fagocitosis, péptidos antimicrobianos, coagulación, melanización y producción de especies reactivas del oxígeno (Schmid-Hempel, 2005).

Factores Abióticos. Una vez que los conidios de los hongos entomopatógenos son asperjados en campo, enfrentan condiciones que ponen en riesgo su viabilidad y, por tanto,

su eficacia en el control de plagas. Se ha reportado que, entre los factores que mayormente inciden en esto, está la radiación ultra violeta (UV), la temperatura y la humedad, como se explica a continuación:

- **Radiación UV.** Se sabe que existen tres tipos de radiación UV de acuerdo a su longitud de onda: tipo C (100-280 nm), tipo B (280-315) y tipo A (315-400). La radiación UV-C no alcanza la superficie terrestre debido a la capa de ozono; sin embargo, tanto la UV-A como la UV-B sí lo hacen, siendo la más dañina para la viabilidad de los conidios la de tipo UV-B. Esta radiación causa deterioro en biomoléculas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, además de la membrana celular (Tevini, 1993). La protección natural que han desarrollado diversos organismos a esto, entre ellos los hongos, es la producción de pigmentos. En diversas investigaciones, se ha encontrado que una mayor pigmentación de los conidios, propicia un incremento en la tolerancia a radiación UV (Ignoffo y Garcia, 1992; Braga *et al.*, 2006).
- **Temperatura.** Se ha determinado que la temperatura óptima de crecimiento de los hongos entomopatógenos, está en el rango de 20 y 30°C (Roberts y Campbell, 1977). Sin embargo, es común que, en los lugares donde se busca aplicarlos, las temperaturas sean significativamente mayores. El daño de las altas temperaturas sobre los conidios se observa, principalmente, en la desorganización a nivel membrana celular (Crisan, 1973), en la desnaturalización proteica (Setlow y Setlow, 1995, 1998), así como en el deterioro a nivel ADN por la pérdida de bases por depurinización (Nicholson *et al.*, 2000).
- **Humedad.** De acuerdo a Jaronski (2010), este factor es muy importante en la germinación de los conidios, así como en su crecimiento y esporulación sobre el cadáver del insecto. Además, en el reporte hecho por Roberts y Campbell (1977), se citan varios estudios en los que se comprueba que para lograr la infección del insecto, los conidios requieren altos valores de humedad, aunque en otros casos no fue así. Sin embargo, Ferron (1977), demostró que el desarrollo micelial de *B. bassiana* en el cadáver del insecto, requiere al menos 92% de humedad.

1.5. El dióxigeno (O₂): Importancia y efectos secundarios en organismos eucariotas. Producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Los ERO, ¿señalizadores celulares? Enzimas y compuestos antioxidantes.

Importancia y efectos secundarios en organismos eucariotas. De acuerdo a registros geoquímicos, la acumulación atmosférica del oxígeno en la Tierra, tuvo lugar hace

aproximadamente 2.8 mil millones de años, propiciado por los precursores de las cianobacterias (Dismukes *et al.*, 2001). De manera general, se ha estimado que los organismos eucariotas surgieron hace mil millones de años, muchos años después que la atmósfera del planeta había acumulado grandes cantidades de oxígeno a partir de procesos fotosintéticos (Margulis, 1970). Esta gran acumulación de O₂, propició la innovación biológica de la respiración aerobia que es una fuente de energía metabólica de mayor magnitud ya que el metabolismo aerobio, genera 18 veces más energía (en forma de ATP) que el metabolismo anaerobio (Dismukes *et al.*, 2001).

Producción de ERO. El uso del oxígeno como aceptor final de electrones para la producción de energía en los organismos aerobios, también es fuente de moléculas que pueden propiciar daños celulares. A tales moléculas se les conoce como especies reactivas del oxígeno (ERO); la Figura 1.4. muestra las vías de formación de las más importantes.

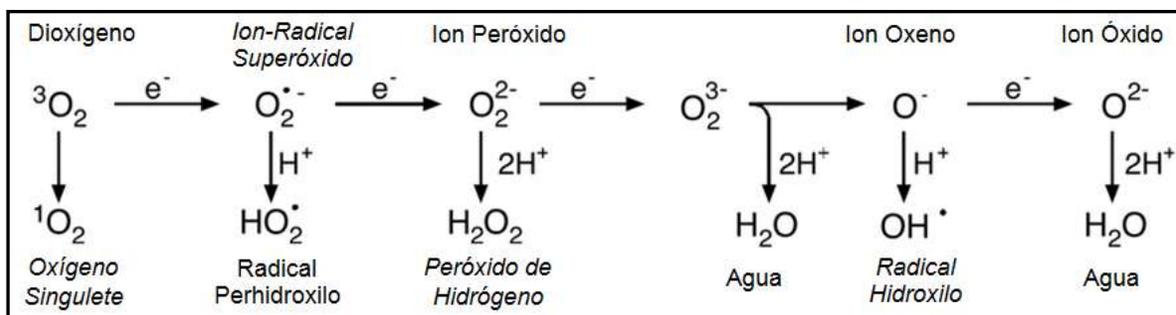


Figura 1.4. Vías de formación de las principales especies reactivas del oxígeno (ERO, en cursivas), a partir del dióxígeno (Modificado de Rodríguez y Redman, 2005).

A continuación, se resume brevemente la formación de estas especies reactivas (Hansberg, 2008):

- **Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$):** Su formación se debe, al cambio de giro de uno de sus electrones por captación de energía. Tal energía puede derivarse de la excitación de compuestos como las flavinas, porfirinas y derivados, vitamina A, quinonas y pterinas. La excitación se debe a la luz con longitud de onda de 430-490 nm (azul). Además, la luz UV-A, también puede transferir energía para su formación. Esta especie reactiva reacciona, y daña, a la mayoría de los compuestos celulares (lípidos, bases nitrogenadas, proteínas).
- **Ion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$):** Se forma cuando el dióxígeno capta un electrón, el cual, se aparea con uno de los dos electrones libres de los orbitales π^* . Su producción se da

principalmente en la cadena respiratoria, en el momento que el dioxígeno capta alguno de los electrones que pasan a través de ella, principalmente a nivel de la ubiquinona. Otra fuente de formación, aunque menos importante, es a partir de la NADPH oxidasas o NOX. El superóxido es tóxico para la célula porque, a partir de él, se puede producir el oxígeno singulete y el radical hidroxilo. Este ERO, propicia la inhibición de enzimas como la aconitasa y fumarasa del ciclo de Krebs.

- **Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2):** Cuando cada uno de los dos electrones libres del dioxígeno, se aparean con un electrón de giro contrario, se forma el H_2O_2 . La principal fuente de producción de este ERO en las células, se debe a la actividad de las enzimas superóxido dismutasas (dismutan el anión superóxido a peróxido de hidrógeno). Otras fuentes de formación son algunas oxidasas. Su difusión es libre en los compartimentos celulares. A nivel intracelular, su toxicidad es considerable a concentraciones de $1 \mu M$, ya que puede formar otros ERO como el oxígeno singulete y el anión superóxido (por la reacción de Fenton).
- **Radical Hidroxilo ($\cdot OH$):** La principal fuente de este ERO son, como se reseñó arriba, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Si el H_2O_2 acepta un electrón desapareado (puede ser de un metal en transición, reacción de Fenton), se fragmenta, formando esta especie reactiva y esta es la principal fuente de su formación. Este ERO es una de las especies más reactivas que existen, debido a ello, oxida componentes del ADN (bases nitrogenadas y la desoxirribosa), proteínas y lípidos.

Los ERO ¿señalizadores celulares?. Es interesante que, además del consabido daño que propician los ERO, se postule su función como señalizadores en células eucariotas, en un estado normal. Tanto el H_2O_2 como el $O_2^{\cdot -}$, se han implicado en procesos fisiológicos como transducción de señales, proliferación celular y expresión de genes (Bedard y Krause, 2007; Droge, 2002). Todo lo anterior derivado, principalmente, de la producción controlada de ERO por las enzimas NOX. De acuerdo a Aguirre *et al.*, (2005), existe evidencia del importante papel que tiene los ERO en diversos procesos fisiológicos celulares, por ejemplo: el incremento de ERO durante la diferenciación celular; la existencia de enzimas productoras de ERO (NOX); la participación de estas enzimas en procesos de desarrollo y, finalmente, la conservación de mecanismos de transducción de señales usadas para detectar ERO.

Enzimas antioxidantes. Debido a los daños que ocasionan los ERO, los organismos debieron desarrollar mecanismos para neutralizar, en lo posible, su efecto nocivo. Los principales

mecanismos celulares para ello, son las enzimas antioxidantes como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa.

- **Superóxido dismutasa:** La función de esta familia de enzimas es la dismutación del ion-anión superóxido, con la consecuente producción de peróxido de hidrógeno y dióxígeno (Figura 1.5./1). Estas enzimas necesitan de cofactores como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} . En el caso de los hongos, se ha reportado la existencia de dos tipos de SOD, localizadas principalmente en el citosol y la mitocondria (Weisiger y Fridovich, 1973; Crapo *et al.*, 1992).
- **Catalasa:** Su función radica en la descomposición del H_2O_2 , produciendo H_2O y dióxígeno, para lo cual requieren de dos moléculas del peróxido, utilizando una como agente reductor y la otra como agente oxidante (Figura 1.5./2). Respecto a los hongos, la estructura y función de estas enzimas es diversa, específicamente en episodios de estrés oxidante que ocurre durante su crecimiento y desarrollo (Bussink y Oliver, 2001; Scherer *et al.*, 2002; Chagas *et al.*, 2008). En el caso de los hongos entomopatógenos, Wang *et al.*, (2013) han descrito la función y localización de 5 catalasas en *B. bassiana*.
- **Glutatión peroxidasa:** Se clasifica como una selenoproteína, debido al aminoácido selenocisteína que la conforma y que se localiza en el sitio activo de esta enzima. Su función es, como en el caso de la catalasa, la degradación del H_2O_2 solo que, a diferencia de ella, requiere el glutatión como agente reductor. Los productos de tal reacción son agua y glutatión oxidado (Figura 1.5./3). Su concentración dentro de la célula es milimolar, no se encuentra en plantas superiores ni bacterias, sin embargo sí se ha reportado en hongos (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008).

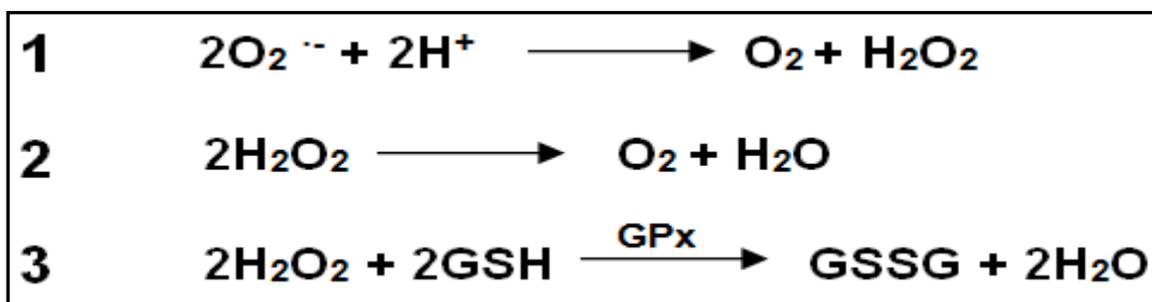


Figura 1.5. Sustratos y productos de reacción de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (1), catalasa (2) y glutatión peroxidasa (3).

1.6. Solutos compatibles: definición, características, presencia en hongos, naturaleza química, protección a diversas condiciones de estrés.

El término soluto compatible puede aplicarse a compuestos que pueden proteger macromoléculas y células en condiciones de estrés como son altas temperaturas, desecación y congelamiento (da Costa *et al.*, 1998). Estos pueden ser azúcares, polioles, aminoácidos y sus derivados, y se caracterizan por ser compatibles con el metabolismo celular aun en concentraciones molares (Kurz, 2008). En el caso de los polioles y la trehalosa (disacárido), se ha estudiado la participación que tienen en la protección en membranas y proteínas celulares (Carpenter y Crowe, 1988; Colaco *et al.*, 1992; Crowe *et al.*, 1988). Estos compuestos se han asociado con el incremento en la resistencia a altas temperaturas, germinación acelerada, así como aumento en la patogenicidad, (Fillinger *et al.*, 2001; Hallworth y Magan, 1994b; 1995).

Tales compuestos, además de estar asociados en respuestas celulares ante situaciones de estrés, son utilizados como carbohidratos de almacenamiento, siendo los más comunes para este fin el glicerol, manitol, eritritol, arabitol y trehalosa (Blumenthal, 1976). Se sabe que muchos hongos acumulan carbohidratos de almacenamiento cuando se desarrollan en medios ricos en fuente de carbono (Pfyffer y Rast, 1980). De acuerdo a Lee (1967), en su estudio con *Aspergillus* sp., cuando se creció a este hongo en un medio con glucosa como fuente de carbono, el 34% de ésta se utilizó para el crecimiento del hongo, mientras que el 53% fue usado para la formación de polioles.

Manitol. Es un polialcohol, derivado de la fructuosa por hidrogenación de grupos carbonilo para formar grupos hidroxilo. Su fórmula química es $C_6H_8(OH)_6$ (Fig. 1.6./A). Es una de las moléculas más abundantes de almacenamiento de carbón y energía que existen en la naturaleza, producido por una gran diversidad de organismos como bacterias, levaduras, hongos, algas, líquenes y numerosas plantas (Wiselink *et al.*, 2002). En hongos, este compuesto ha sido asociado en el incremento en la resistencia a diversos factores como radiación UV-B y temperatura (Rangel *et al.*, 2008a), desecación (Zakharova *et al.*, 2013), así como en procesos infectivos (Calmes *et al.*, 2013). En estudios hechos con hongos entomopatógenos, se evidenció que el manitol es el poliol que se encuentra en mayor concentración en los conidios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. farinosus* cuando éstos se desarrollan en cultivos con glucosa como fuente de carbono (Hallsworth y Magan, 1994a, 1997).

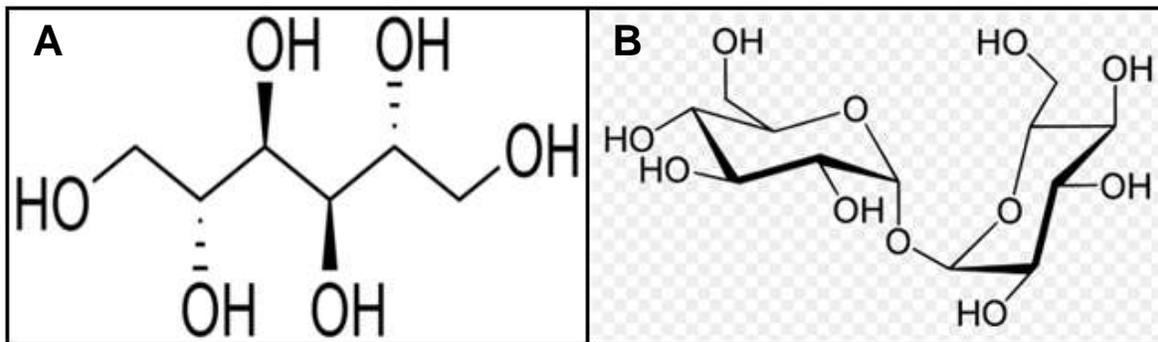


Figura 1.6. Estructuras químicas del poliol manitol (A) y el disacárido trehalosa (B). Ambos son considerados como carbohidratos de almacenamiento, así como compuestos que participan en la protección a diversos tipos de estrés.

Trehalosa. Es un disacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa. Su fórmula química es $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Fig. 1.6./B). Este compuesto se encuentra en una amplia variedad de organismos como bacterias, hongos, protozoarios y plantas (Fillinger *et al.*, 2001). En hongos, este disacárido es muy común en etapas reproductivas y vegetativas (Elbein, 1974); la síntesis de este disacárido se intensifica en procesos de diferenciación celular, así como en periodos de escases de nutrientes (Thevelein, 1984), por ello ha sido considerado como un carbohidrato de reserva que, en procesos como el de germinación, es metabolizado (Van Laere, 1989). Al igual que el manitol, la trehalosa ha sido asociada con incrementos en la resistencia a estados de estrés celular como: altas temperaturas (McBride y Ensign, 1987; Rangel *et al.*, 2008a), choque hiperosmótico (Mackenzie *et al.*, 1988), desecación (Zakharova *et al.*, 2013), procesos infectivos (Salmerón-Santiago *et al.*, 2011). En diversas investigaciones se ha evidenciado que la principal contribución de este compuesto ante condiciones adversas es la protección a las proteínas, así como la integridad de la membrana (Crowe *et al.*, 1984; Colaco *et al.*, 1994).

1.7. Estrés celular y protección cruzada (*cross protection*): Definición de estrés celular, factores y condiciones causantes de estrés, respuesta celular, estrés subletal, concepto de protección cruzada y ejemplos de ello en hongos entomopatógenos.

Todos los organismos vivos se caracterizan porque, para su óptimo desarrollo, precisan de determinadas condiciones: pH, presión atmosférica, radiación, temperatura, osmolaridad, disponibilidad (o no) de oxígeno, etc. Cualquier cambio respecto a estas condiciones puede comprometer su desarrollo y, más aún, cuando estos cambios son extremos, su supervivencia. Una condición de estrés puede definirse, de manera general, como aquella

que ocasiona una reducción en la tasa de crecimiento (Ruis y Schüller, 1995). El estrés celular, por tanto, puede definirse como cualquier condición ambiental que amenaza la supervivencia celular, o al menos impide su desarrollo óptimo (Hohmann y Magan, 2003a). En la tabla 1.8., se enlistan los diversos factores reportados que ocasionan estrés celular en levaduras (Mager y Moradas-Ferreira, 1993; Mager y Varela, 1993; Piper, 1993).

Tabla 1.8. Factores causantes de estrés celular en levaduras.

Factor
Carencia de nutrientes
Uso de fuentes de carbono no fermentables
Oxígeno, metabolitos del oxígeno
Altas temperaturas
Bajas temperaturas
Iones de metales pesados
Alta osmolaridad
Baja osmolaridad
Valores bajos o altos de pH
Agentes dañinos del ADN
Altas concentraciones de etanol
Desecación

La respuesta celular ante una condición de estrés, implica la activación de algunas proteinquinasas o el metabolismo del disacárido trehalosa. Lo anterior con dos finalidades principalmente: proveer a la célula de una protección inmediata (aunque limitada), y el inicio de respuestas retardadas como es la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) o enzimas que degraden los radicales tóxicos del oxígeno, tales respuestas retardadas permitirán la protección a largo plazo, permitiendo la adaptación celular a un estrés persistente (Ruis y Schüller, 1995). Entre los daños celulares que desatan una respuesta antiestrés está: la desnaturalización de proteínas (Craig y Gross, 1991), acidificación interna (Coote *et al.*, 1991), alteración en las estructuras del citoesqueleto (Chowdhury *et al.*, 1992), además de los cambios en los niveles del AMP cíclico (Piper, 1993). A nivel del genoma, resulta interesante que, en condiciones de estrés, en la mayoría de los genes, se disminuye o anula su expresión, mientras que sólo una minoría la incrementa. Por lo anterior, se ha estudiado el papel de componentes celulares sensibles a situaciones de estrés que forman parte del sistema de transcripción celular. Ejemplos de ello son los elementos de choque térmico (HSE's), los factores de transcripción de choque térmico (HSF's) y los elementos de

respuesta a estrés (STRE's). Un ejemplo de los factores y efectos que influyen en los STRE's se observa en la figura 1.7.

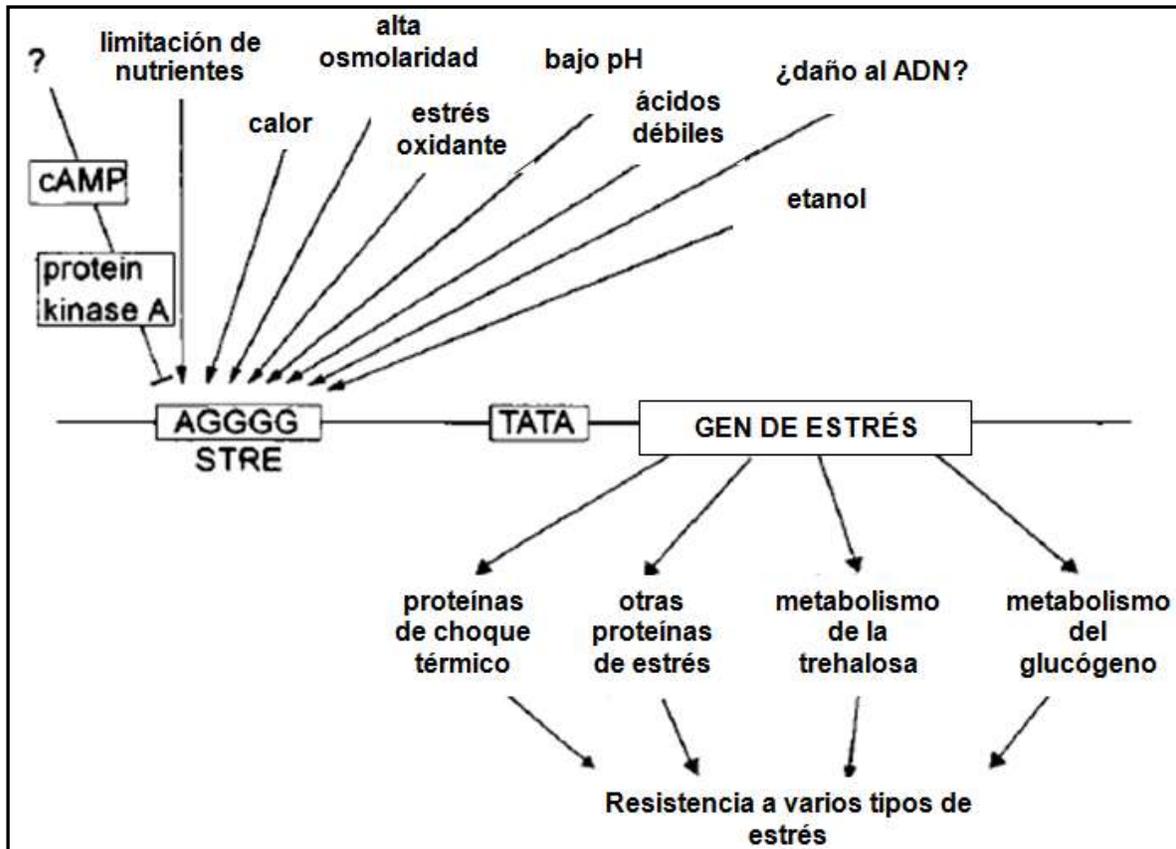


Figura 1.7. Efectos que inducen la activación de los Elementos de Respuesta a Estrés (STRE's) y los factores controlados por éste (modificado de Ruis y Schüller, 1995).

Existe un tipo de estrés que ha sido estudiado de manera particular por los relevantes resultados que se han encontrado en él, el llamado "estrés subletal". El término subletal, refiere los cambios repentinos, mas no extremos, en las condiciones de crecimiento de los microorganismos; hay que considerar que, a pesar de lo que puede sugerir la palabra, este tipo de estrés puede causar la muerte de altas proporciones de células que se exponen al mismo y, aun las que sobreviven, presentan daños considerables al menos inicialmente, los cuales propician respuestas sistémicas no específicas a una sola condición (Hohmann y Magan, 2003b). Precisamente es que, por esta respuesta inespecífica, se han encontrado diversos casos en los que, al exponer a un microorganismo a un estrés subletal específico, se encuentra que dicho microorganismo no sólo es resistente a un estrés de igual naturaleza pero de mayor magnitud, sino que tal resistencia se presenta ante estrés de diferente

naturaleza. Este interesante fenómeno ha sido llamado “protección cruzada” o *cross protection* en inglés. Algunos ejemplos de esto encontrados en hongos entomopatógenos, se enlistan en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9. Casos de protección cruzada en hongos entomopatógenos.

Hongo entomopatógeno	Estrés subletal	Protección cruzada	Referencia
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Osmótico (NaCl 0.4 M)	Temperatura (45°C- 3 h)	Rangel <i>et al.</i> , 2008a
<i>M. anisopliae</i>	Temperatura (45°C- 40 min)	Radiación (UV-B)	Rangel <i>et al.</i> , 2008a
<i>M. anisopliae</i>	Alcalino pH 9.45 (NaOH)	Radiación (UV-B)	Rangel y Roberts, 2007
<i>M. anisopliae</i>	Nutritivo (Sin fuente de C)	Radiación (UV-B)	Rangel <i>et al.</i> , 2008a
<i>M. anisopliae</i>	Oxidante (Menadiona 0.1 M)	Temperatura (45°C- 3 h)	Rangel <i>et al.</i> , 2008a
<i>Isaria fumosorosea</i>	Oxidante (26% O ₂)	Temperatura (38°C y 40°C) Osmótico (NaCl 0.5 M)	Miranda-Hernández <i>et al.</i> , 2014

En la búsqueda de la explicación del fenómeno de protección cruzada, es imprescindible el estudio genético de los microorganismos en los que se ha evidenciado este efecto. Específicamente, es necesario el estudio de la expresión de los genes o proteínas que se ha comprobado que participan en ello. De acuerdo a Hohmann y Magan (2003b), el criterio para identificar los genes implicados en la adquisición de resistencia a estrés, se basa en que el silenciamiento o la sobreexpresión del gen en cuestión, propicien un fenotipo de mayor relevancia, esto es, que aumente o disminuya su crecimiento o sobrevivencia a elevadas temperaturas u osmolaridad.

1.8. Expresión de genes. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el año de 1993, Kary Mullis ganó el Premio Nobel en química por el desarrollo de la técnica que permitía estudiar la replicación de uno o varios genes *in vitro*. Los componentes para una reacción de PCR se enlistan en la Tabla 1.9.

Tabla 1.10. Componentes de la solución para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Componente	Función
Cebadores o primers	Segmento de ADN. Usado como punto de inicio para la replicación hecha por la polimerasa. Complementarios al extremo 3' de cada hebra de la porción ADN objetivo
Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's)	Nucleótidos que tienen tres grupos fosfato. A partir de ellos, la polimerasa puede sintetizar las nuevas cadenas de ADN
Solución buffer	Provee un medio químico adecuado para la correcta actividad de la enzima polimerasa
ADN polimerasa	Enzima que se encarga de la replicación del material genético. Frecuentemente se usa la extraída de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> o Taq polimerasa.
Muestra de ADN	Material genético del organismo objetivo

Esta técnica, conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se compone de 3 pasos:

1. **Desnaturalización:** En este paso se busca la desnaturalización del ADN, a partir de su exposición a temperaturas cercanas a los 100°C.
2. **Hibridación:** Se baja drásticamente la temperatura, considerando la temperatura de hibridación o alineamiento (T_m) característica de los cebadores o primers utilizados.
3. **Elongación:** En este paso se considera la temperatura óptima de la enzima polimerasa (72°C), para conseguir la replicación del material genético objetivo.

Estos tres pasos integran el ciclo del método (Fig. 1.8.), y el número de ciclos dependerá de las metodologías adoptadas en cada experimento. Por ejemplo, con 40 ciclos de una reacción ideal de PCR, una sola molécula de ADN producirá aproximadamente 10^{12} amplicones, que son las réplicas obtenidas en cada ciclo (Krebs *et al.*, 2011).

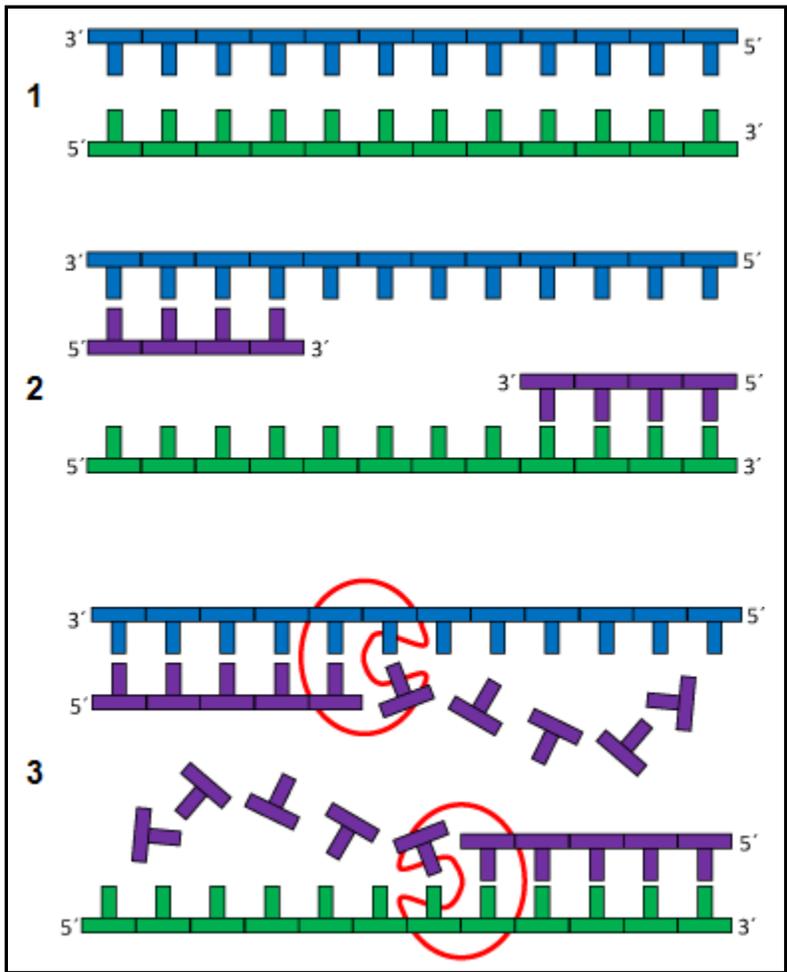


Figura 1.8. Ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la amplificación de un gen objetivo. Este método consta de tres pasos: Desnaturalización (1), Hibridación (2) y Elongación (3).

2. ANTECEDENTES

Entre los hongos entomopatógenos más utilizados para la elaboración comercial de micoinsecticidas y micoacaricidas, se encuentran *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* (de Faria y Wright, 2007). Hay que considerar que, en la selección de un hongo para su uso comercial, no sólo se requiere una probada patogenicidad de éste hacia los organismos objetivo sino, además, su capacidad de sobrevivencia en el lugar donde es requerido, características de crecimiento y esporulación, además de estabilidad genética (Tarocco *et al.*, 2005).

A través de los años, diversos métodos de cultivo han sido evaluados con el objetivo de incrementar la producción y/o calidad de los conidios (unidades infectivas) de los hongos entomopatógenos. Ejemplo de lo anterior es, la evaluación del medio de cultivo (Kamp y Bidochka, 2002; Mascarín *et al.*, 2010), cultivos bifásicos (Qiu *et al.*, 2013), relación carbono-nitrógeno (Gao y Liu, 2010), uso de texturizantes (Nuñez-Gaona *et al.*, 2010; Angel-Cuapio, 2011), concentración de oxígeno (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). Un método que recientemente ha sido estudiado, es la exposición de los hongos a condiciones no óptimas de crecimiento. En tales investigaciones, se ha reportado que esas condiciones han propiciado el incremento en la calidad de conidios (Rangel *et al.*, 2008b; Rangel y Roberts, 2007; Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

En el año 2010, se publicó el primer estudio científico en el que se evaluó la respuesta de un hongo entomopatógeno a una atmósfera rica en oxígeno (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). En él se reporta que, al exponer al hongo *M. anisopliae* a una atmósfera con 26% O₂, este duplicó su producción de conidios respecto a lo producido por este mismo hongo en una atmósfera normal (21%O₂), sin encontrar cambios en los parámetros de calidad (germinación, hidrofobicidad, infectividad). Por otra parte, Garza-López *et al.*, (2012) estudiaron el efecto de dos atmósferas distintas a la normal (16% y 26% O₂) en el hongo *B. bassiana*. En esa investigación, la producción de conidios se incrementó en al menos 82% cuando se expuso al hongo a las atmósferas modificadas (transcurridos 2 d), aunque al final del tiempo de cultivo (8 d), los rendimientos en todos los tratamientos fueron similares. En ese estudio, el porcentaje de germinación de los conidios producidos en las atmósferas modificadas resultó menor comparativamente con la atmósfera normal.

En una etapa anterior de la presente investigación (Miranda-Hernández, 2010), se estudió el efecto de una atmósfera enriquecida (26% O₂) en la producción y calidad de los conidios de 4 hongos entomopatógenos: *M. anisopliae*, *B. bassiana* y dos cepas de *I. fumosorosea*. Entre los resultados más relevantes se encontró que, tanto en una de las cepas de *I. fumosorosea* (ARSEF 3302), como en *M. anisopliae*, la atmósfera modificada propició un incremento en la producción de conidios. Además, en el caso de *M. anisopliae* y ambas cepas de *I. fumosorosea*, los conidios producidos en la atmósfera rica en oxígeno presentaron una mayor viabilidad, además de incrementar su resistencia a altas temperaturas.

Uno de los tópicos más interesantes que ha sido estudiado recientemente, es la participación de enzimas antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa, en importantes procesos celulares de los conidios de hongos entomopatógenos, como la germinación, infectividad, resistencia a temperatura, resistencia a radiación UV-A y B (Morales-Hernández *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2010 y 2012).

,

3. JUSTIFICACIÓN

En los próximos años, el sector agrícola tendrá que incrementar su producción para cumplir con las necesidades de una población humana en continuo crecimiento, esto tendrá que hacerse sin dañar al ser humano ni al medio ambiente. Una de las principales acciones para lograr tal incremento, será combatir las plagas que afectan los campos agrícolas ya que, de acuerdo a Oerke *et al.*, (1994), se estima que existen aproximadamente 67,000 especies de plagas, que ocasionan alrededor del 40% de pérdidas en cultivos agrícolas a nivel mundial. Si bien, de manera general, las malezas son las causantes de la mayoría de las pérdidas en cultivos de interés humano (34%), las plagas animales representan hasta el 18% de las mismas (Oerke, 2006).

Paradójicamente, a pesar de que el uso de los plaguicidas químicos se ha incrementado durante los últimos 40 años, las pérdidas en los cultivos no han disminuido. Aunado a lo anterior, se han hecho evidentes los diversos problemas que conlleva el uso de este tipo de plaguicidas, por ejemplo: desarrollo en la resistencia de los insectos plaga (Dawkar *et al.*, 2013), toxicidad para el ser humano (Cornell University, 2014), residuos químicos tóxicos de plaguicidas caducados (FAO, 2004), etc.

Debido a lo anterior, es necesario el desarrollo de alternativas viables para el control de plagas, como son los métodos de control biológico, entre los cuales se incluye el uso de hongos entomopatógenos. Sin embargo, para incrementar su uso comercial, tales métodos requieren mejorar en ciertos aspectos como (Lacey *et al.*, 2001):

1. Incrementar su virulencia y velocidad para matar.
2. Un adecuado desarrollo bajo condiciones ambientales adversas.
3. Mayor eficiencia en su producción.
4. Aceptación de parte de los productores y de la sociedad en general.

4. HIPÓTESIS

Los pulsos de una atmósfera enriquecida (26% O₂), administrados durante el crecimiento de los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea* (2 cepas), *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, tendrán un efecto en la infectividad y calidad de los conidios de estos hongos, involucrando una respuesta antioxidante de los mismos.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Estudiar el efecto de una atmósfera rica en oxígeno (26% O₂) en la infectividad y calidad de cuatro cepas de hongos entomopatógenos.

5.2. Particulares

Evaluar y comparar la infectividad y calidad de los conidios de cuatro hongos entomopatógenos producidos bajo dos tipos de atmósferas: Normal (21% O₂) y enriquecida (26% O₂).

Estudiar la concentración de los compuestos trehalosa y manitol en los conidios de cuatro hongos entomopatógenos, como una probable respuesta a la condición propiciada por la atmósfera enriquecida.

Cuantificar la concentración de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) en los conidios de dos cepas de *Isaria fumosorosea*, considerando el probable efecto oxidante de la atmósfera enriquecida en éstas.

Determinar las posibles diferencias en la actividad de dos enzimas antioxidantes, catalasa y superóxido dismutasa, en los conidios de dos cepas de *I. fumosorosea* expuestos a dos concentraciones atmosféricas (21% y 26% O₂).

Encontrar las secuencias, aún parciales, de uno o más genes de enzima catalasa del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismos

Se utilizaron cuatro cepas de tres especies de hongos entomopatógenos (Fig. 6.1.). La cepa *Beauveria bassiana* 882.5, pertenece a la colección del laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos de la UAM Iztapalapa. Esta es una cepa mutante por radiación UV, que se derivó de la cepa silvestre *B. bassiana* 88 (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009). La cepa *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, pertenece a la colección del Colegio de Posgraduados (Montecillo, Texcoco), bajo la responsabilidad de la Dra. Raquel Alatorre. La cepa *Isaria fumosorosea* CNRCB1, pertenece al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (Colima, México). La cepa *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302, pertenece a la colección de cultivos de hongos entomopatógenos del Departamento de Investigación Agrícola (ARSEF) perteneciente del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA), con número de catálogo 3302. Todas las cepas han sido identificadas por métodos de biología molecular y cuentan con número de acceso en la Base de Datos de Secuencias Genéticas (GenBank) del *National Institutes of Health* (NIH) de los Estados Unidos de América (Tabla 6.1.). Para su conservación, cada una de las cepas se creció en medio harina de avena y, transcurridos 10 días, pequeños trozos de agar (≈ 5 mm por lado) se colocaron en viales de vidrio con agua desionizada estéril manteniéndose a una temperatura de 4°C. La propagación de los cuatro hongos se hizo en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio harina de avena (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010), incubándose a una temperatura de 28°C durante 10 días.



Figura 6.1. Hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*, creciendo en medio PDA.

Tabla 6.1. Números de acceso al GenBank de los hongos entomopatógenos estudiados y las publicaciones donde se reportaron.

Hongo entomopatógeno	No. Acceso GenBank	Publicación
<i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	FJ876298	Tlecuitl-Beristain <i>et al.</i> , (2010)
<i>Beauveria bassiana</i> 88	HM189220	Montesinos-Matías <i>et al.</i> , (2011)
<i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1	HM209049	Miranda-Hernández <i>et al.</i> , (2014)
<i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF3302	HM209050	Miranda-Hernández <i>et al.</i> , (2014)

6.2. Medio harina de avena

Este medio se utilizó para la propagación y conservación de los hongos, así como para todos los experimentos realizados. Tal selección se hizo ya que, en este medio, se encontró la mayor producción de conidios en *I. fumosorosea* CNRCB1, *M. anisopliae* CP-OAX y *B. bassiana* 882.5 (Miranda-Hernández, 2010). Esta composición fue publicada por Tlecuitl-Beristain *et al.*, (2010) y es (g L⁻¹): Harina de avena (33.3); Agar bacteriológico (15, BIOXON) y Peptona de carne (10, BIOXON).

6.3. Atmósferas estudiadas

Se investigó la influencia de dos atmósferas en la infectividad y calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos. Una de ellas, fue una atmósfera normal (que en adelante se identificará como AN) con una concentración de oxígeno de 21% O₂; la otra, una atmósfera enriquecida con 26% O₂ (que en adelante se identificará como 26), la cual se aplicó a las unidades experimentales, durante 1 minuto, cada 24 h. En todos los casos, se utilizaron botellas serológicas de 125 mL que contenían 10 mL de medio harina de avena. Estas botellas se inocularon con 1×10^7 conidios (equivalente a 5.6×10^5 con cm^{-2} en la superficie de la botella), que provenían de cultivos en matraces de 250 mL con 50 mL de medio harina de avena (10 días). En el tratamiento AN, las botellas conservaron los tapones de algodón durante todo el periodo de crecimiento, es decir, hasta el tiempo en el que se realizó cada una de las pruebas señaladas. En el caso del tratamiento 26, una vez transcurridas 60 h después de ser inoculadas las botellas, se cambió la atmósfera de las mismas, a una concentración de 26% O₂. Para lo anterior, en cada unidad experimental, se sustituyó el tapón de algodón por un tapón de plástico y se selló el mismo a la boca de la botella con cinta de parafina plástica (PARAFILM) como se muestra en la Fig. 6.2. Una vez hecho esto, se inyectó aire, proveniente de un tanque (PRAXAIR), con la concentración de O₂ indicada, a un flujo de $20 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$, durante un minuto, con ayuda de una aguja de salida (purga). La

inyección de esta atmósfera se realizó cada 24 h, hasta el momento de la evaluación especificada en cada uno de los experimentos.



Figura 6.2. Inyección de una atmósfera enriquecida (26% O₂) a una botella serológica con medio harina de avena en el que crece *M. anisopliae*.

6.4. Bioensayo

Las pruebas de infectividad son de gran importancia en la evaluación de la calidad y efectividad en los hongos entomopatógenos. Esta prueba se realizó para los hongos estudiados con excepción de *M. anisopliae*, ya que los resultados obtenidos con este hongo fueron reportados en la tesis de maestría (Miranda-Hernández, 2010).

Beauveria bassiana. Transcurridas 156 h, se cosecharon, con Tween 80 (0.05% v/v), los conidios de ambos tratamientos atmosféricos (AN y 26). Se estandarizaron suspensiones de conidios a una concentración final de 4.5×10^7 con/mL con ayuda de una cámara de Neubauer (Marienfeld). Se utilizaron larvas del insecto de la harina *Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae), procurando seleccionar aquellas de tamaño homogéneo. Las unidades experimentales fueron cajas Petri de 90 mm con 10 larvas cada una. Para propiciar la infección, se siguió la metodología propuesta por Safavi *et al.*, (2007) con ciertas modificaciones, brevemente: para cada tratamiento, se preparó un volumen de 20 mL de suspensión de conidios, con la concentración ya establecida, contenida en un tubo plástico de 50 mL. Cada grupo de larvas fue sumergido en esta suspensión durante 15 s. Para el tratamiento control, se siguió la misma metodología (20 mL; 15 s), con la diferencia que, en este caso, se sustituyó la suspensión de conidios por Tween 80 (0.05 %). Para cada tratamiento se utilizaron cinco unidades experimentales. A cada unidad experimental se le

agregó alimento para larvas (salvado de trigo y avena estériles en proporción 1:1), esto se hizo al inicio del experimento y cada que así fuese requerido. Las unidades experimentales se colocaron en una cámara húmeda, que consistía en una caja de plástico, en cuyo fondo se colocó papel filtro estéril humedecido con agua destilada estéril, se colocó una tapa con orificios para permitir el libre paso del aire. Durante todo el experimento, la cámara húmeda se mantuvo en incubadora con fotoperiodos luz-oscuridad (12:12) y una temperatura de 28°C. El experimento se realizó durante un periodo de 14 días.

Isaria fumosorosea. Para ambas cepas se siguió la misma metodología descrita en el apartado de *B. bassiana* con las modificaciones que a continuación se describen. Se utilizaron larvas del insecto *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae), conocido como gusano de la cera, considerado plaga para los panales de abeja, y en diversas investigaciones se ha utilizado para evaluar la infectividad de los hongos entomopatógenos (Fang *et al.*, 2009; Jabbour *et al.*, 2011). Para las dos cepas y ambos tratamientos atmosféricos, se estandarizó una concentración final de 2×10^7 con/mL. El tiempo de inmersión de las larvas en las suspensiones de conidios fue de 5 segundos (Fang *et al.*, 2009). Este experimento se realizó en dos ocasiones en diferentes tiempos. Para ambas cepas, el primer experimento se realizó durante 10 días; mientras que el segundo duró 6 días.

En todos los casos, la mortalidad se revisó diariamente. Una vez que se encontraban larvas muertas, estas se separaban de inmediato y se trasladaban a una nueva caja Petri, colocándose en una nueva cámara húmeda. De esta manera se estimuló el crecimiento del hongo en el cadáver (micosis) y se comprobó que la muerte fue ocasionada por el hongo (Fig. 6.3.).



Figura 6.3. Cadáveres de larvas de *Tenebrio molitor* infectados con *B. bassiana* (A) y de *Galleria mellonella* infectada con *I. fumosorosea* (B). En ambos casos se evidencia la micosis, que confirma que la muerte fue a causa del hongo.

Los datos experimentales se ajustaron al modelo reportado por Rodríguez-Gómez *et al.*, (2009):

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S, \text{ por lo que}$$

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

Donde :

Y: Porcentaje de sobrevivencia a un tiempo t

k : tasa específica de muerte (d^{-1})

t_0 : tiempo de retardo para que ocurra la primera muerte (d)

S: Sobrevivientes (%)

6.5. Pruebas de calidad

Estas pruebas se realizaron con el propósito de analizar una posible protección cruzada generada por el tratamiento 26 y que, por consecuencia, propiciaría un incremento en la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos. El criterio para la elección de estas pruebas, fue que estas constituyen los principales factores que influyen en la disminución de la eficacia de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico (Liu *et al.*, 2012).

6.5.1. Termotolerancia

La tolerancia a elevadas temperaturas es un factor importante para los conidios de los hongos entomopatógenos, una vez que éstos, de manera general, han sido clasificados como mesófilos (Cooney y Emerson, 1964). Este factor, está directamente relacionado con la persistencia y desarrollo de los conidios en campo (Magan, 1997). Además de lo anterior, algunos insectos son capaces de elevar su temperatura corporal, como una forma de contrarrestar la infección fúngica (Blanford y Thomas, 2000; Inglis *et al.*, 1997; Ouedragogo *et al.*, 2003). Esta prueba se realizó sólo para las dos cepas de *I. fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF3302), ya que los resultados correspondientes a *B. bassiana* 882.5 y *M. anisopliae* CP-OAX han sido reportados anteriormente (Miranda-Hernández, 2010). Para ambas cepas, esta prueba se realizó con base en la metodología reportada por Rangel *et al.*, (2005), con algunas modificaciones. Transcurridas 156 h, se cosecharon los conidios (5 botellas) de ambos tratamientos atmosféricos (Tween 80, 0.05%). La suspensión obtenida se filtró con gasa estéril y, hecho esto, se estandarizó a una concentración final de 1×10^4 con/mL. Un mL de esta suspensión se agregó a tubos de vidrio (8 mL) con tapa de rosca. Los tubos se colocaron en una gradilla, para después ser colocados en un baño de agua (Fig. 6.4.).



Figura 6.4. Tubos de vidrio con tapa de rosca que contienen 1 mL de suspensión de conidios de *I. fumosorosea* expuestos a un estrés térmico húmedo.

Las temperaturas evaluadas fueron 38°C y 40°C. La viabilidad de los conidios se evaluó considerando las unidades formadoras de colonias (UFC). Los tiempos de exposición a las temperaturas estudiadas fueron: 0 (control), 1, 2, 3, 4, 6 y 8 horas. En cada tiempo, se tomaron dos tubos de manera aleatoria de cada tratamiento, se homogeneizó la suspensión con ayuda de un vórtex y 30 µL (aproximadamente 300 conidios) se colocaron y esparcieron

con ayuda de una varilla de vidrio en cajas Petri (90 mm x 15 mm) con 20 mL medio agar dextrosa Sabouraud (SDA, BIOXON) que contenía desoxicolato de sodio (0.5 g/L, Sigma-Aldrich) que sirvió para compactar las colonias y facilitar el conteo. Las cajas se sellaron con Parafilm y se llevaron a incubación a una temperatura de 28°C, con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12 h. Transcurridas 96 h, se realizó el conteo de UFC. Los porcentajes de viabilidad se calcularon comparando las UFC de cada tratamiento respecto a lo encontrado en el control, es decir:

$$\% \text{ Viabilidad: } \frac{\text{Número UFC tratamiento}}{\text{Número UFC control}} \times 100$$

Los datos experimentales se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial (Miranda-Hernández *et al.*, 2014):

$$S = S_0 e^{-(kt)}$$

Donde:

S: Viabilidad de los conidios a un tiempo t .

S_0 : Viabilidad inicial (%).

k : tasa específica del decaimiento en la viabilidad (h^{-1}).

t : tiempo (h).

Usando este modelo, se puede estimar el tiempo en el que la viabilidad de los conidios ha disminuido a 50% en una temperatura dada, lo que se representa con el parámetro TS_{50} (h). Este experimento se realizó dos veces en diferentes ocasiones con réplicas en cada uno de ellos.

6.5.2. Germinación

La germinación es una de las primeras pruebas que permiten determinar la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos (Jenkins y Grzywacz, 2000; Lopes *et al.*, 2013). Para los cuatro hongos estudiados se siguió la misma metodología, con excepción de los tiempos de evaluación que se especifican abajo. Transcurridas 156 h, se cosecharon los

conidios de ambos tratamientos atmosféricos con Tween 80 (0.05%). Se estandarizaron suspensiones a una concentración de 1×10^8 con mL^{-1} y 30 μL de ésta (aproximadamente 3×10^6 conidios), se adicionaron a cajas Petri que contenían medio SDA (tres por tratamiento). El inóculo se distribuyó uniformemente con ayuda de una varilla de vidrio. Las cajas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 28°C. En cada tiempo de muestreo, se cortó un pedazo de medio y se registró la germinación de los conidios (al menos 100) con ayuda de un microscopio (40 X). Un conidio se consideró germinado, siempre y cuando la longitud del tubo germinativo fuera mayor al diámetro del mismo (Ibrahim *et al.*, 2002). Los tiempos de evaluación fueron: *I. fumosorosea* 4, 6, 8 y 10 h; *B. bassiana* 2, 4, 8 y 10 h y *M. anisopliae* 4, 6, 8, 10 y 12 h. Este experimento se realizó dos veces en diferentes ocasiones con réplicas en cada uno.

6.5.3. Germinación en condiciones de hiperosmolaridad

Los conidios pueden afrontar una condición de hiperosmolaridad tanto en el campo donde es asperjado, como una vez dentro del insecto, donde existe una alta presión osmótica en la hemolinfa (Wang *et al.*, 2008). Para esta prueba, se consideraron los valores de actividad de agua (a_w), reportados por Hallsworth y Magan (1999), para el crecimiento óptimo de *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* (actualmente *Isaria farinosa*) y *B. bassiana*. Dichos valores fueron, para *M. anisopliae* y *P. farinosus*, de un rango de 0.99-0.97; mientras que para *B. bassiana* es de 0.998, el máximo valor estudiado en el reporte citado. Por lo anterior, se evaluó la germinación de los hongos entomopatógenos en valores de a_w que estuviesen en el umbral mínimo de crecimiento óptimo. El medio utilizado para esta prueba fue SDA adicionando cloruro de sodio para disminuir el valor de a_w . Así, para ambas cepas de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* la prueba se realizó con un valor de a_w de 0.975 (0.5 M NaCl) y para *B. bassiana* fue de a_w de 0.990 (0.2 M NaCl). En todos los casos, el valor de a_w se determinó con ayuda de un equipo de medición de agua AQUALAB CX-2. La metodología utilizada para la germinación, fue la misma que se reporta en la sección 6.5.2.

6.5.4. Resistencia a peróxido de hidrógeno

Entre los retos a los que se enfrentan los conidios de los hongos entomopatógenos en su función como agentes de control biológico, se encuentra el estrés oxidante (Yueqing *et al.*, 2011). Una de las respuestas del sistema inmune de los insectos, una vez detectado un antígeno, es la producción de especies reactivas de oxígeno o ERO (Schmid-Hempel, 2005). Uno de los fines de esta prueba fue la de estudiar si, debido a que el tratamiento con la

atmósfera enriquecida puede propiciar la producción de especies reactivas de oxígeno, los microorganismos ya estaban preparados para enfrentar a un agente oxidante diferente al oxígeno y mantener su viabilidad. Para las cuatro cepas se siguió la misma metodología, con excepción de las concentraciones de peróxido de hidrógeno que se especifican al final de este apartado. A las 156 h, se recolectaron conidios de cada tratamiento (AN y 26), con Tween 80 0.05% (5 botellas de cada tratamiento). Se estandarizaron suspensiones a una concentración final de 1×10^6 con mL^{-1} y un mililitro de esta suspensión se puso en un tubo Eppendorf de 2 mL a los cuales se les adicionó el volumen necesario de H_2O_2 para obtener las concentraciones molares indicadas. Para el tratamiento control, se agregó Tween 80 en lugar de H_2O_2 . Los tubos se incubaron a 28°C durante 30 minutos para, posteriormente, hacer una dilución 1:100 con agua desionizada estéril, obteniendo una concentración de 1×10^4 con/mL. Esta dilución tuvo dos propósitos, obtener una concentración adecuada para conseguir la cantidad de conidios necesaria para evaluar su viabilidad y diluir la concentración de H_2O_2 . De esta dilución, se agregaron 30 μL (aproximadamente 300 conidios) a cajas Petri con medio SDA. Estas cajas se incubaron a 28°C durante 72 h y, transcurrido este tiempo, se cuantificaron las UFC tanto del control como de los tratamientos. Las concentraciones de H_2O_2 utilizadas fueron, para ambas cepas de *I. fumosorosea* y *B. bassiana*, de 10, 15, 25 y 50 mM. Mientras que para *M. anisopliae* fueron de 10, 25, 50 y 75 mM. El porcentaje de viabilidad se calculó con la fórmula presentada en la sección 6.5.1. Los datos experimentales, se ajustaron al modelo usado para la prueba de termotolerancia, lo cual permite calcular el parámetro “concentración letal 50” o CL_{50} , esto es, la concentración de H_2O_2 (mM) en la que el 50% de los conidios permanecen viables.

6.6. Cuantificación de trehalosa y manitol

En investigaciones anteriores, se ha enfatizado la participación del disacárido trehalosa y el polialcohol manitol en el desarrollo de resistencia a diversos tipos de estrés en gran variedad de microorganismos (Hottiger *et al.*, 1994; Uyar *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2008a). Para *M. anisopliae* y *B. bassiana*, los conidios se cosecharon a las 132 h. Mientras que, para ambas cepas de *I. fumosorosea*, los conidios se cosecharon transcurridas 156 h. La metodología que se utilizó para este experimento fue la reportada por Hallsworth y Magan (1997) con algunas modificaciones. Una vez cosechados los conidios con agua grado HPLC (Mallinckrodt), estas suspensiones se filtraron con ayuda de gasa estéril y se comprobó que no tuviesen restos de gasa o micelio, visualizándolas con ayuda de una cámara de Neubauer

y microscopio (40X). Se estandarizaron las suspensiones a una concentración final de 4×10^7 con/mL. Un mililitro de estas suspensiones se adicionó a tubos Eppendorf de 2 ml y estos se sonicaron durante 2 min (Cole-Parmer 8892) y expusieron a agua hirviendo por 5.5 min. Hecho esto, las suspensiones se filtraron con un filtro de nylon para jeringa de $0.2 \mu\text{m}$ (NALGENE™) y se inyectaron a un equipo de HPLC (AGILENT 1260) utilizando una columna AMINEX HPX-42A (Bio-Rad™) y un detector de índice de refracción (IR). Para la curva estándar, se utilizó trehalosa y manitol grado HPLC (Sigma-Aldrich™). El tiempo de retención para la trehalosa fue de 15.7 min y para el manitol de 21.5 min (Anexo A). La concentración de ambos compuestos en los conidios, se calculó como microgramos de cada uno de los compuestos por conidio por 10^7 ($\mu\text{g con}^{-1} \cdot 10^7$).

Las pruebas que a continuación se describen, se realizaron exclusivamente para las dos cepas de *I. fumosorosea*. Esto se decidió debido a que, el efecto más significativo del tratamiento 26% O_2 (incremento en la calidad de los conidios), se observó en ambas cepas de *I. fumosorosea* ARSEF3302 y CNRCB1 (Anexo B). Para todas las pruebas que a continuación se describen, los conidios de ambos tratamientos se recolectaron cumplidas 156 h de cultivo.

6.7. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Un planteamiento constante en esta investigación fue si la exposición al tratamiento 26 de los hongos entomopatógenos, propiciaba un incremento en la formación de ERO y de ser así, si esto, a su vez, ocasionaba diferencias con la actividad de enzimas antioxidantes. Para la cuantificación de especies reactivas se utilizaron los reactivos 2',7'-diclorodihidrofluorosceína diacetato (DCFH, Invitrogen™ D-399) y dihidroetidio (DHE, Invitrogen D-1168). Las membranas celulares son permeables a la forma esterificada de DCFH, por lo que este compuesto entra libremente a la célula y, una vez dentro, es desacetilado por esterasas y, por tanto, permanece en el interior de la célula. Cuando este compuesto es oxidado, especialmente por peróxidos (Gómez-Quiroz *et al.*, 2008), se forma un producto verde fluorescente el cual puede ser cuantificado por fluorometría (Anexo C). Es importante establecer que, de acuerdo a lo publicado por Owusu-Ansah *et al.*, (2008), este compuesto, no debería considerarse como una prueba específica del incremento en la producción de ROS, sino como un indicador del grado general de estrés oxidante celular. El DHE es un compuesto usado con frecuencia, debido a su capacidad para permear libremente por la membrana celular. Se caracteriza por reportar la producción del anión

superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Una vez que este compuesto reacciona con $O_2^{\cdot-}$, forma un producto rojo fluorescente (etidio) que se intercala con el ADN (Anexo C). Se considera que el DHE es, quizá, el producto más específico y menos problemático en la detección del $O_2^{\cdot-}$ (Owusu-Ansah *et al.*, 2008). Se recolectaron los conidios de ambos tratamientos atmosféricos (3 botellas por tratamiento) con buffer fosfato salino (PBS, pH: 7.4). Estas suspensiones se filtraron con gasa estéril y se estandarizaron a una concentración final de 6.675×10^6 con/mL. Se utilizaron placas de 96 pozos, en las cuales se agregaron 200 μ L de estas suspensiones más 5 μ M de DCFH (Clavijo-Cornejo *et al.*, 2013) y DHE. En el caso del reactivo DHE, la lectura se realizó inmediatamente después de agregar este reactivo; mientras que para el DCFH, se incubó la reacción en completa oscuridad durante 30 min y, posteriormente, se hizo la lectura. La fluorescencia se midió con el equipo Multimodal Detector DTX-880 (Beckman Coulter™) utilizando un filtro de acridina. La longitud de onda (nm) de excitación fue de 480 (DHFC) y 485 (DHE); mientras que la longitud de onda de emisión fue de 520 (DHFC) y 560 (DHE). En la muestra control, se agregó el volumen correspondiente de buffer PBS en sustitución de la suspensión de conidios. Para ambos tratamientos, la concentración de ERO se reporta considerando la fluorescencia de la muestra control como la unidad (1).

6.8. Cuantificación de actividad superóxido dismutasa (SOD)

Investigaciones recientes han relacionado a la enzima antioxidante SOD con el incremento en la virulencia y tolerancia a estrés en *B. bassiana* (Xie *et al.*, 2010 y 2012). Por lo anterior, se realizó la cuantificación de actividad de esta enzima, como una posible explicación para el incremento en infectividad y resistencia a estrés de ambas cepas de *I. fumosorosea*. Se recolectaron los conidios de ambos tratamientos con Tween 80 (0.05%) y las suspensiones obtenidas se filtraron con gasa estéril. Se agregaron 2 mL de la suspensión filtrada a un tubo Eppendorf (3 repeticiones por tratamiento) y se agregaron perlas de zirconio (Braun). Estos tubos se agitaron en un equipo Mini Bead-Beater-1 (Biospec Products™) durante 2 minutos para, después de ello, centrifugarse a 8,000 g durante 1 min (Eppendorf™ 5402). Hecho esto, se separó el sobrenadante para la determinación de actividad enzimática de acuerdo al protocolo del SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich™, # cat. 19160). Los valores de actividad obtenidos en cada muestra, se ajustaron con la cantidad de proteína presente, la cual fue cuantificada con el método de Bradford (1976), siguiendo las indicaciones del protocolo. Se realizó una curva estándar de actividad SOD con enzima comercial (Sigma-Aldrich™) y, a

partir de ella, determinar la actividad correspondiente a las muestras experimentales (Anexo D). Las unidades de actividad se establecieron de acuerdo a lo señalado en el manual del kit.

6.9. Cuantificación de actividad catalasa

En estudios previos con *M. anisopliae* y *B. bassiana*, se ha relacionado el incremento en la infectividad, germinación y resistencia a estrés, con un aumento en la actividad de la enzima antioxidante catalasa (Morales-Hernández et al., 2010; Ali et al., 2012). Más aún, Wang et al., (2013), han establecido el papel que tiene cada uno de los cinco tipos de enzima catalasa, en la adaptación a diversos tipos de estrés, así como en la infectividad en *B. bassiana*. Una vez recolectados los conidios con Tween 80 (0.05%), las suspensiones se filtraron con gasa estéril (tres réplicas por tratamiento). Dos mililitros de suspensión, se agregaron en tubos eppendorf, los cuales se sonicaron durante 5.5 min utilizando un sonicador Cole-Parmer 8892 (Cole-Parmer™). Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas durante 5 min a 13,000 rpm (13,793 g) (Eppendorf™ 5402). El sobrenadante obtenido, se utilizó para medir la actividad catalasa de acuerdo al método ya reportado (Kawasaki y Aguirre, 2001; Lledías et al., 1998). Para determinar el oxígeno liberado, se utilizó el microelectrodo de Clark (YSI Oxygen Monitor, modelo 53, YSI™). Una unidad catalasa se definió como la cantidad de enzima que libera un nanoátomo de oxígeno atómico por minuto (na O min^{-1}). En cada muestra estudiada, los resultados se ajustaron con la cantidad de proteína, la cual fue cuantificada por el método de Bradford. La actividad se reporta como $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína.

6.10. Genes de enzima catalasa

Después de analizar los resultados de las enzimas antioxidantes en las dos cepas de *I. fumosorosea*, se consideró oportuno estudiar la expresión del gen, o genes correspondientes de la enzima catalasa en los dos tratamientos estudiados. Sin embargo, de acuerdo a la página del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), a la fecha no hay información del genoma de *Isaria fumosorosea* (NCBI Genome, 2014) y, por tanto, no existe información acerca de la secuencia de estos genes. Debido a ello, se propuso una alternativa para este estudio. La opción elegida fue el uso de cinco pares de cebadores (primers) degenerados, reportados en la investigación realizada por Wang et al., (2013) y que se presentan en el Anexo E. De acuerdo a los autores, estos cebadores se diseñaron a partir de regiones conservadas de secuencias alineadas de genes de catalasa ya secuenciados en otros hongos, todo ello utilizando la base de datos del GenBank (NCBI).

Los genes de cinco diferentes tipos de enzima catalasa, son los que se buscaron amplificar, los cuales son: *catA* (específica de espora), *catB* (secretada), *catC* (citoplasma), *catD* (secretada) y *catP* (peroxisomal). Lo anterior, de acuerdo al estudio ya citado.

6.10.1. Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para comprobar si los cebadores utilizados generaban productos de amplificación, además de las dos cepas de *I. fumosorosea*, se incluyó, como control positivo, la cepa de *B. bassiana* 882.5, ya que en el estudio de Wang *et al.*, (2013) dichos cebadores se utilizaron exitosamente para *B. bassiana*. Las tres cepas se cultivaron en matraces de 250 mL que contenía 50 mL de medio harina de avena. Transcurridos 10 días, se recuperó la biomasa y se colocó en morteros estériles, a los cuales se les agregó continuamente nitrógeno líquido, al tiempo que las muestras se molieron con ayuda de un pistilo estéril, hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL y se inició el proceso de extracción, para lo cual se utilizó el Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Se comprobó que la extracción de ADN fuese exitosa por electroforesis. Mediante la técnica de biología molecular, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se estudió la amplificación de genes de enzima catalasa, utilizando los cebadores degenerados ya reseñados. La composición de la solución de reacción se describe en la Tabla 6.2. Las condiciones de PCR utilizadas se describen en la tabla 6.3. Inicialmente, se buscó la amplificación de los 5 genes en el control positivo (*B. bassiana*), para ello, se utilizaron dos temperaturas de hibridación (52 y 55°C). En el caso específico de *catP*, al ser este un gen relacionado en la infectividad y resistencia a estrés (Wang *et al.*, 2013), se probaron tres temperaturas de hibridación (52, 55 y 57°C), buscando la exitosa amplificación de este gen.

Tabla 6.2. Composición de la solución de PCR utilizada en la búsqueda de la amplificación de 5 genes codificantes de enzima catalasa.

Componente	Concentración final óptima	Volumen para 25 µL totales
Agua inyectable	-	15.375
Buffer	1X	2.5
MgCl₂	2.5 mM	2.5
dNTP's	200 µM	0.5
Primer F	1µM	1.25
Primer R	1µM	1.25
ADN	100 ng	1.5
Taq Polimerasa	1.25 U/µL	0.125

Tabla 6.3. Temperatura y tiempo de las etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usados en la búsqueda de amplificación de genes catalasa con primers degenerados.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1. Activación	94	2
2. Desnaturalización	94	0.75
3. Hibridación	52, 55, 57	0.75
4. Extensión	72	1
5. Elongación final	72	3

6.10.2. Secuenciación e identificación de los genes amplificados

Una vez determinados los genes que exitosamente fueron amplificados con la metodología descrita (6.10.1), se continuó con la secuenciación de estos productos de amplificación. Para ello, se purificó el mismo producto de PCR con el que se realizó la electroforesis. Una vez purificado el producto de PCR, se envió para su secuenciación, al Laboratorio Divisional de la UAM-Iztapalapa. Las secuencias obtenidas, se ingresaron al programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI), con el cual se obtuvo la identificación de los genes estudiados.

6.11. Análisis estadístico

La prueba de comparación de medias t Student, se utilizó para el análisis de los datos experimentales obtenidos en las pruebas de: bioensayo, termotolerancia, resistencia a H₂O₂, cuantificación de trehalosa y manitol, cuantificación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y cuantificación de actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), todas ellas se realizaron con un valor de $\alpha = 0.05$. Mientras que la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y, cuando fue conducente, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey se utilizó para el análisis de los datos experimentales encontrados en las pruebas de: germinación, germinación en estrés osmótico y actividad catalasa, todas se realizaron con un valor de $\alpha = 0.05$. El programa estadístico utilizado para lo anterior fue SPSS™ para Windows, versión 13.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Producción de conidios (antecedentes)

Para tener una perspectiva completa del efecto de los tratamientos atmosféricos estudiados, se incluye esta sección que presenta resultados reportados con anterioridad (Miranda-Hernández, 2010). En el caso de *B. bassiana*, la producción de conidios en AN fue de 2.29×10^8 con cm^{-2} y, con el tratamiento 26, fue de 7.91×10^6 con cm^{-2} , lo que evidenció que la atmósfera modificada afectó notablemente la producción (Fig. 7.1.A). Para el hongo *M. anisopliae* se encontró que, transcurridas 204 h, la producción de conidios en el tratamiento AN fue de 7.33×10^7 con cm^{-2} , mientras que en el tratamiento 26 fue de 1.28×10^8 con cm^{-2} , lo que representó un incremento de casi 75% en el tratamiento 26 (Fig. 7.1.B).

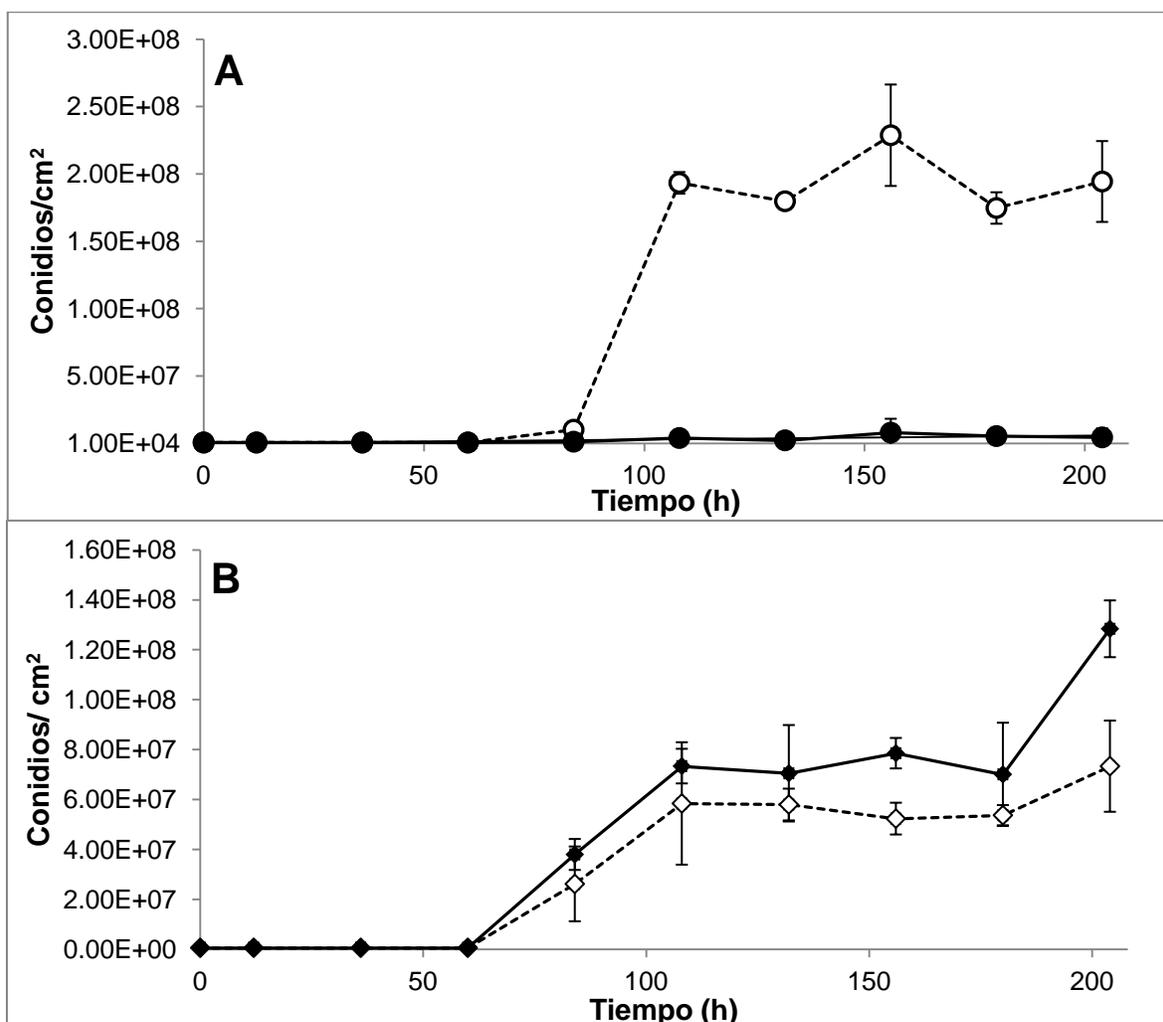


Figura 7.1. Producción de conidios de *B. bassiana* (A) y *M. anisopliae* (B) en atmósfera normal (figuras abiertas) y atmósfera enriquecida (figuras cerradas).

En el caso de la cepa *I. fumosorosea* CNRCB1, las mayores diferencias se encontraron a las 204 h ya que, mientras la producción en AN fue de 8.66×10^8 con cm^{-2} , en el tratamiento 26 fue de 2.53×10^8 con cm^{-2} , la que representa una disminución mayor del 70% (Fig. 7.2.A). Para la cepa *I. fumosorosea* ARSEF 3302, la producción de conidios en AN, a las 180 h, fue de 3.38×10^7 con cm^{-2} ; en tanto que, a ese mismo tiempo, la producción encontrada en el tratamiento 26 fue de 1.69×10^8 con cm^{-2} , lo que significó un incremento de cinco veces (Fig. 7.2.B).

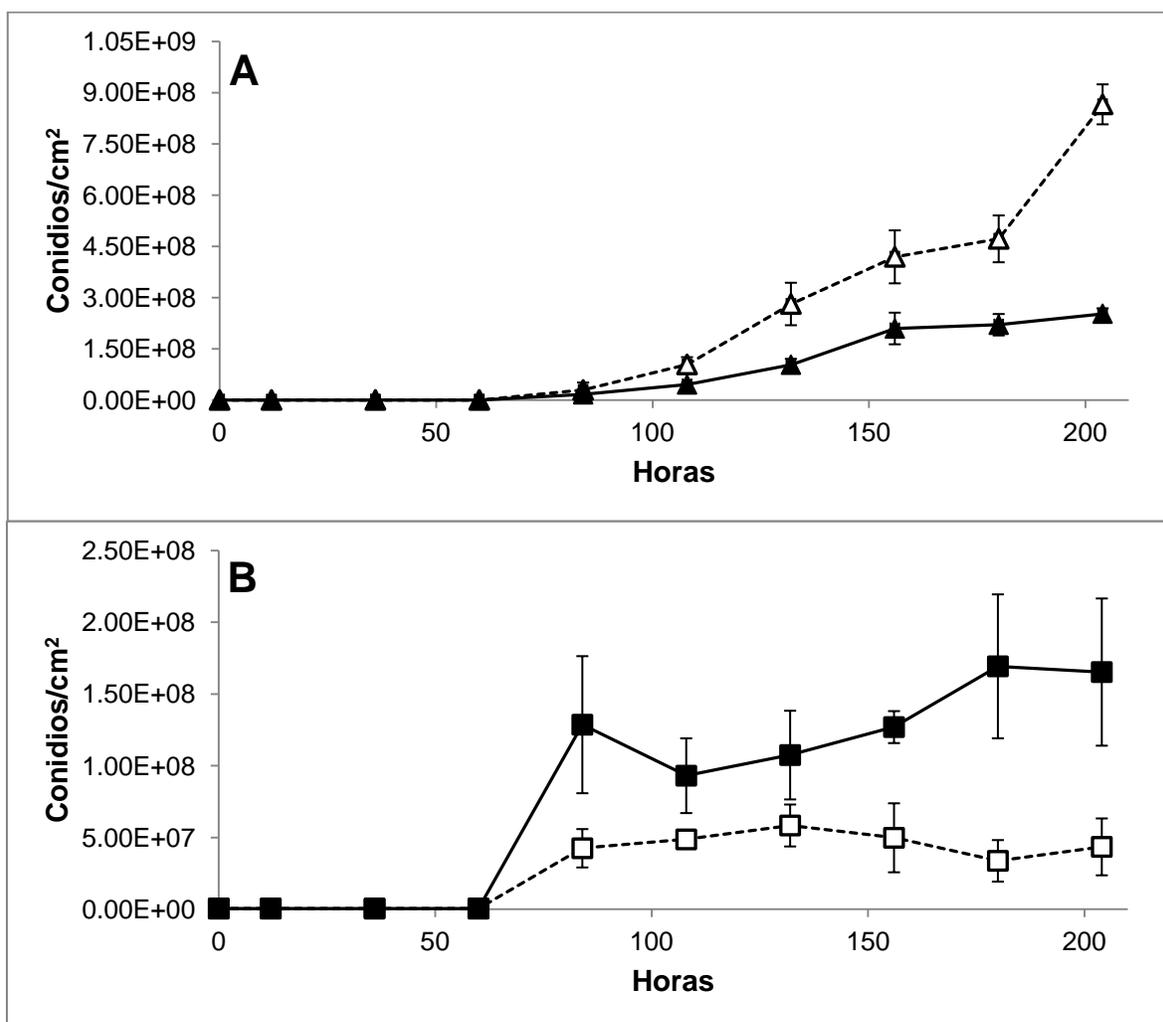


Figura 7.2. Producción de conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 (A) e *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (B) en atmósfera normal (figuras abiertas) y atmósfera enriquecida (figuras cerradas).

7.2. Bioensayo

Para *B. bassiana* 882.5, la gráfica de sobrevivencia de las larvas del insecto *T. molitor* infectadas con este hongo, se presenta en la Fig 7.3. Los conidios provenientes del tratamiento 26, presentaron una disminución en la infectividad comparativamente con los conidios del tratamiento AN. Ello se evidenció principalmente por la diferencia en el porcentaje de sobrevivencia final (S), ya que, mientras para AN fue sólo de 4%, para 26 fue de 22% (Tabla 7.1.). Es interesante indicar que en otros parámetros, como tiempo de la primera muerte (t_0) y tiempo letal 50 (TL_{50}), no se presentaron diferencias entre los tratamientos ($P > 0.05$). De igual forma, Garza-López (2012) evidenció un efecto negativo de las atmósferas diferentes a la normal (21% O_2) en la infectividad de *B. bassiana*. En esa investigación, tanto una atmósfera con 16% O_2 como una de 26% O_2 , presentaron 0% de mortalidad en larvas de *T. molitor* (13 días). Tal efecto también se observó en adultos donde, salvo la atmósfera con 26% O_2 , las atmósferas diferentes a la normal tuvieron valores de S mayores a 50% (9 días).

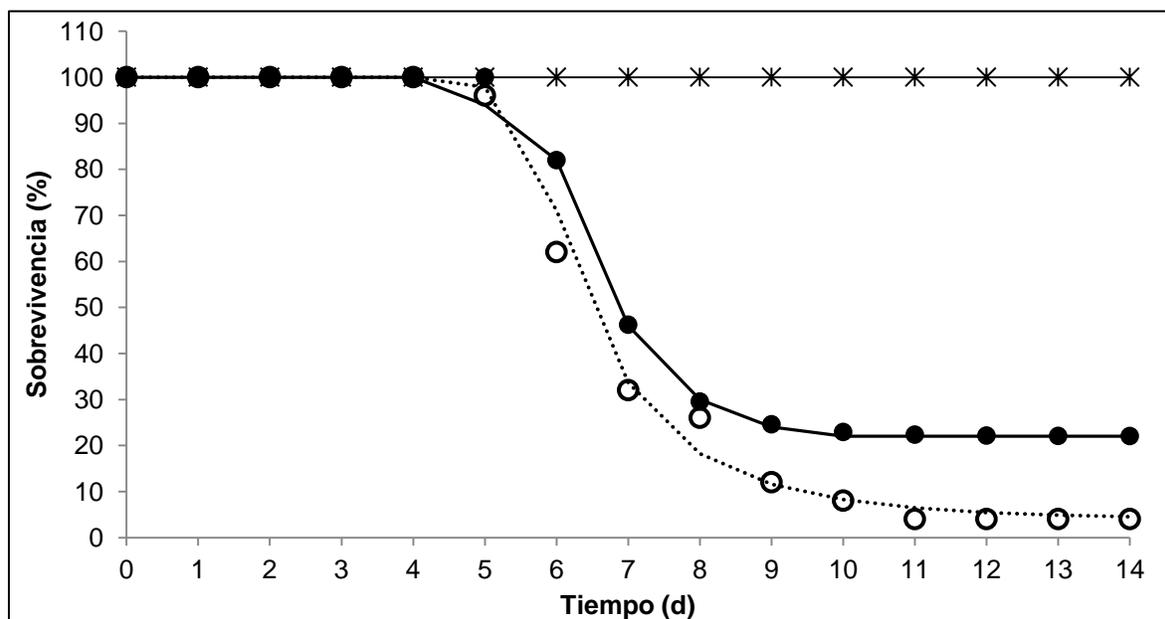


Figura 7.3. Perfiles de sobrevivencia de larvas de *Tenebrio molitor* al ser infectadas con *B. bassiana* 882.5. Se muestran los datos experimentales obtenidos en los tratamientos AN (círculo abierto), 26 (círculo cerrado) y control (cruz). Las líneas representan la tendencia del modelo propuesto, determinadas a partir de los datos experimentales de cada tratamiento, esto es, AN (línea punteada) y 26 (línea continua).

Tabla 7.1. Parámetros de infectividad hacia larvas de *T. molitor*, de los conidios de *B. bassiana* (tratamientos AN y 26). Las letras diferentes en cada columna, indican diferencias entre los tratamientos estudiados (t Student P < 0.05).

Tratamiento	t ₀ (d)	TL ₅₀ (d)	S (%)
AN	5.3 ± 0.48 a	6.3 ± 0.53 a	4 ± 5.5 a
26	5.7 ± 0.44 a	6.6 ± 0.36 a	22 ± 4.5 b

Respecto a las dos cepas de *I. fumosorosea*, considerando el parámetro de sobrevivencia final (S), los resultados fueron los siguientes: para CNRCB1, se obtuvieron valores promedio de 35% y 12.5% con AN (primer y segundo experimento, respectivamente); mientras que, en ambos experimentos, los conidios con tratamiento 26 propiciaron una sobrevivencia final de 0% (Tabla 7.2.). En el caso de ARSEF 3302, los valores de S fueron de 80% y 32.5% (primer y segundo experimento, respectivamente) para el tratamiento AN; y para los conidios con tratamiento 26, los valores observados fueron de 55% y 15%. En este experimento se evidenciaron dos fenómenos principalmente: el incremento de la infectividad de los conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea* con el tratamiento 26; así como la menor infectividad de la cepa ARSEF3302 respecto a la cepa CNRCB1. Ambos fenómenos pudieron ser comprobados en los dos experimentos realizados.

Es interesante reflexionar acerca de las evidentes diferencias en los valores encontrados de los dos bioensayos realizados. En el primer experimento, tuvieron que transcurrir diez días para alcanzar una mortalidad de 100% de las larvas de *G. mellonella* (cepa CNRCB1, tratamiento 26). En el segundo, bastaron 6 días para lograr la muerte de todas las larvas al menos en una de las cepas (CNRCB1, tratamiento 26). Estas diferencias pudieron deberse a diferentes factores, por ejemplo, el estado de las larvas o el de los conidios. Acerca de este último punto, reportes publicados hace 50 años, como el de Schaerffenberg (1964), sustentaban la relación entre las constantes resiembras y la disminución en la infectividad de los hongos entomopatógenos; en años posteriores, continuaron apareciendo estudios que confirmaban este fenómeno (Morrow *et al.*, 1989). Sin embargo, existen investigaciones que afirman lo contrario; esto es, que los constantes cultivos *in vitro*, no afectan la infectividad de los hongos entomopatógenos (Ignoffo *et al.*, 1982; Brownbridge *et al.*, 2001). Debido a ello, no se podría establecer con seguridad, que el pase continuo del cultivo *in vitro*, sea un factor que afecte esta característica tan importante para el uso de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico. A pesar de lo anterior, es prudente considerar este fenómeno como una opción que explique las diferencias en los valores de los dos

bioensayos realizados. De cualquier forma, aunque los valores de los parámetros en los dos experimentos fueron diferentes, en ambos fue posible corroborar el efecto del tratamiento 26 para incrementar la infectividad; siendo este, el primer trabajo que evidencia lo anterior para *I. fumosorosea*.

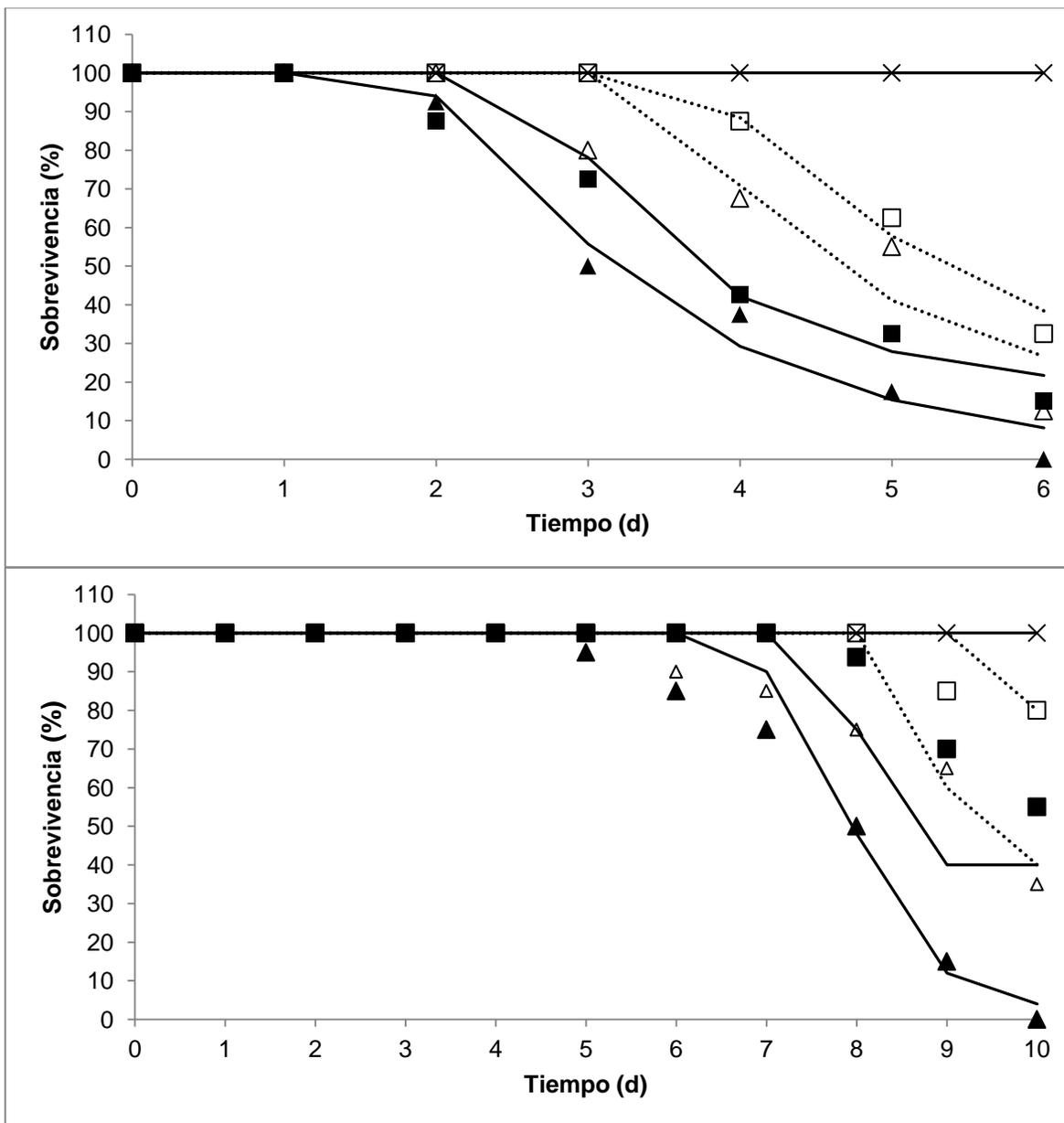


Figura 7.4. Sobrevivencia (%) de larvas de *G. mellonella* después de ser infectadas con conidios de dos cepas de *I. fumosorosea*: ARSEF 3302 (cuadros) y CNRCB1 (triángulos); los conidios provenían de una atmósfera normal (AN, símbolos abiertos) o enriquecida (26, símbolos cerrados). Las líneas representan el ajuste de los datos experimentales, de cada tratamiento, al modelo propuesto (punteada-AN; continua-26). Las cruces representan el tratamiento control. Gráfica superior: primer experimento; gráfica inferior: segundo experimento.

Tabla 7.2. Parámetros de infectividad de dos cepas de *I. fumosorosea*, en larvas de *G. mellonella*. Se presentan los resultados de dos experimentos hechos en diferentes tiempos. El primer experimento (1), tuvo una duración de 10 días; mientras que el segundo (2), duró 6 días. Los asteriscos indican que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (AN, 26) evaluando individualmente cada una de las cepas, en cada uno de los experimentos (t Student, P < 0.05). N.D.: No determinado.

Cepa	Tratamiento	t ₀ (d)	TL ₅₀ (d)	S (%)
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	AN (1)	8.2 ± 1.1	8.8 ± 0.4 *	35 ± 10 *
	26 (1)	7.1 ± 0.8	7.7 ± 0.3	0 ± 0
	AN (2)	3.4 ± 0.2 *	4.6 ± 0.3 *	12.5 ± 5 *
	26 (2)	2 ± 0.4	3.1 ± 0.3	0 ± 0
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302	AN (1)	9 ± 0	N.D.	80 ± 0 *
	26 (1)	8.6 ± 0.4	N.D.	55 ± 10
	AN (2)	4 ± 0.6 *	5.1 ± 0.1 *	32.5 ± 5 *
	26 (2)	2.8 ± 0.4	3.8 ± 0.8	15 ± 5.7

El incremento en la capacidad infectiva de los hongos entomopatógenos puede considerarse un fenómeno multicausal, es decir, no está restringido a sólo un tipo estímulo o condición. Por ejemplo, el medio de cultivo es un factor a considerar en este aspecto ya que, de acuerdo a Maldonado-Blanco *et al.*, (2014), los conidios sumergidos de *M. anisopliae* producidos en medio con casaminoácidos (caseína hidrolizada y aminoácidos) incrementaron su virulencia hacia larvas del mosquito *Aedes aegypti*, aunque no se encontró el mismo efecto en los conidios de *B. bassiana*. Otra investigación donde también se evidencia esto, es la realizada por Ortiz-Urquiza *et al.*, (2013), en la cual se evalúan cuatro medios de cultivo para *M. anisopliae* encontrándose que, al crecer este hongo en algunos de ellos, se incrementa su infectividad y virulencia hacia larvas de *G. mellonella* y adultos de *Ceratitis capitata*. Otra condición en la que se ha demostrado un incremento en la infectividad, es la exposición del hongo a diferentes tipos de estrés. Prueba de ello es el reporte publicado por Rangel *et al.*, (2008b), ya que, en esta investigación, se sometió a una cepa de *M. anisopliae* a condiciones de estrés osmótico, nutritivo o por radiación UV-A, y en todos los casos la infectividad hacia larvas de *T. molitor* se incrementó.

En el caso de esta investigación, el tratamiento 26 tuvo diferentes efectos en la infectividad de los hongos entomopatógenos estudiados: no se observaron cambios en *M. anisopliae* (Miranda-Hernández, 2010); disminuyó en *B. bassiana* y, finalmente, se incrementó en ambas cepas de *I. fumosorosea*. A partir de lo anterior, se procedió a determinar un factor que explicara el porqué una atmósfera enriquecida incrementaba la infectividad en las dos cepas de *I. fumosorosea*. Debido a la naturaleza del tratamiento 26, una atmósfera rica en

oxígeno, se postuló que este fenómeno podría deberse, en alguna medida, al incremento en la actividad de enzimas antioxidantes, en particular las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD). Además, reportes recientes evidenciaban el importante papel de las enzimas antioxidantes a este respecto. Por ejemplo, Morales-Hernández *et al.*, (2010), relaciona el incremento en la capacidad infectiva de una cepa de *M. anisopliae*, hacia larvas del insecto *Plutella xylostella*, con la sobreexpresión, por ingeniería genética, de un tipo de enzima catalasa (*cat1*); lo anterior se evidenció ya que, la concentración letal 50 (CL₅₀) de los conidios que tenían sobreexpresado este gen, fue 14 veces menor respecto a la cepa silvestre. También, de acuerdo a estos autores, la cepa modificada redujo en 22%, en el tiempo en el que se alcanzó el 50% de la mortalidad de las larvas. Un fenómeno similar, en este caso con *B. bassiana*, fue reportado por Ali *et al.*, (2012). En esa investigación, los autores inducen una mayor producción de enzima catalasa a partir del uso de diferentes medios de cultivo. De acuerdo al reporte, el medio que propició una mayor producción de catalasa, al que le fue adicionado n-octacosano, también fue el que presentó un menor valor en el parámetro de tiempo letal 50 (TL₅₀, tiempo en el que muere el 50% de los insectos). De la misma manera, la enzima SOD ha sido objeto de estudio respecto al incremento de la infectividad en hongos entomopatógenos (Xie *et al.*, 2010, 2012). Por lo anterior, una hipótesis para explicar este fenómeno fue estudiar las enzimas antioxidantes catalasa y SOD (secciones 7.5. y 7.6.).

7.2. Pruebas de calidad

7.2.1. Termotolerancia

De manera general, los hongos entomopatógenos han sido clasificados como mesófilos (Roberts y Campbell, 1977), es decir, su rango óptimo de germinación, crecimiento y esporulación es de 20-30°C. Debido a ello, la temperatura es uno de los factores que condicionan su éxito como agentes de control biológico una vez asperjados en campos de cultivo. Por ello, se decidió evaluar el efecto del tratamiento 26 respecto al tratamiento control (AN), en la resistencia a altas temperaturas. El parámetro utilizado en este experimento fue el tiempo de sobrevivencia 50 o TS₅₀, que se define como el tiempo (h) en el que el 50% de los conidios permanece viable a una temperatura dada. En resultados reportados en la etapa anterior a esta investigación (Miranda-Hernández, 2010), se encontraron perfiles contrastantes respecto a *M. anisopliae* y *B. bassiana* ya que, mientras los conidios de *M. anisopliae* expuestos al tratamiento 26 incrementaron el valor de TS₅₀

tanto a 40°C (casi 10 h) como a 45°C (0.1 h); los conidios del tratamiento 26 de *B. bassiana* disminuyeron el valor de TS_{50} , casi 4 veces a 40°C y a 45°C la disminución fue a la mitad.

En el caso de ambas cepas de *I. fumosorosea*, en la etapa anterior de esta investigación (Miranda-Hernández, 2010), se observó que la temperatura de 45°C resultó ser demasiado alta para estos hongos, ya que la viabilidad de los conidios provenientes de ambos tratamientos (AN y 26) fue cero desde el primer tiempo de muestreo. Por ello, se decidió hacer este experimento con temperaturas de 38 y 40°C, el cual se realizó en dos ocasiones en tiempos distintos. En el primer experimento realizado con la cepa CNRCB1, a una temperatura de 38°C, los conidios del tratamiento 26 presentaron un valor de TS_{50} de 2 h, mientras que el correspondiente a los conidios del tratamiento AN fue de 1.1 h, lo que representa un incremento de casi el doble en favor de los conidios del tratamiento 26 (Tabla 7.3.). En el segundo experimento, también a 38°C, se observó una diferencia aún mayor ya que, mientras el valor de TS_{50} de los conidios del tratamiento 26 fue de 2.04 h; para los conidios del tratamiento AN fue de sólo 0.42 h, esto es, una diferencia de casi cinco veces mayor en los conidios provenientes de la atmósfera modificada. Para esta misma cepa (CNRCB1) se observó un fenómeno similar a una temperatura de 40°C (Tabla 7.4.). Los valores de TS_{50} , en el primer experimento, fueron 1.6 y 0.5 h, para los conidios de los tratamientos 26 y AN, respectivamente; lo que significa un incremento de más de tres veces de los conidios del tratamiento 26. En el segundo experimento, aunque se observó una disminución en la resistencia a esta temperatura respecto al primero, los conidios del tratamiento 26 fueron viables al menos en el primer tiempo de muestreo.

En el caso de la cepa ARSEF 3302, a una temperatura de 38°C en los dos experimentos realizados, se observó que los conidios del tratamiento 26 presentaron consistentemente valores superiores en el parámetro TS_{50} respecto a los conidios del tratamiento AN (50% en el primer experimento y más de 7 veces en el segundo). A 40°C, los conidios del tratamiento 26, también resultaron más resistentes ya que, en ambos experimentos, estos conidios fueron viables al menos en el primer tiempo de muestreo (TS_{50} : 0.7 y 0.49 h), mientras que aquellos provenientes del tratamiento AN no fueron viables desde el primer tiempo de muestreo (Tabla 7.3. y 7.4.). Las gráficas del primer experimento realizado, se muestran en el Anexo F.

Tabla 7.3. Resultados de dos experimentos de termotolerancia (38°C) para dos cepas de *I. fumosorosea*. Se muestra el parámetro TS₅₀, que es el tiempo en el que el 50% de los conidios han perdido su viabilidad. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (t Student P < 0.05) entre los tratamientos en cada cepa y en cada experimento (1, 2).

Cepa	Tratamiento	TS ₅₀ (h)
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	AN (1)	1.1 ± 0.19 a
	26 (1)	2 ± 0.32 b
	AN (2)	0.42 ± 0.16 a
	26 (2)	2.04 ± 0.27 b
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302	AN (1)	1.6 ± 0.21 a
	26 (1)	2.4 ± 0.46 b
	AN (2)	0.24 ± 0.17 a
	26 (2)	1.73 ± 0.32 b

Los números (1) y (2), refieren a los dos experimentos realizados en diferentes tiempos.

Tabla 7.4. Resultados de dos experimentos de termotolerancia (40°C) para dos cepas de *I. fumosorosea*. Se muestra el parámetro TS₅₀, que es el tiempo en el que el 50% de los conidios han perdido su viabilidad. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (t Student P < 0.05) entre los tratamientos en cada cepa y en cada experimento (1, 2).

Cepa	Tratamiento	TS ₅₀ (h)
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	AN (1)	0.5 ± 0.18 a
	26 (1)	1.6 ± 0.13 b
	AN (2)	N.D.
	26 (2)	0.31 ± 0.15
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302	AN (1)	N.D.
	26 (1)	0.7 ± 0.02
	AN (2)	N.D.
	26 (2)	0.49 ± 0.16

Los números (1) y (2), refieren a los dos experimentos realizados en diferentes tiempos.

Diversos estudios se han abocado a investigar los factores y condiciones que pueden estar implicados en el incremento de la tolerancia a altas temperaturas en los hongos entomopatógenos. A este respecto, el medio de cultivo ha sido un factor de estudio. Por ejemplo, Kim *et al.*, (2011), comprobaron que los conidios de dos cepas de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae*, incrementaron su resistencia a temperaturas de entre 43 y 47°C, cuando se hacía crecer estos hongos en granos de mijo (*Panicum miliaceum*).

Por otra parte están los estudios que se enfocan en las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Proteins), como el realizado por Liao *et al.*, (2014). En éste, analizan el efecto de la sobreexpresión del gen *hsp25* en una cepa de *M. robertsii*, encontrando que esta modificación propicia un incremento en la tolerancia de los conidios de este hongo a una temperatura de 35°C, además, resulta interesante que los conidios que sobreexpresaban este gen, después de ser expuestos a un choque térmico, adquirirían mayor resistencia a otro

tipo de estrés: el osmótico. Por lo anterior, resulta oportuno introducir el fenómeno conocido como protección cruzada. En estudios realizados en levaduras, se encontró que la exposición de un organismo a un estrés subletal, incrementa su capacidad de resistencia no sólo al tipo de estrés al que se expuso, sino a otros de diferente naturaleza (Hohmann y Mager, 2003), a dicho fenómeno se le ha llamado “protección cruzada” (*cross protection*).

Rangel (2011), realizó una amplia revisión de los diversos estudios que han comprobado la protección cruzada, a partir de la exposición a un leve estrés, en organismos tanto procariotas como eucariotas. De acuerdo a este reporte, diversos tipos de estrés propician un incremento en la capacidad de resistencia a elevadas temperaturas en células eucariotas, por ejemplo: estrés nutritivo (Steels *et al.*, 1994), estrés osmótico (Lewis *et al.*, 1995; Rangel *et al.*, 2008a), estrés oxidante (Kapoor y Sveenivasan, 1988; Rangel, 2008a), así como choque térmico (Mitchel y Morrison, 1982; Trollmo *et al.*, 1988; Rangel, 2008a). Dentro de las probables explicaciones para el fenómeno de protección cruzada, se han propuesto a las ya mencionadas HSP (Morimoto, 1993; Mager y de Kruijff, 1995); así como compuestos como la trehalosa (Hottiger *et al.*, 1987 y 1994; De Virgilio *et al.*, 1994). La acumulación de este último compuesto, se ha relacionado con un incremento en la termotolerancia (Eleutherio *et al.*, 1993; Mensonides *et al.*, 2005). También polioles, como el manitol, han sido relacionados con una mayor resistencia a altas temperaturas; Noventa-Jordao *et al.*, (1999), comprobó que en *Aspergillus nidulans*, el manitol se acumulaba varias veces más cuando se exponía a este hongo a un choque térmico subletal y esto, era un indicativo de recuperación celular después del choque térmico.

En esta investigación, el tratamiento 26, propició una mayor termotolerancia en *M. anisopliae* (Miranda-Hernández, 2010), así como en las dos cepas de *I. fumosorosea*. Por lo anterior, se puede establecer que la atmósfera enriquecida propicia una *protección cruzada* en estos hongos entomopatógenos, incrementando su calidad hacia un factor tan determinante como es la temperatura. Debido a lo anterior, se propuso determinar la concentración de trehalosa y manitol en los conidios expuestos a ambos tratamientos en las cepas de los cuatro hongos estudiados (Sección 7.3.).

7.2.2. Germinación de conidios en dos condiciones: normal (G) y en hiperosmolaridad (GEO)

La evaluación de la germinación de los conidios de los hongos entomopatógenos es relevante, no sólo como una medida de viabilidad (Lopes *et al.*, 2013), y por tanto de calidad, sino que también lo es en el proceso infectivo, al ser una de las etapas del mismo (Sección 1.3). Además, es importante establecer que, entre los principales factores que inciden en el proceso germinativo de los conidios, está la disponibilidad de agua (Hallsworth y Magan, 1999). A continuación, se presentan los resultados de las pruebas de germinación en medio SDA (G) y germinación en medio SDA con cloruro de sodio (GEO) para los cuatro hongos entomopatógenos estudiados.

Respecto a los resultados de G, para *M. anisopliae*, el único tiempo en el que se encontraron diferencias entre los tratamientos fue a las 8 h; en este punto, la germinación de los conidios del tratamiento AN fue de 35%, mientras que los del tratamiento 26 tuvieron una germinación de 45.5% (Fig. 7.5.). En el resto de los tiempos evaluados, los porcentajes de germinación de los conidios, fueron iguales entre los tratamientos (ANOVA $P > 0.05$). En el segundo experimento realizado, aunque fue evidente la disminución en la tasa de germinación de los conidios en ambos tratamientos, no se encontraron diferencias entre las atmosferas estudiadas en ninguno de los tiempos evaluados (Anexo G). Continuando con los resultados de *M. anisopliae*, ahora respecto a la prueba de GEO, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación en ninguno de los tiempos evaluados (ANOVA $P > 0.05$). El efecto de la sal en el medio de cultivo fue muy evidente ya que, sólo hasta las 8 h se comenzaron a observar conidios germinados (1.9% para AN y 1.3% para 26); en el último tiempo evaluado (12 h), apenas se tenía un porcentaje de germinación de 28.7 y 38.5 para los tratamientos AN y 26, respectivamente (Fig. 7.5.). En el segundo experimento realizado, se encontró la misma tendencia, esto es, no hubo diferencias respecto a la germinación de los conidios de AN y 26, observándose el inicio de la germinación hasta las 10 h (Anexo G).

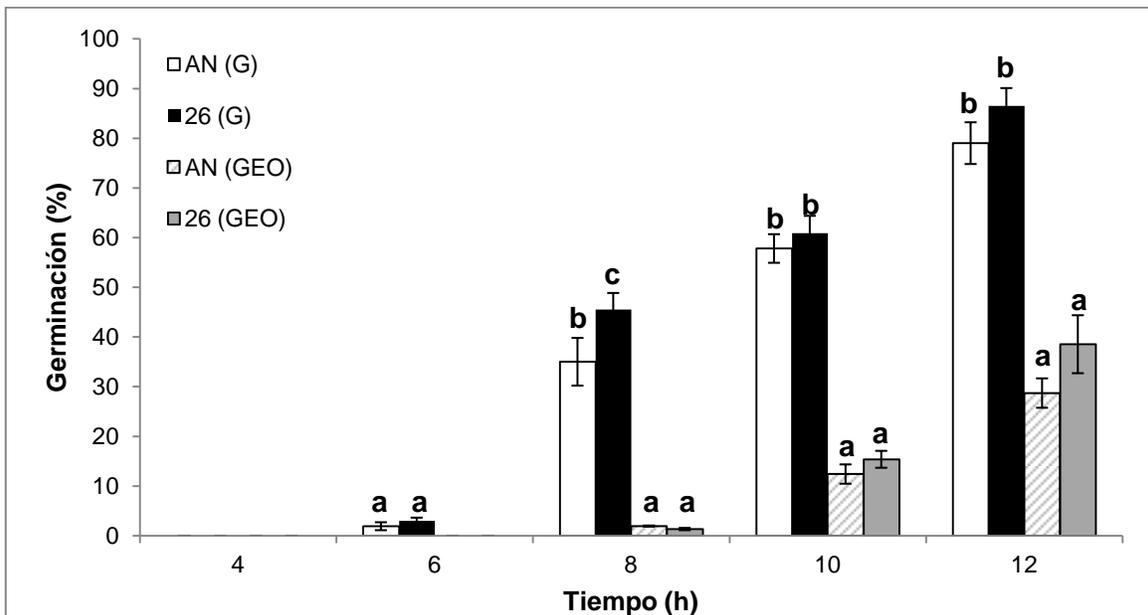


Figura 7.5. Porcentaje de germinación en medio SDA (G) y germinación en condiciones de hiperosmolaridad (GEO; NaCl 0.5M) de los conidios de *M. anisopliae* CP-OAX. Letras distintas indican diferencia en este parámetro, en cada tiempo evaluado (ANOVA $P < 0.05$).

En la prueba de G para la cepa *B. bassiana*, en todos los tiempos evaluados, se encontró que el porcentaje de germinación de los conidios provenientes del tratamiento 26, fue estadísticamente mayor respecto al del tratamiento AN (ANOVA $P < 0.05$). A las 8 y 10 h, se presentaron las diferencias más grandes entre los tratamientos ya que, mientras los conidios del tratamiento 26 presentaron una germinación de 53% y 92.6% respectivamente, los del tratamiento AN tuvieron una germinación de 5% y 16.8% (Fig. 7.6.). Por lo que respecta a la prueba GEO, también con *B. bassiana*, a partir de las 4 h los conidios del tratamiento 26 tuvieron un porcentaje de germinación significativamente mayor respecto a los conidios del tratamiento AN (ANOVA $P < 0.05$). Las diferencias más grandes entre los tratamientos se observaron a las 8 y 10 h ya que, mientras la germinación de los conidios de AN fue de 1.6% y 15.7% respectivamente; para los conidios del tratamiento 26 fue de 52% y 89.5%, en los mismo tiempos (Fig. 7.6.). El incremento propiciado por el tratamiento 26, a las 10 h, fue de más de 70 puntos porcentuales respecto a lo observado con AN. En este caso, no se observó un efecto evidente de la sal en la germinación de los conidios de este hongo ya que, con excepción de 2 y 4 h, el porcentaje de conidios germinados fue similar en G y GEO para cada tratamiento. Una perspectiva para futuros trabajos, sería evaluar la germinación de los conidios de *B. bassiana* expuestos a ambos tratamientos, con valores de actividad de agua

menores al estudiado en esta investigación que fue de $a_w = 0.990$. Estas diferencias, tanto en G como en GEO, se repitieron en el segundo experimento realizado (Anexo G).

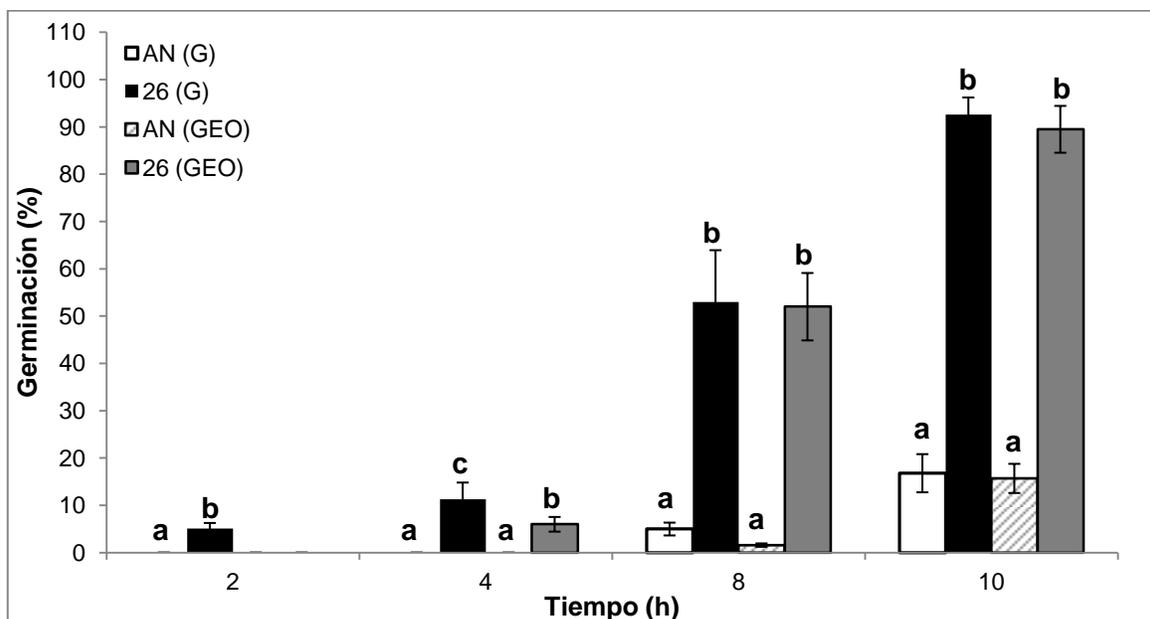


Figura 7.6. Porcentaje de germinación en medio SDA (G) y germinación en condiciones de hiperosmolaridad (GEO; NaCl 0.2M) de los conidios de *B. bassiana*. Letras distintas indican diferencia en este parámetro, en cada tiempo evaluado (ANOVA $P < 0.05$).

Para la cepa *I. fumosorosea* CNRCB1, en la prueba de G, a partir de las 6 h ya se observaron conidios germinados del tratamiento 26 (19.3%), mientras que los correspondientes a AN aún no germinaban (Fig. 7.7.). Las mayores diferencias entre los tratamientos se presentaron a las 8 y 10 h ya que, mientras la germinación de los conidios de AN fue de 16.5% y 51.3%, respectivamente; los correspondientes a 26, en estos mismos tiempos, tuvieron una germinación de 88.9% y 99.23%. En el segundo experimento, se observó un patrón similar al primero, los conidios del tratamiento 26 también presentaron un mayor porcentaje de germinación que los de AN desde las 6 h, encontrándose las mayores diferencias, nuevamente, a las 8 y 10 h (Anexo G).

Continuando con los resultados de la cepa *I. fumosorosea* CNRCB1, ahora respecto a la prueba GEO, se observó claramente el efecto de la concentración de la sal (NaCl 0.5M) en el retardo en la germinación de los conidios ya que, no fue sino hasta las 8 h, en el caso del tratamiento 26, cuando se empezaron a observar conidios germinados; mientras que en el caso del tratamiento AN no fue sino hasta las 10 h (Fig. 7.7.). De cualquier forma, la tasa de germinación de los conidios del tratamiento 26, a las 8 y 10 h, resultó significativamente

mayor que los correspondientes al tratamiento AN (ANOVA $P < 0.05$). Mientras el porcentaje de conidios germinados del tratamiento AN a las 8 h era 0, la germinación de los conidios del tratamiento 26 ya era de 64%. Transcurridas 10 h del experimento, la diferencia entre los tratamientos se mantuvo; en este tiempo, la germinación de los conidios del tratamiento AN era de 12.8%; mientras que los conidios del tratamiento 26, presentaban una germinación de 86.47%. En el segundo experimento, se observó un patrón similar, ya que no fue sino hasta las 8 h cuando se observaron conidios germinados (tratamiento 26); transcurridas 10 h, la germinación de los conidios del tratamiento 26 fue de 82%, mientras que los provenientes de AN tuvieron una germinación de 5.67% (Anexo G).

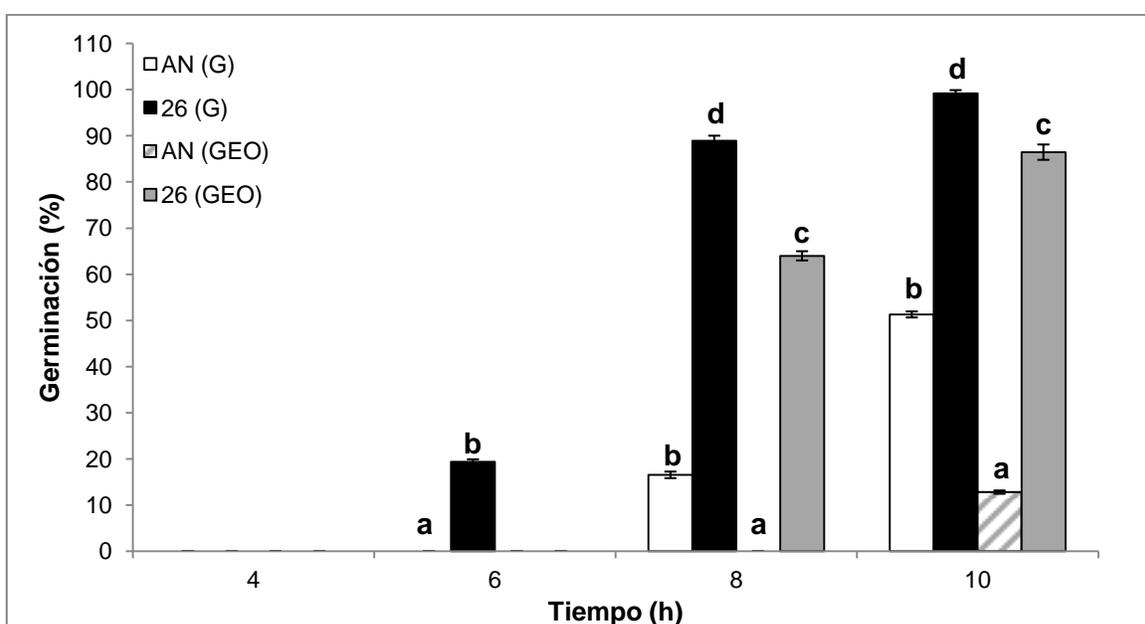


Figura 7.7. Porcentaje de germinación en medio SDA (G) y germinación en condiciones de hiperosmolaridad (GEO; NaCl 0.5M) de los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1. Letras distintas indican diferencia en este parámetro, en cada tiempo evaluado (ANOVA $P < 0.05$).

Finalmente, en la prueba de G para la cepa *I. fumosorosea* ARSEF3302, se encontró un fenómeno similar al de la cepa CNRCB1. A las 6, 8 y 10 h el porcentaje de germinación de los conidios del tratamiento 26 fue significativamente mayor al de los conidios del tratamiento AN (ANOVA $P < 0.05$). Los tiempos en los cuales se observaron mayores diferencias entre los tratamientos, fue a las 8 y 10 h (Fig. 7.8.) ya que, mientras la germinación de los conidios del tratamiento AN fue de 17% y 75.5% respectivamente, la de de los conidios del tratamiento 26 fue de 81.3% y 97.9%. En el segundo experimento se observó una evidente disminución en los porcentajes de germinación en ambos tratamientos respecto al primer

experimento; sin embargo, los perfiles resultaron similares ya que tanto a las 8 h como a las 10 h, los conidios del tratamiento 26 tuvieron mayor porcentaje de germinación que los de AN (Anexo G).

Respecto a los resultados de la cepa *I. fumosorosea* ARSEF3302 en la prueba de GEO, también se observó un efecto positivo del tratamiento 26 en la tasa de germinación de los conidios. Mientras que los expuestos a AN, iniciaron su germinación hasta las 10 h (21.33%); los conidios provenientes de la atmósfera 26 presentaron valores de germinación, a las 8 y 10 h, de 55.37% y 89.5%, respectivamente (Fig. 7.8.). En el segundo experimento, en ninguno de los tiempos estudiados se observó germinación de los conidios de AN, mientras aquellos del tratamiento 26 tuvieron valores de germinación de 11.67% y 59.67% a las 8 y 10 h, respectivamente (Anexo G).

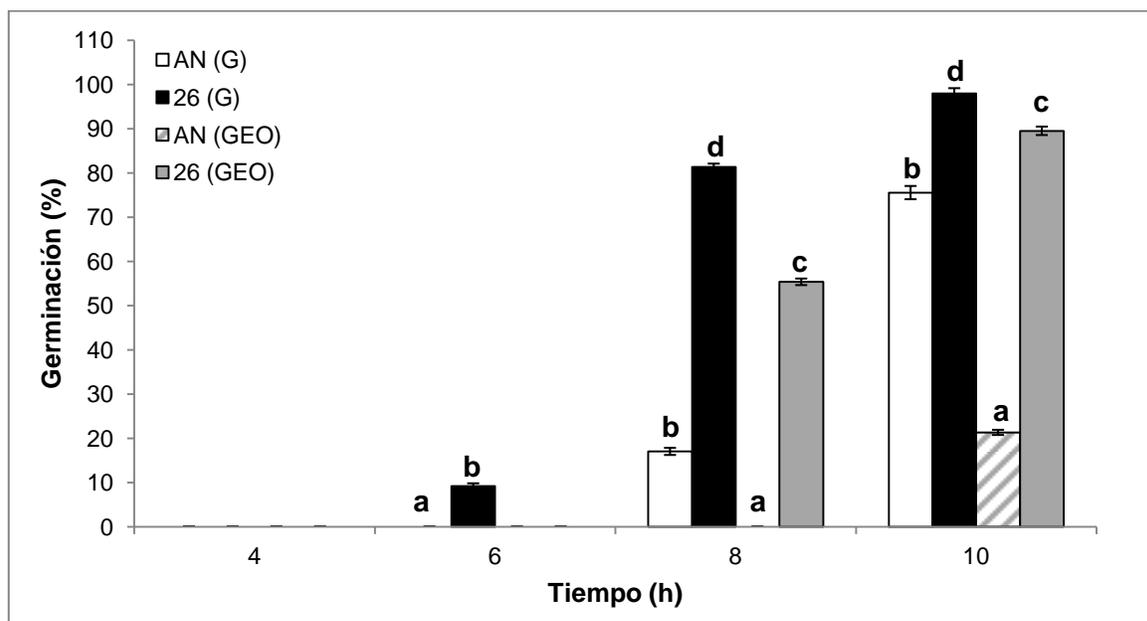


Figura 7.8. Porcentaje de germinación en medio SDA (G) y germinación en condiciones de hiperosmolaridad (GEO; NaCl 0.5M) de los conidios de *I. fumosorosea* ARSEF3302. Letras distintas indican diferencia en este parámetro, en cada tiempo evaluado (ANOVA $P < 0.05$).

Según Jenkins y Grzywacz (2000), la viabilidad, junto con la virulencia, son dos características necesarias para el uso exitoso de los hongos entomopatógenos en campo. De acuerdo a estos autores, una forma rápida y certera de medir la viabilidad de los conidios, es a partir del porcentaje de germinación. De acuerdo a Hassan *et al.*, (1989), cualquier método que pueda reducir el tiempo de germinación de los conidios sobre la cutícula del hospedero, puede incrementar la eficiencia de un micoplaguicida; esto es porque, con ello,

reduciría su dependencia a la alta humedad ambiental. De igual manera, una rápida germinación reduce la exposición de los conidios a factores abióticos que pueden propiciar una disminución en su viabilidad, a saber: la temperatura, la humedad y la radiación UV.

En diversas investigaciones, se han reportado incrementos en la velocidad de germinación de los conidios de hongos entomopatógenos, a partir de diferentes tratamientos. Morales-Hernández *et al.*, (2010), encontró que dos cepas de *M. anisopliae* modificadas genéticamente (sobreexpresión del gen de catalasa *cat1*), reducían en una hora el tiempo en el que el 50% de los conidios germinaba, ello respecto a la cepa silvestre. Ali *et al.*, (2012), encontraron que, al agregar n-octacosano al medio basal donde crecía *B. bassiana*, el tiempo de germinación de los conidios disminuía respecto al tratamiento control. Es importante apuntar que en las dos investigaciones citadas, se reportó un incremento en la actividad catalasa (en el primer caso de manera artificial y en el segundo de manera inducida).

La relación entre el proceso germinativo de los conidios y la enzima catalasa ya había sido propuesta por Braga *et al.*, (1999). Estos autores reportaron que durante la germinación, la concentración de especies reactivas del oxígeno (ERO) aumenta; esto, según se apunta, es ocasionado por un incremento en el metabolismo oxidante. Como se sabe, la actividad de la enzima catalasa se centra en la degradación del peróxido de hidrógeno (una ERO), a agua y oxígeno molecular. De acuerdo a los resultados reseñados, puede proponerse que la disminución en los tiempos de germinación de los conidios, se deba, entre otros factores, a una mayor capacidad antioxidante (específicamente por un incremento en la actividad catalasa); esto, como resultado de la exposición del hongo a ciertos tratamientos. Por ello, en el caso de esta investigación, se estudió la posible relación entre el incremento en la velocidad de germinación encontrada y la actividad total de la enzima catalasa, para ambas cepas de *I. fumosorosea* (Sección 7.6.).

Es importante establecer que, en algunas investigaciones, se ha relacionado la tasa de germinación con la patogenicidad de los conidios de hongos entomopatógenos (Milner *et al.*, 1991). Tal relación se ha reportado, para *Metarhizium anisopliae*, en estudios hechos hace más de 35 años (Alaidroos y Roberts, 1978). En la investigación hecha por Samuels *et al.*, (1989), con 24 aislados de *M. anisopliae*, se concluyó que una rápida germinación estaba correlacionada con una alta patogenicidad hacia el insecto *Nilaparvata lugens*. De igual

forma, en la ya citada investigación de Morales-Hernández *et al.*, (2010), la cepa de *M. anisopliae* en la que se sobreexpresó un gen de la enzima catalasa (*cat1*), además de incrementar su velocidad de germinación, también incrementó su infectividad hacia larvas del insecto *P. xylostella*. Lo que se evidenció en la disminución de la concentración letal 50 (CL₅₀), que es la concentración de conidios necesaria para matar al 50% de la población, en un factor de 14 veces (4.4×10^5 con/mL cepa silvestre, 3×10^4 con/mL cepa modificada). Igualmente, en aislados de *Isaria (Paecilomyces) fumosoroseus*, se encontró que la germinación estaba altamente relacionada con la infectividad (Altre *et al.*, 1999). Estos autores mencionan que las dos cepas con tiempos de germinación más bajos, fueron las que presentaron una mayor infectividad hacia larvas de *P. xylostella*.

Por otra parte, entre los factores abióticos críticos que influyen en la germinación, crecimiento y capacidad de infección de los conidios de los hongos entomopatógenos, se encuentra la disponibilidad de agua (Hallsworth y Magan, 1999). Además de enfrentar un estrés osmótico en el campo donde es asperjado, en la adaptación de los conidios a la hemolinfa del insecto se incluye la acumulación de solutos, que propician un incremento en la presión osmótica interna (Wang y St. Leger, 2006). De acuerdo a Chapman (1998), la hemolinfa del insecto se caracteriza por una alta presión osmótica por lo que, debido a su concentración, puede considerarse una situación de estrés para el hongo entomopatógeno. Se ha reportado que microorganismos eucariotas, adquieren una mayor resistencia a condiciones de estrés osmótico, después de ser expuestos a un estrés osmótico subletal. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, después de ser expuesto a concentraciones de 0.7 M de NaCl, adquirió una resistencia a concentraciones de 1.4 M, o mayores, de esta misma sal (Trollmo *et al.*, 1988; Varela *et al.*, 1992). Se ha reportado que estrés de diferente naturaleza, promueven una “protección cruzada” hacia el estrés osmótico. Lewis *et al.*, (1995), comprobaron que, después de exponer a *S. cerevisiae* a temperaturas de 37°C a 45°C, las levaduras adquirieron resistencia a concentraciones de hasta 1.5 M de NaCl.

Los resultados encontrados en la presente investigación, se relacionan con reportes ya publicados en lo que respecta a la asociación germinación-infectividad (ambas cepas de *I. fumosorosea*). También, en lo tocante al fenómeno de protección cruzada que, con base en los resultados presentados, el tratamiento 26 otorga a los conidios respecto a la germinación en una condición hiperosmolar. Si se sigue la hipótesis de que el tratamiento 26 puede promover el incremento en enzimas antioxidantes, como catalasa, podría sugerirse que los

conidios expuestos a esta atmósfera modificada sean más resistentes a un agente oxidante externo, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), experimento cuyos resultados se describen a continuación.

7.2.3. Resistencia a peróxido de hidrógeno

Con base en los resultados encontrados con el tratamiento 26 y a la revisión de artículos científicos, la hipótesis que surgió para tratar de explicar éstos, fue que la atmósfera enriquecida podría propiciar un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa. Por ello, un primer acercamiento fue investigar si los conidios producidos con el tratamiento 26, evidenciaban un incremento en la resistencia a diversas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, esta prueba también permitiría saber si los conidios podrían superar una de las barreras a las que se enfrentan durante el proceso infectivo, ya que se sabe que uno de los mecanismos de defensa que tienen los insectos ante una infección fúngica, es la producción de ERO (Schmid-Hempel, 2005).

La resistencia de los conidios al H_2O_2 , se determinó a partir de la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) encontradas en cada una de las concentraciones descritas respecto al control (conidios no expuestos al agente oxidante). Los datos obtenidos se ajustaron al modelo reportado en la sección 6.5.1. y, a partir de esto, se calculó la concentración letal 50 (CL_{50}), que refiere a la concentración de H_2O_2 (mM) en la que el 50% de los conidios permanecen viables. Para *M. anisopliae*, el valor del parámetro CL_{50} fue de 15.19 mM y 13.64 mM, para los tratamientos AN y 26 respectivamente (Tabla 7.5), los cuales no tuvieron diferencias significativas al realizar el análisis estadístico (t Student $P < 0.05$). Desde una concentración de 50 mM, se observó que la viabilidad de los conidios ya era cercana a cero (Fig. 7.9). Estos resultados se relacionan con lo reportado por Morales-Hernández *et al.*, (2010) donde, con otra cepa de *M. anisopliae*, observaron que a una concentración de H_2O_2 50 mM la viabilidad de los conidios, de la cepa silvestre, era cercana a cero, y aún las cepas que de manera artificial sobreexpresaban una enzima catalasa tuvieron una viabilidad menor a 20% en esta concentración.

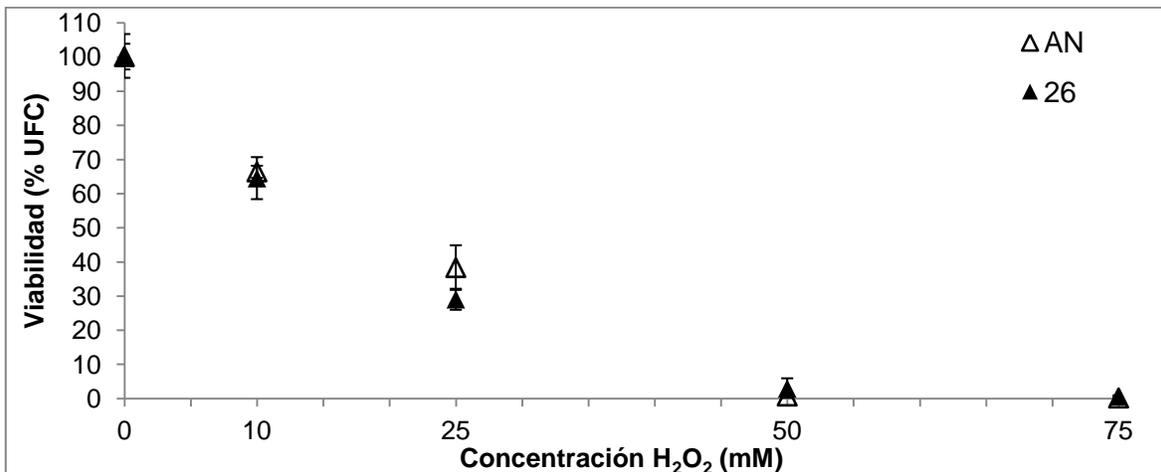


Figura 7.9. Porcentaje de viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* CP-OAX en diferentes concentraciones de H₂O₂. Fue evaluada la viabilidad de los conidios expuestos a los tratamientos de AN (Figuras abiertas) y 26 (figuras cerradas). La viabilidad fue determinada a partir del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada concentración del compuesto oxidante. El porcentaje se determinó considerando las UFC encontradas en el control (no expuesto a H₂O₂).

Por lo que respecta a *B. bassiana*, el valor del parámetro CL₅₀ para el tratamiento 26 (35.70 mM) resultó significativamente mayor (t Student, P < 0.05) al encontrado en el tratamiento AN (13.88 mM). Esto representa un incremento de 2.5 veces la resistencia de los conidios de la atmósfera modificada respecto a la atmósfera normal (Tabla 7.5.). En este hongo, las mayores diferencias en la viabilidad se encontraron a partir de una concentración de 25 mM de H₂O₂ ya que, mientras la viabilidad en AN ya era menor al 10%, para 26 se mantenía por encima del 50% (Fig. 7.10.).

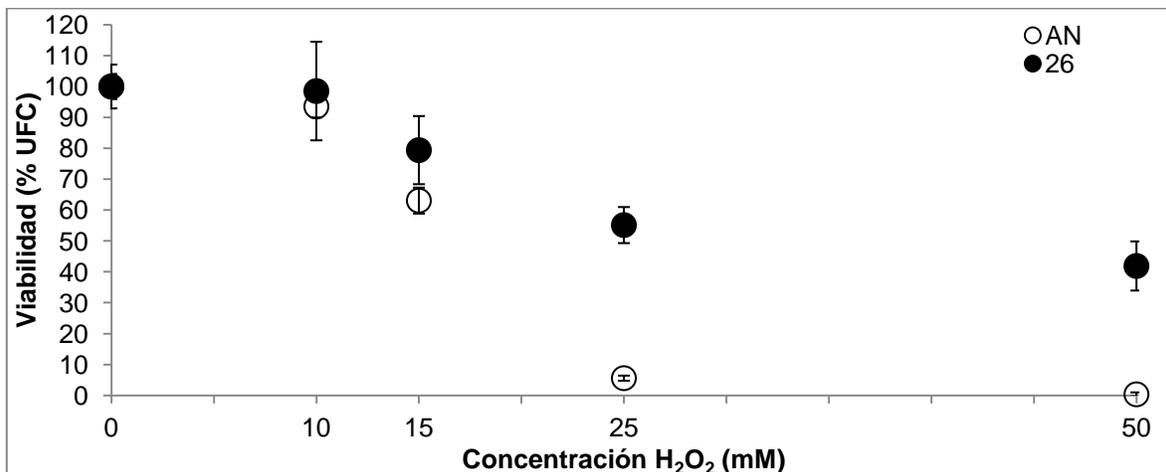


Figura 7.10. Porcentaje de viabilidad de los conidios de *B. bassiana* en diferentes concentraciones de H₂O₂. Fue evaluada la viabilidad de los conidios expuestos a los tratamientos de AN (figuras abiertas) y 26 (figuras cerradas). La viabilidad fue determinada a partir del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada concentración del compuesto oxidante. El porcentaje se determinó considerando las UFC encontradas en el control (no expuesto a H₂O₂).

Tabla 7.5. Concentración letal 50 (CL₅₀) de H₂O₂ (mM) para los conidios de los cuatro hongos entomopatógenos estudiados. Los conidios fueron expuestos a dos tratamientos: atmósfera normal (AN) y con 26% O₂ (26). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de cada uno de los hongos (t Student, P < 0.05).

Cepa	Tratamiento	CL ₅₀ (H ₂ O ₂ mM)
<i>M. anisopliae</i> CP-OAX	AN	15.19 ± 1.39 a
	26	13.64 ± 1.45 a
<i>B. bassiana</i> 882.5	AN	13.88 ± 0.61 a
	26	35.70 ± 7.06 b
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	AN	14.10 ± 1.51 a
	26	13.71 ± 1.38 a
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302	AN	21.26 ± 0.89 b
	26	13.65 ± 1.01 a

En el caso de la cepa *I. fumosorosea* CNRCB1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos respecto al valor de CL₅₀ (t Student, P > 0.05). A pesar de ello, es llamativo que sí se encontraron diferencias en las concentraciones de H₂O₂ de 10 mM (mayor viabilidad de los conidios del tratamiento 26) y de 15 y 25 mM (mayor viabilidad de los conidios del tratamiento AN); mientras que a una concentración de 50 mM, la viabilidad en ambos tratamientos ya era menor a 10% (Fig. 7.11).

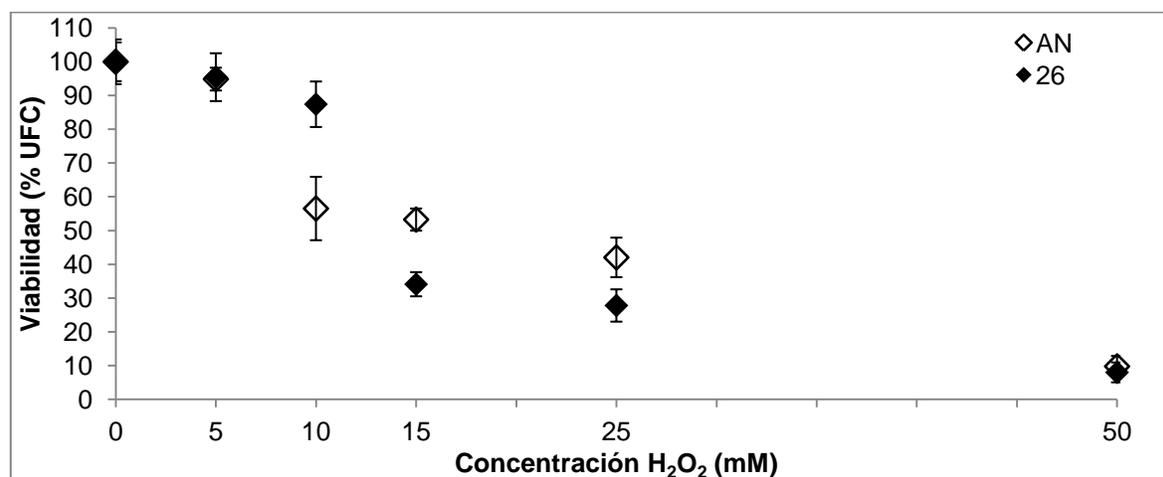


Figura 7.11. Porcentaje de viabilidad de los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 en diferentes concentraciones de H₂O₂. Fue evaluada la viabilidad de los conidios expuestos a los tratamientos de AN (figuras abiertas) y 26 (figuras cerradas). La viabilidad fue determinada a partir del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada concentración del compuesto oxidante. El porcentaje se determinó considerando las UFC encontradas en el control (no expuesto a H₂O₂).

Finalmente, por lo que respecta a la cepa *I. fumosorosea* ARSEF 3302, los valores encontrados del parámetro CL₅₀ fueron los siguientes: para el tratamiento AN de 21.26 mM,

mientras que el correspondiente al tratamiento 26 fue de 13.65 mM (Tabla 7.5.), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa en ellos (t Student, $P < 0.05$). Las diferencias entre los tratamientos se encontraron a partir de una concentración de 10 mM, continuando éstas en concentraciones de 15 y 25 mM; a un valor de 50 mM de H_2O_2 , los conidios de ambos tratamientos presentaban una viabilidad cercana a 0% (Fig. 7.12).

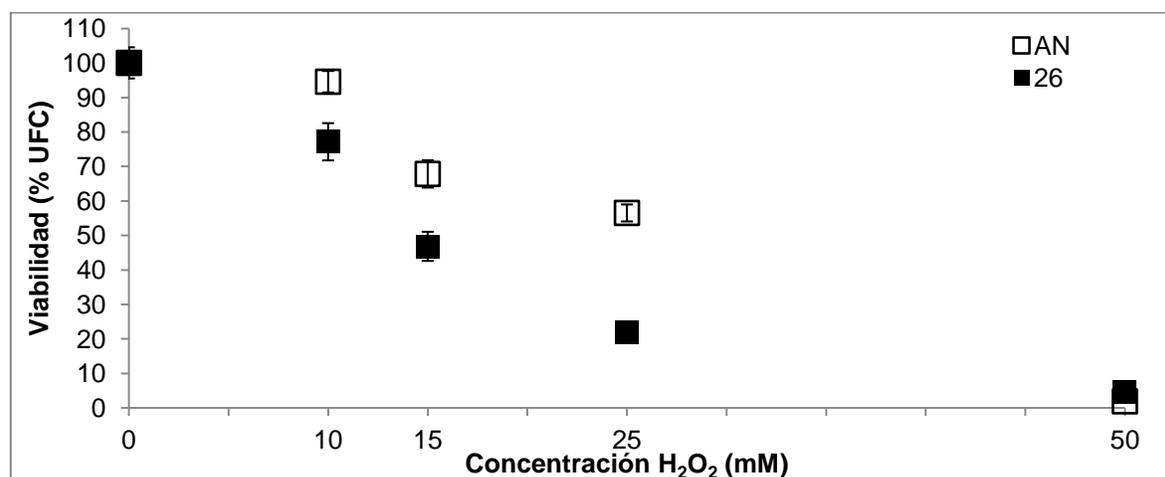


Figura 7.12. Porcentaje de viabilidad de los conidios de *I. fumosorosea* ARSEF3302 en diferentes concentraciones de H_2O_2 . Fue evaluada la viabilidad de los conidios expuestos a los tratamientos de AN (Sin relleno) y 26 (con relleno). La viabilidad fue determinada a partir del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada concentración del compuesto oxidante. El porcentaje se determinó considerando las UFC encontradas en el control (no expuesto a H_2O_2).

La hipótesis formulada al inicio de este experimento no fue confirmada. De manera general, los conidios expuestos al tratamiento 26, no presentaron una mayor viabilidad ante diferentes concentraciones de H_2O_2 , respecto a los conidios del tratamiento AN. Sin embargo, la revisión de diversos artículos científicos permitió un nuevo enfoque respecto a estos resultados. En la investigación hecha por Pedrini *et al.*, (2006), se estudió la actividad catalasa en las fracciones peroxisomal y citosólica de *B. bassiana*, encontrándose que la catalasa peroxisomal era sensible a variaciones en pH, calor y altas concentraciones de H_2O_2 ; mientras que la catalasa citosólica resultó ser estable en rangos de pH de 6-10, tolerancia a elevadas temperaturas (hasta $55^\circ C$) y mantenía una alta actividad en concentraciones de H_2O_2 mayores a 70 mM. Un resultado igualmente interesante en ese artículo, es el incremento de la actividad catalasa peroxisomal, de hasta 12.6 veces y, al mismo tiempo una reducción en la actividad catalasa citosólica en hasta 1.2 veces, al sustituir la glucosa por un hidrocarburo asociado con los insectos (n-octacosano). Por lo anterior, surge un cuestionamiento: en la diversidad de enzimas catalasa con las que cuenta

un hongo entomopatógeno, ¿existen algunas que sean relevantes para la degradación de H_2O_2 y otras que se expresen, preferencialmente, en procesos específicos como infectividad o resistencia a estrés?

Un artículo que aporta resultados interesantes respecto a esto, es el realizado por Wang *et al.*, (2013). En su estudio con *B. bassiana*, los autores encuentran 5 tipos de enzimas catalasa (A, B, P, C y D); de éstas, sólo la tipo P fue relevante en la resistencia a H_2O_2 , lo que se evidenció cuando, al inhabilitar el gen que codifica para esta enzima, la sensibilidad de la cepa modificada a este agente oxidante se incrementó hasta un 74%, respecto a la cepa silvestre. En la investigación hecha por Chantasingh *et al.*, (2013), se sobreexpresó un gen de catalasa asociado a la infectividad de *B. bassiana* (*catE7*). Curiosamente, las cepas modificadas sí fueron más infectivas para las larvas del insecto *Spodoptera exigua*, mas no presentaron un incremento en la resistencia a diversas concentraciones de H_2O_2 (1-10 mM), lo cual se comprobó al considerar el crecimiento radial vegetativo de las mismas en presencia del agente oxidante.

Además de los estudios con hongos entomopatógenos arriba reseñados, existen investigaciones con otros organismos, donde se encuentran resultados similares. Por ejemplo, Bussink y Oliver (2001), al estudiar a *Cladosporium fulvum*, encontraron que la actividad de una de las dos enzimas catalasa que identificaron en este hongo, CAT2, representaba sólo una pequeña fracción de la actividad catalasa total en esporas y en micelio expuesto a H_2O_2 . Chagas *et al.*, (2008), determinaron el papel que tiene cada una de las tres diferentes enzimas catalasa en el hongo *Paracoccidioides brasiliensis*. De ellas, PbCatP presentó una alta actividad en levaduras cuando éstas se expusieron a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Otra, PbCatA, incrementó su actividad cuando se expuso al hongo a estrés oxidante endógeno (formación de ERO por β -oxidación de ácido oleico). La tercer catalasa, PbCatC, presentó pautas de expresión constantes, sólo siendo ligeramente inducida cuando las células se exponían a estrés osmótico y térmico.

Si bien, la prueba de resistencia a H_2O_2 permitió determinar los perfiles de los conidios de los cuatro hongos entomopatógenos expuestos a cada tratamiento (AN y 26), éstos sólo representan un primer acercamiento a un fenómeno todavía más complejo, a saber y como se evidenció en los diversos reportes citados: la variabilidad de las enzimas catalasa en los distintos organismos, incluyendo los hongos entomopatógenos. Variabilidad que se

manifiesta en los diversos factores que promueven o disminuyen la actividad de cada una de ellas de manera independiente. Lo que resultó evidente, es que el tratamiento 26 propició respuestas diferenciales en la actividad global de estas enzimas en los hongos estudiados, con excepción de *M. anisopliae*, que fue el único hongo que no mostró una influencia de la atmósfera enriquecida (26) a este respecto.

7.3. Cuantificación de trehalosa y manitol

En estudios previos en hongos se ha establecido la importancia de los polioles y la trehalosa en: la germinación de los conidios (Gornova *et al.*, 1992), germinación en condiciones de baja a_w (Hallsworth y Magan, 1994b y 1995), en condiciones de estrés oxidante (Ruijter *et al.*, 2003), así como en la resistencia a altas temperaturas (Noventa-Jordao *et al.*, 1999; Singer y Lindquist, 1998; Fillinger *et al.*, 2001). Es por ello que se consideró apropiado el estudio de la concentración de estos compuestos en los conidios de los hongos entomopatógenos, como una posible explicación al incremento en su calidad (un compendio de esto, se observa en el Anexo B).

Para *M. anisopliae* se encontró que la concentración de manitol disminuyó en más del 80% en los conidios del tratamiento 26 ($1.95 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$) respecto a lo encontrado en los del tratamiento AN ($9.93 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$). Mientras que en el caso del disacárido trehalosa, para este mismo hongo, se observó un fenómeno inverso, ya que los conidios del tratamiento 26 duplicaron la concentración de este compuesto respecto a lo encontrado en los conidios de AN (Tabla 7.6.). De acuerdo al estudio de Hallsworth y Magan (1997), en condiciones normales, *M. anisopliae* acumula más del triple de concentración de manitol respecto a la de trehalosa. En el presente estudio, las diferencias fueron de un poco más del doble ($9.93 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$ y $4.78 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$, respectivamente). Fue llamativo que en los conidios del tratamiento 26, se propició una acumulación inversa ya que el compuesto más abundante fue la trehalosa, al tiempo que disminuyó drásticamente la concentración del manitol ($9.61 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$ y $1.95 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$, respectivamente). Esto coincide con que el efecto más importante, respecto a la calidad, que el tratamiento 26 propició en los conidios de *M. anisopliae*, fue una mayor termotolerancia y, como ya se estableció, la trehalosa es un compuesto que ha sido relacionado con este fenómeno.

Respecto a *B. bassiana*, sólo pudo detectarse el poliol manitol en los conidios de ambos tratamientos. Los conidios del tratamiento AN presentaron una concentración de este

compuesto de $1.18 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$, mientras que la correspondiente a los conidios del tratamiento 26 fue de $10.08 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$, lo que representó un incremento de 8.5 veces (Tabla 7.6.). El incremento en el poliol manitol en los conidios del tratamiento 26, puede relacionarse con el incremento en la germinación que se observó en este hongo (Anexo B), debido a que, como se sabe, el manitol es uno de los solutos compatibles que se acumulan en los conidios latentes y son degradados durante la germinación (van Leeuwen *et al.*, 2013). La ausencia en la detección de trehalosa, podría explicarse por la baja concentración de este compuesto en los conidios de *B. bassiana* en condiciones normales (Hallsworth y Magan, 1997).

En el caso de ambas cepas de *I. fumosorosea*, el manitol fue el único compuesto que se detectó (Tabla 7.6.). Para la cepa CNRCB1, la concentración de este poliol, en los conidios del tratamiento AN fue de $2 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$, mientras que la de los conidios provenientes del tratamiento 26 fue de $18.4 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$. Lo que representa un incremento de más de nueve veces. De manera contrastante, la otra cepa, ARSEF 3302, no presentó ningún incremento en este compuesto ya que, la concentración en conidios de AN fue $4 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$, mientras que la de los conidios de 26 fue $3.8 \times 10^{-7} \mu\text{g con}^{-1}$. (Tabla 7.6.), sin tener diferencias estadísticamente significativas (t Student, $P > 0.05$).

Tabla 7.6. Cuantificación de la concentración del poliol manitol y el disacárido trehalosa en los conidios de los cuatro hongos entomopatógenos estudiados. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cada uno de los hongos (t Student, $\alpha = 0.05$).

Hongo	Compuesto	Tratamiento	$\mu\text{g con}^{-1}$ (10^{-7})
<i>M. anisopliae</i> CP-OAX	Manitol	AN	9.93 ± 0.9 b
		26	1.95 ± 1.3 a
	Trehalosa	AN	4.78 ± 0.4 a
		26	9.61 ± 1.6 b
<i>B. bassiana</i> 882.5	Manitol	AN	1.18 ± 0.4 a
		26	10.08 ± 0.9 b
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	Manitol	AN	2 ± 0.6 a
		26	18.4 ± 3.4 b
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302	Manitol	AN	4 ± 0.1 a
		26	3.8 ± 0.2 a

Los perfiles de concentración de trehalosa y manitol encontrados en los conidios de los hongos entomopatógenos, fue disímil. Sólo en la cepa de *M. anisopliae* se pudieron cuantificar ambos compuestos, mientras que para el resto (*B. bassiana* y ambas cepas de *I.*

fumoso) sólo se obtuvieron lecturas del poliol manitol. Lo encontrado en los conidios de *M. anisopliae* expuestos al tratamiento 26 resultó interesante; esto es, la disminución en la concentración de manitol y el aumento en la de trehalosa, respecto a lo cuantificado en los conidios de AN. Este fenómeno, aunque propiciado de diferente manera, ya ha sido reportado en el artículo de Wang *et al.*, (2012). En él, los autores silencian los genes de dos enzimas que participan en la biosíntesis del manitol en *B. bassiana* y encuentran que, en ambos casos, la disminución de este poliol va acompañada por un incremento en la concentración de la trehalosa, tanto en micelio como en conidios, tanto en condiciones de crecimiento normal como en condiciones de estrés (osmótico, oxidante y térmico). Finalmente, los autores encuentran una correlación inversa entre los contenidos de manitol y trehalosa en las cuatro condiciones ya descritas. En la investigación hecha con *B. bassiana* por Liu *et al.*, (2009), también se establece esta correlación inversa en la concentración manitol:trehalosa. En este caso, al exponer el micelio de este hongo a elevadas temperaturas, los investigadores observaron un incremento en la concentración de trehalosa y, al mismo tiempo, una disminución en la del poliol manitol. Por lo anterior, el aumento en el disacárido trehalosa en los conidios de *M. anisopliae* expuestos al tratamiento 26, podría explicar el incremento en la resistencia de éstos a temperaturas de 40°C y 45°C.

Por otra parte, el manitol ha sido asociado en la resistencia de hongos a elevadas temperaturas. Por ejemplo, en el estudio de Ruijter *et al.*, (2003), al silenciar el gen que codifica para la enzima manitol-1-fosfato deshidrogenasa de *A. niger*, tanto el micelio como los conidios de este hongo resultaron más sensibles a altas temperaturas. En el ya citado reporte de Wang *et al.*, (2012), al silenciar los genes de enzimas implicadas en el metabolismo del manitol en conidios, éstos resultaron más sensibles a H₂O₂, radiación UV-B y alta temperatura (45°C), evidenciando el importante papel de este poliol en condiciones de estrés.

Sin embargo, los resultados encontrados en la presente investigación, no ofrecen alguna conclusión, al menos parcial, acerca de ello ya que, si bien en las cepas de *B. bassiana* e *I. fumoso* CNRCB1 se observó un incremento en la concentración de manitol en sus conidios, sólo los de la cepa *I. fumoso* CNRCB1 presentaron un incremento en la resistencia a temperatura (Sección 7.2.1.), además, aunque los conidios de la cepa *I. fumoso* ARSEF 3302 también incrementaron su termotolerancia, no se observó un incremento en la concentración de manitol. Si es que, como se ha reportado, el manitol

también está implicado en el proceso germinativo (Gornova *et al.*, 1992) podría explicar por qué, tanto los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 como *B. bassiana*, hayan presentado una germinación más rápida, tanto en condiciones normales como en hiperosmolaridad (Sección 7.2.2.), aunque, nuevamente, lo anterior no sea válido para la cepa *I. fumosorosea* ARSEF 3302.

Los compuestos como el manitol y la trehalosa han sido relacionados con incrementos en la resistencia a diversos tipos de estrés en diversos organismos, aunque en otras investigaciones no han sido relevantes para explicar este fenómeno. Por ejemplo, en el estudio hecho por Rangel *et al.*, (2008a), se encontró que los conidios de *M. anisopliae*, después de ser expuestos a un estrés osmótico, presentaban una mayor resistencia a elevadas temperaturas y a radiación UV-B que aquellos del tratamiento control; sin embargo, los conidios expuestos, tuvieron menores concentraciones de trehalosa y manitol comparativamente con los no expuestos, por lo que los autores concluyeron que la acumulación de estos compuestos no es el único mecanismo con el que cuenta *M. anisopliae* para su protección ante los factores citados. Otro ejemplo, es el estudio hecho por Erdei *et al.*, (2011), con el hongo *Kluyveromyces marxianus*, observaron que, al exponer repetidamente las levaduras de este hongo a una temperatura de 48°C, el contenido de trehalosa en éstas se incrementaba significativamente; inesperadamente, estas levaduras resultaron ser más sensibles a estrés osmótico, oxidante y al ocasionado por alcohol. Más aún, los autores encontraron una correlación entre el aumento de sensibilidad a estas condiciones de estrés y el incremento en la concentración de trehalosa.

Considerando todo lo anterior, tanto los resultados de esta investigación como la revisión bibliográfica, no pudo establecerse una relación entre el aumento en la calidad de los conidios expuestos al tratamiento 26 (ver tabla anexo B) y la concentración del poliol manitol y/o el disacárido trehalosa. Sin duda, no puede cerrarse la opción de la participación de estos compuestos en alguna fase de la adquisición de la “protección cruzada” encontrada; sin embargo, al menos en lo que respecta a este estudio, los resultados encontrados de estos compuestos no ofrecieron una respuesta sólida para explicar, en alguna medida, el aumento en la calidad de los conidios observada. Por ello, se decidió estudiar otra posible causa que ofreciera una explicación acerca de los fenómenos observados, es decir, productos derivados del oxígeno y las enzimas que sirven para degradarlos.

7.4. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Como se ha mostrado, el tratamiento 26 tuvo un efecto favorable para los conidios de las dos cepas de *I. fumosorosea*, en 4 de las 6 pruebas de calidad realizadas (Anexo B). Debido a ésto, se decidió continuar con el estudio sólo de esas cepas, para buscar una posible explicación del fenómeno encontrado. Por la naturaleza del tratamiento estudiado (atmósfera rica en oxígeno), una interrogante ineludible era, si esta condición atmosférica, podría propiciar un incremento en la cantidad de especies reactivas del oxígeno (ERO). La técnica que permitió cuantificar, tanto el grado general de estrés oxidante como la concentración del anión superóxido en los conidios de las dos cepas de *I. fumosorosea*, se basa en la fluorescencia que, a partir de los reactivos utilizados, emitieron los conidios de los dos tratamientos estudiados (AN y 26). Debido a que no se conocía la velocidad de sedimentación de los conidios, las lecturas con el reactivo DCFH (2',7'- diacetato de diclorodihidrofluorosceína), se hicieron tanto en la parte superior como inferior del pozo de la placa por ello, en este caso, se presentan dos gráficas. En la muestra control, se sustituyó el volumen de la suspensión de conidios por buffer PBS (Sección 6.7.). El grado general de estrés oxidante y la concentración de anión superóxido en los conidios de cada tratamiento, se presentan considerando la fluorescencia de la muestra control como la unidad, esto es, igual a 1.

Para la cepa CNRCB1, el estado general de estrés oxidante en los conidios del tratamiento AN incrementó 3.11 y 1.76 veces respecto al control, en la lectura superior e inferior del pozo, respectivamente (Fig. 7.13. A y B); mientras que los conidios del tratamiento 26 presentaron un incremento, respecto al control, de 5.72 y 2.62 de acuerdo a las lecturas en la parte superior e inferior del pozo. Lo anterior, representa un incremento de 83% y 48% (parte superior e inferior, respectivamente) en el estado general de estrés oxidante de los conidios del tratamiento 26 respecto a los del tratamiento AN. En la cuantificación del anión superóxido fue donde se encontraron las mayores diferencias entre los tratamientos ya que, para los conidios expuestos a AN, se registró un incremento de 1.86 veces respecto al control, mientras que lo encontrado en los conidios del tratamiento 26 fue de 8.23 de incremento (Fig. 7.13. C). Esto significa que la concentración de anión superóxido en los conidios expuestos a la atmósfera enriquecida (26) aumentó más de 4 veces comparado con lo encontrado en los conidios de la atmósfera normal (AN).

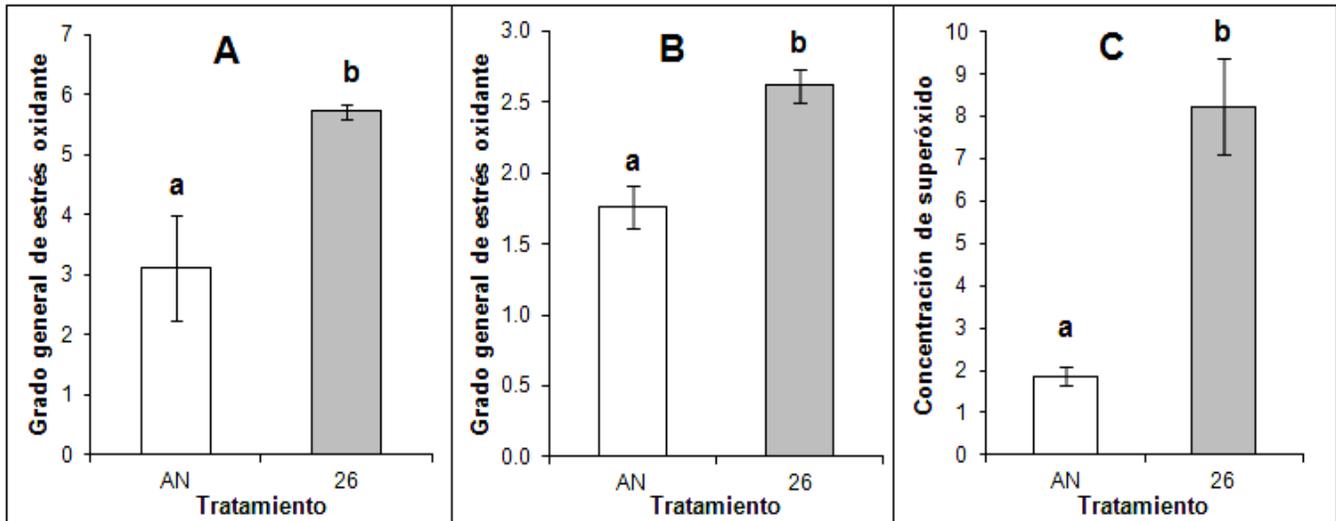


Figura 7.13. Cuantificación del grado general de estrés oxidante (A y B) y del anión superóxido (C) en los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 expuestos a los tratamientos de atmósfera normal (AN, barra abierta) y enriquecida (26, barra cerrada). Para el grado general de estrés oxidante, se hicieron lecturas en la parte superior (A) e inferior (B) del pozo. Los resultados se presentan normalizados respecto a la muestra control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cada una de las pruebas (t Student $P < 0.05$).

En el caso de la cepa ARSEF 3302, se encontró que el grado general de estrés oxidante para los conidios del tratamiento AN presentó un incremento, respecto al control, de 7.65 y 2.25 en la lectura superior e inferior del pozo, respectivamente. Mientras que, para los conidios del tratamiento 26, se encontraron incrementos de 10.88 y 3.14 respecto al control. Lo anterior significa un aumento en el grado general de estrés oxidante de los conidios del tratamiento 26, respecto a los del tratamiento AN, de 42% y casi 40% en la parte superior e inferior del pozo, respectivamente (Fig. 7.14. A y B). En lo que corresponde a la concentración del anión superóxido, se encontró un incremento de 7.21 veces en los conidios expuestos a la atmósfera normal (AN) comparado con la muestra control; mientras que para los conidios provenientes de la atmósfera enriquecida (26), el incremento encontrado fue de 22.5 (Fig. 7.14.C). Comparando los tratamientos, la concentración del anión superóxido fue mayor por más de tres veces en los conidios del tratamiento 26 respecto a los de AN.

Al comparar estos resultados entre las dos cepas de *I. fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302), y considerando ahora las unidades de fluorescencia (la magnitud de fluorescencia emitida por los conidios), se encontró que el grado general de estrés oxidante resultó similar en los conidios de ambas cepas, comparando los tratamientos AN y 26, por separado. Sin

embargo, es interesante observar que la cuantificación del anión superóxido fue mayor en los conidios de la cepa ARSEF 3302, siendo 7.5 veces mayor en AN y 3.1 veces mayor en 26 (Anexo H).

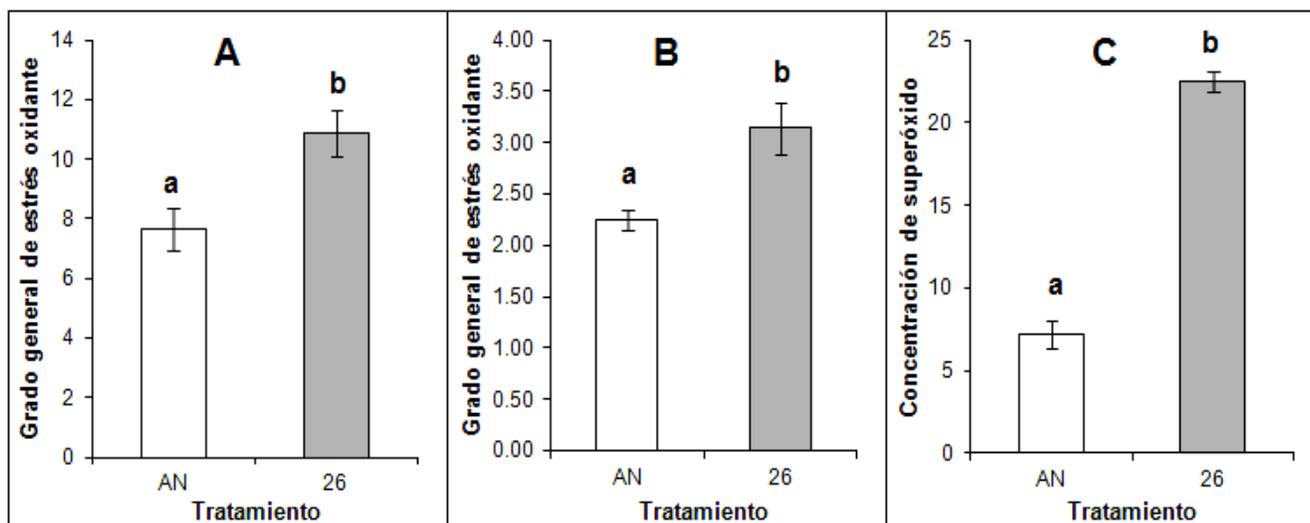


Figura 7.14. Cuantificación del grado general de estrés oxidante (A y B) y del anión superóxido (C) en los conidios de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 expuestos a los tratamientos de atmósfera normal (AN, barra abierta) y enriquecida (26, barra cerrada). Para el grado general de estrés oxidante, se hicieron lecturas en la parte superior (A) e inferior (B) del pozo. Los resultados se presentan normalizados respecto a la muestra control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cada una de las pruebas (t Student $P < 0.05$).

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se han considerado como subproductos del metabolismo celular, generados principalmente en la mitocondria. Cuando la producción de ERO sobrepasa la capacidad antioxidante celular, se considera un estado de estrés oxidante, evento que ocasiona daños en las macromoléculas celulares como los lípidos, proteínas y ADN (Thannickal y Fanburg, 2000). Sin embargo, las ERO también juegan un papel determinante en procesos fisiológicos (Finkel, 1998; Rhee, 1999; Aguirre *et al.*, 2005). De hecho, se ha reportado que las enzimas NADPH oxidasas (NOX), producen ERO para regular la diferenciación celular, inmunidad, proliferación celular, transducción de señales y transporte de iones (Finkel, 2003; Lambeth, 2004; Foreman *et al.*, 2003; Kwak *et al.*, 2003). Es interesante cómo en algunas investigaciones, las ERO, han sido implicadas en interacciones patógeno-hospedero (Nathues, 2004). Además, se ha asociado a las ERO, en procesos vitales como la apoptosis (Sarafian y Bredesen, 1994; Slater *et al.*, 1995).

En el caso de los hongos entomopatógenos, ya se han reseñado los artículos que estudiaron la relación entre una mayor actividad catalasa (enzima antioxidante) y el incremento en la tasa de germinación, infectividad y resistencia a estrés (Morales-Hernández *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012). Se puede suponer que un incremento en el grado de oxidación celular, tendrá como resultado un incremento en la actividad de una o varias enzimas antioxidantes (catalasa, SOD, glutatión peroxidasa). Por ello, una vez que se comprobó el aumento en la producción de ERO, el siguiente paso en esta investigación fue el estudio de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa. Se estudiaron específicamente estas enzimas ya que, de acuerdo a varios reportes recientes, se han asociado a incrementos en la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos.

7.5. Cuantificación de actividad superóxido dismutasa (SOD)

Debido a los resultados encontrados en el apartado anterior, se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en los conidios de las dos cepas de *I. fumosorosea* expuestos, tanto al tratamiento AN, como al 26. Además de estudiar la respuesta enzimática de *I. fumosorosea*, ante un evidente incremento en la concentración del anión superóxido en los conidios del tratamiento 26 (Sección 7.4.), este experimento buscaba establecer si a este tipo de enzimas (SOD) se les podría relacionar con el incremento en la calidad de los conidios de ambas cepas, considerando los reportes científicos con *B. bassiana* que han evidenciado tal relación (Xie *et al.*, 2010 y 2012).

La hipótesis planteada antes de la realización de este experimento, fundamentada en los resultados descritos en la sección anterior, era que la actividad de esta enzima antioxidante, en los conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea*, podría incrementarse. Sin embargo, en los resultados encontrados en la cepa CNRCB1, se observó un fenómeno contrario al esperado ya que, la actividad enzimática de los conidios del tratamiento AN tuvieron una actividad SOD significativamente mayor (t Student, $P < 0.05$) a lo obtenido en lo correspondiente al tratamiento 26 (17.1 y 9.5 U μg^{-1} proteína, respectivamente), diferencias que representan un 80% de actividad mayor en AN que en 26 (Fig. 7.15.A). En el caso de la cepa ARSEF 3302, no se observó una diferencia estadísticamente significativa (t Student, $P > 0.05$) en la actividad SOD en los conidios de ambos tratamientos. Siendo las cuantificaciones de 11.81 y 13.37 U μg^{-1} proteína para los conidios de los tratamientos AN y 26, respectivamente (Fig. 7.15.B).

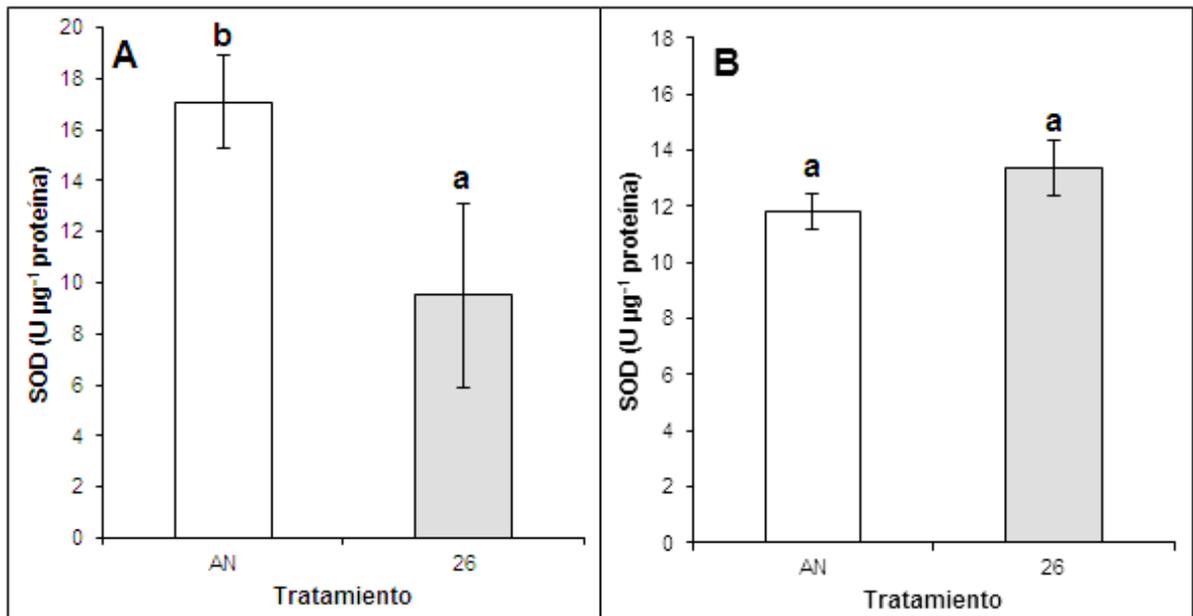


Figura 7.15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 (A) y ARSEF 3302 (B), expuestos a una atmósfera normal (AN, barras abiertas) y pulsos de una atmósfera enriquecida (26, barras cerradas). La actividad enzimática se reporta como unidades por microgramo de proteína (U µg⁻¹ proteína). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (t Student, P < 0.05) en cada una de las cepas.

En los hongos, se sabe que las enzimas SOD están involucradas en varios procesos biológicos como: respuesta a estrés, diferenciación celular e infección (Aguirre *et al.*, 2005). Por ejemplo, en levaduras, la enzima MnSOD participa en la protección de daños por hiperosmolaridad, calor y oxidación (Jeong *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2003; Narasipura *et al.*, 2005; Dziadkowiec *et al.*, 2007).

En el caso de los hongos entomopatógenos, diversos estudios han evidenciado la importancia de las enzimas SOD en diversos procesos biológicos. Cuando se sobreexpresó el gen *BbSod2* en una cepa de *B. bassiana*, se observó un incremento en la resistencia a radiación UV-B y también se evidenció un incremento en la infectividad de este hongo hacia larvas de *S. litura* (Xie *et al.*, 2010). En otra investigación, se propició la disfuncionalidad de dos genes SOD (*BbSod2* y *BbSod3*) de *B. bassiana*, anulando también la traducción a proteína de estos genes por RNAi. Lo anterior ocasionó alteraciones en el fenotipo como: retraso en la esporulación, disminución en la producción de conidios, mayor sensibilidad a compuestos oxidantes (menadiona y H₂O₂), reducción en su tolerancia a UV-A y UV-B y, finalmente, también se observó un aumento en los tiempos letales 50 (TL50) hacia *Myzus persicae* (Xie *et al.*, 2012). En *I. fumosorosea* también se ha reportado la importancia de la

enzima SOD. Ali *et al.*, (2011), estudiaron la influencia de agregar metales como Cu, Zn, Mn, Fe y la mezcla de ellos en el medio de cultivo y observaron si propiciaban un incremento en la actividad de esta enzima y, a partir de ello, estudiar el efecto que tendría dicho incremento. Los conidios producidos en el medio que propició un mayor incremento en la actividad SOD (Cu + Zn), resultaron más tolerantes a estrés térmico y a radiación UV-B, además de mostrar una mayor virulencia hacia larvas de *P. xylostella*.

En esta investigación, a pesar del evidente incremento en la cuantificación del anión superóxido derivado por el tratamiento 26, no se observaron incrementos en la actividad SOD en los conidios expuestos al mismo. Sin embargo, en la investigación realizada por Garza-López *et al.*, (2012), al exponer a *B. bassiana* a una concentración de oxígeno de 26% (misma concentración de O₂ que la utilizada en esta investigación), la actividad SOD fue menor o igual a la actividad del tratamiento control (AN). En dicha investigación, sí se comprobó el estrés oxidante causado por la atmósfera enriquecida, al comprobar el daño en lípidos. Una perspectiva para dilucidar esta aparente paradoja (incremento en la concentración de anión superóxido - no incremento en la actividad SOD), es el estudio a nivel molecular de las distintas enzimas SOD. En una familia de enzimas, hay algunas que están fuertemente implicadas en las lecturas de la actividad total enzimática, mientras que otras sólo se expresan en momentos muy específicos. Por ello, la identificación y estudio de los tipos de enzimas SOD en *I. fumosorosea* son un paso, *sine qua non*, para la explicación de fenómenos como el presentado en este estudio.

7.6. Cuantificación de actividad catalasa

Las catalasas son una familia de enzimas cuya principal función es la descomposición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno. Los resultados obtenidos en la Sección 7.4, sugieren que el tratamiento 26 propició, en los conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea*, un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno. Por lo cual, se determinó estudiar la actividad catalasa total en los conidios de los dos hongos (CNCRB1 y ARSEF 3302).

En el caso de la cepa CNRCB1, se registraron lecturas de actividad catalasa (U µg⁻¹ proteína) de: 16.7 y 31.2 para los tratamientos AN y 26, respectivamente (Fig. 7.16.). Respecto a la cepa ARSEF 3302, la actividad observada en los conidios del tratamiento AN resultó de 8.6 U µg⁻¹ proteína; mientras que la actividad en el tratamiento 26 fue de 30.7 U

μg^{-1} proteína, lo que representa un incremento de 3.5 veces (Fig. 7.16.). En ambos casos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $P < 0.05$) entre los tratamientos. Es oportuno puntualizar que, al comparar la actividad catalasa en el tratamiento 26 en ambas cepas, ésta no presentó diferencias estadísticamente significativas, es decir, la magnitud del aumento de la actividad enzimática fue igual en los conidios de ambos hongos.

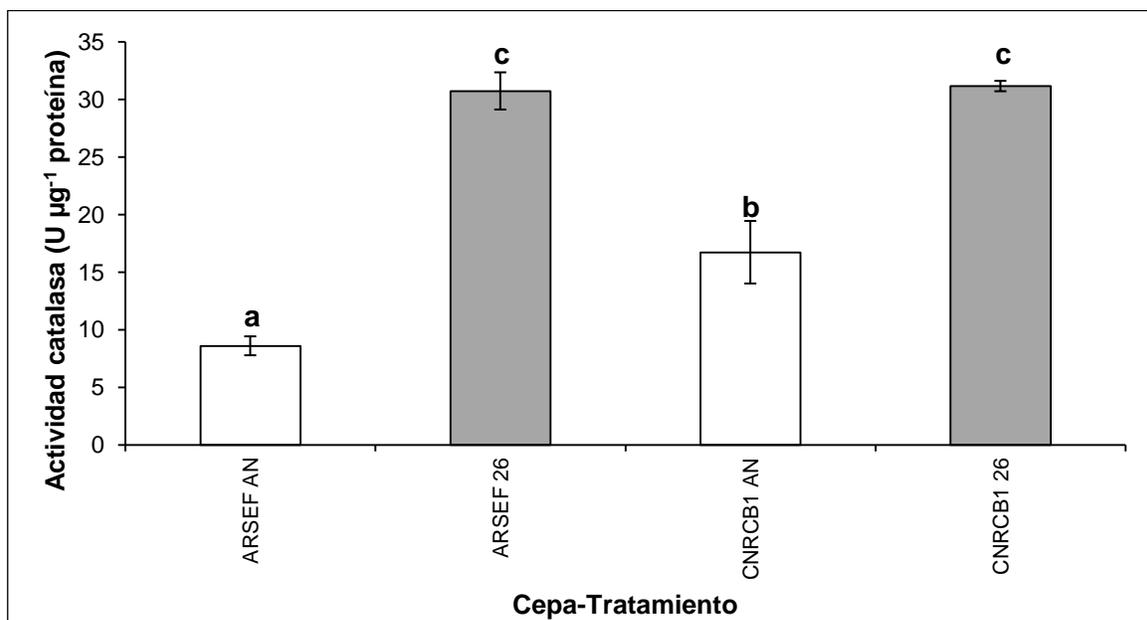


Figura 7.16. Actividad catalasa de los conidios de las cepas de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1, expuestos a una atmósfera normal (AN, barras blancas) y a pulsos de una atmósfera rica en oxígeno (26, barras cerradas). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA, $P < 0.05$).

Como ya se ha establecido, la principal función de la enzima catalasa es la degradación de la especie reactiva H_2O_2 en agua y O_2 . Tal acción tiene relevancia, no sólo para la sobrevivencia del organismo, sino, como es el caso de algunos hongos, también en procesos fisiológicos (como la germinación), además de la infectividad. Por ejemplo, cuando se inhibió la expresión de dos genes codificantes para catalasa (*cat1* y *cat2*) en *Aspergillus fumigatus*, este hongo disminuyó su capacidad infectiva con modelos murinos; algo interesante es que, esta cepa modificada, no fue más sensible al peróxido de hidrógeno comparada con la cepa silvestre (Paris *et al.*, 2003). En otra investigación, se estudió la expresión de un gen de catalasa (*catB*) del hongo fitopatógeno *Magnaporthe grisea*. En ese estudio, se encontró que este gen incrementaba su expresión hasta 600 veces en el momento de la penetración a la planta. La cepa mutante, deficiente en este gen, presentó una pobre esporulación, conidios y

apresorios frágiles y disminuyó su patogenicidad hacia cebada y arroz (Skamnioti *et al.*, 2007).

Recientemente, se han publicado diversas investigaciones en las que se evalúa la importancia de este tipo de enzimas en los hongos entomopatógenos. Morales-Hernández *et al.*, (2007), sobreexpresó el gen *cat1* en *M. anisopliae*, encontrando incrementos en la tasa de germinación e infectividad hacia larvas de *P. xylostella*. Ali *et al.*, (2012) encontraron que, al inducir un aumento en la actividad catalasa total con el compuesto n-octacosano en *B. bassiana*, se reducía el tiempo de germinación de los conidios y se incrementaba su infectividad hacia *P. xylostella*. Recientemente, Wang *et al.*, (2013), estudiaron el papel de cinco genes de catalasa en *B. bassiana*. Cuando inhibieron la expresión de los genes *catA*, *catP* o *catD*, observaron disminución en la infectividad; además, encontraron que estas enzimas estaban ligadas a la tolerancia a altas temperaturas y resistencia a radiación UV-B. Finalmente, Chantasingh *et al.*, (2013), investigaron el efecto de la sobreexpresión del gen *catE7* en *B. bassiana*; los investigadores reportan que esta cepa modificada germinó más rápido, además de presentar una mayor virulencia hacia larvas de *Spodoptera exigua*. Curiosamente, esta cepa no mostró un mayor crecimiento vegetativo en presencia de H₂O₂, comparativamente con la cepa silvestre.

En esta investigación, se encontró una relación similar a la de los reportes descritos. La actividad catalasa en los conidios de las cepas estudiadas, se vio incrementada con el tratamiento 26 y esto puede estar relacionado con el aumento en la calidad de los mismos (termotolerancia, germinación, infectividad). Los siguientes cuestionamientos podrían ser: ¿todas las enzimas catalasa están implicadas en estos fenómenos?; la expresión de los genes de las diferentes enzimas catalasa ¿varía a través del tiempo de cultivo?; la respuesta antioxidante a la atmósfera rica en oxígeno, ¿es inmediata?, ¿o existen tiempos específicos? y, de ser así, ¿cuáles son éstos?. Para intentar responder a estas preguntas, es necesario estudiar, a nivel genético, el efecto del tratamiento 26 en el hongo *I. fumosorosea*.

7.7. Genes de enzima catalasa

Al consultar la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>, 11/08/2013, 17:42 hrs.) no se encontraron secuencias reportadas de los genes de enzima catalasa para *I. fumosorosea*. Por lo que, como una primera instancia, se decidió usar los primers degenerados (Anexo E) reportados por Wang

et al., (2013). De acuerdo a los autores, estos primers se diseñaron a partir de regiones conservadas de secuencias alineadas de los genes de catalasa de otros hongos tomados de la base de datos del GenBank, obteniéndose los resultados que a continuación se describen.

7.7.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En primera instancia, se buscó comprobar el correcto diseño y funcionalidad de los primers degenerados, realizando pruebas de PCR con ADN de la cepa de *B. bassiana* 882.5 debido a que, con este hongo, se logró una correcta amplificación (Wang *et al.*, 2013). En las pruebas de PCR, se consideraron 2 temperaturas de hibridación, 52 y 55°C (Fig. 7.17., A y B respectivamente). De acuerdo a los resultados obtenidos en los dos experimentos, se determinó que los primers para *catB* (carriles 2 y 3 en A y B, respectivamente) no presentaron ninguna amplificación, por lo que se decidió omitir el estudio de este gen para pruebas con *I. fumosorosea*. Respecto a *catP*, se encontró un barrido en el experimento a 52°C (B, carril 6); por esto y por la importancia de este gen respecto a actividad catalasa total e infectividad (Wang *et al.*, 2013), se buscó la amplificación de este gen con un gradiente de temperatura; sin embargo, tampoco se encontró la amplificación del mismo y este gen también fue descartado para el estudio posterior. Los genes que sí presentaron amplificación fueron *catC* y *catD*, tanto a 55°C como a 52°C (A y B, carriles 4 y 5, respectivamente); así como *catA*, con el que se obtuvo un resultado positivo a 52°C (B, carril 2).

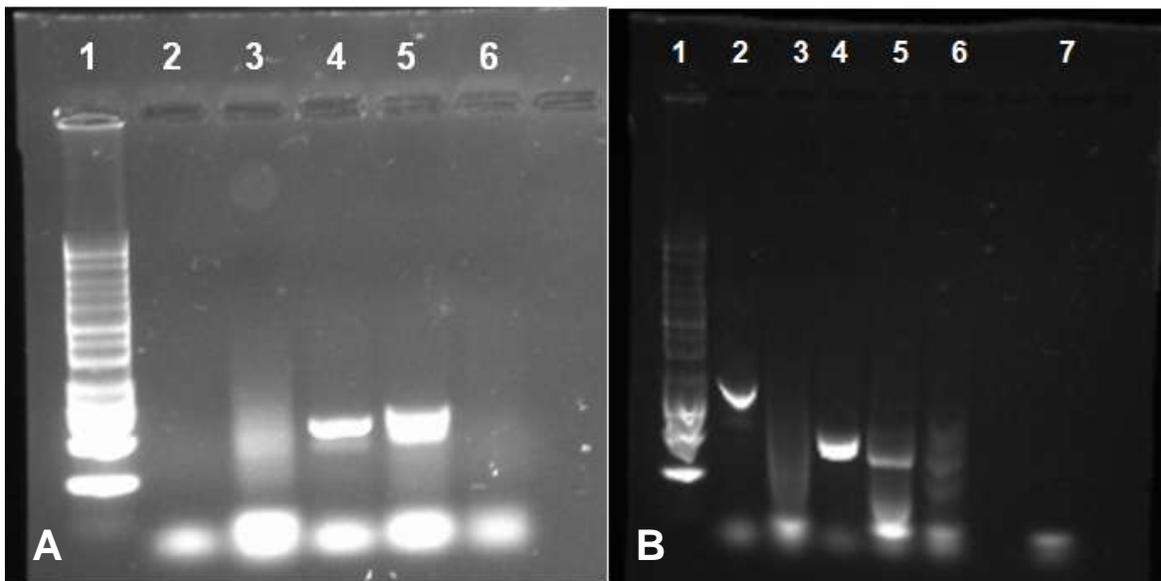


Figura 7.17. Geles de electroforesis de productos de PCR hechos a temperaturas de hibridación de 55°C (A) y 52°C (B) para *B. bassiana*. La distribución carril/muestra es, Imagen A: 1/MPM 1Kb; 2/*catA*; 3/*catB*; 4/*catC*; 5/*catD*; 6/*catP*. Imagen B: 1/MPM 1Kb; 2/*catA*; 3/*catB*; 4/*catC*; 5/*catD*; 6/*catP* y 7/*catD* ctol-. MPM: Marcador de Peso Molecular.

Una vez seleccionados los primers, se realizaron experimentos de PCR con ADN de ambas cepas de *I. fumosorosea*, teniendo como control positivo el ADN de *B. bassiana* 882.5 y como control negativo, agua inyectable. En un primer experimento (Fig. 7.18), a una temperatura de hibridación de 55°C, se observó que en ninguna de las dos cepas de *I. fumosorosea* se encontró amplificación para *catC* (carriles 4 y 5, para CNRCB1 y ARSEF 3302); mientras que en el control positivo de este gen, sí se obtuvo una banda definida (carril 3). En el caso del gen *catD*, sí se encontró amplificación en ambas cepas de *I. fumosorosea* (carriles 8 y 9, para CNRCB1 y ARSEF 3302). El control positivo también presentó la banda correspondiente (carril 7). Ninguno de los controles negativos presentó amplificación (carriles 1 y 6, para *catC* y *catD*).

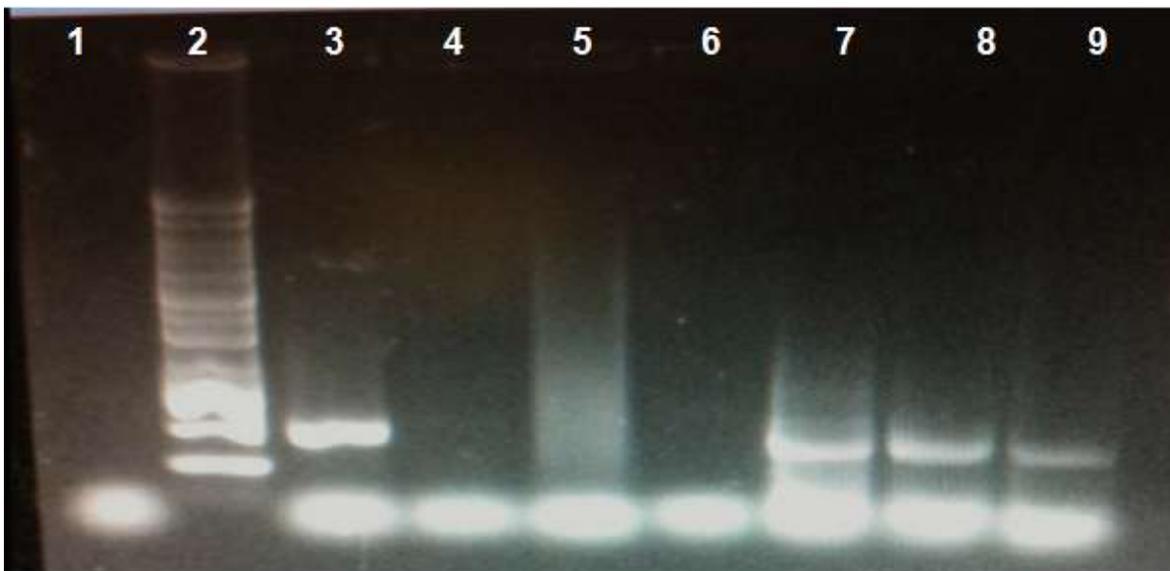


Figura 7.18. Gel de electroforesis de productos de PCR hecho a una temperatura de hibridación de 55°C. La distribución carril/muestra, es: 1/*catC* ctol -; 2/MPM 1 Kb; 3/*catC* *B.b.* ctol +; 4/*catC* CNRCB1; 5/*catC* ARSEF; 6/*catD* ctol -; 7/*catD* *B.b.* ctol +; 8/*catD* CNRCB1/ 9/*catD* ARSEF.

En el siguiente experimento (Fig. 7.19.), se buscó la amplificación de *catA* en *I. fumosorosea*. La temperatura de hibridación usada en este PCR fue de 52°C; en este experimento se volvió a intentar encontrar amplificación para *catC*, ahora con una temperatura diferente. En el caso de *catA*, no se observó una amplificación para la cepa *I. fumosorosea* ARSEF 3302, aunque sí para CNRCB1 (carriles 4 y 5 respectivamente). En esta ocasión, el control positivo no presentó una banda (carril 3), así como tampoco se observó en el control negativo (carril 1). En este caso, se decidió repetir el experimento para confirmar los resultados encontrados con *catA*. Respecto a *catC*, tampoco fue posible encontrar amplificación en ninguna de las

cepas de *I. fumosorosea* (carril 8 y 9, para CNRCB1 y ARSEF 3302). A partir de estos resultados, se determinó que el gen *catC*, no podría ser estudiado en *I. fumosorosea* para la siguiente etapa experimental.

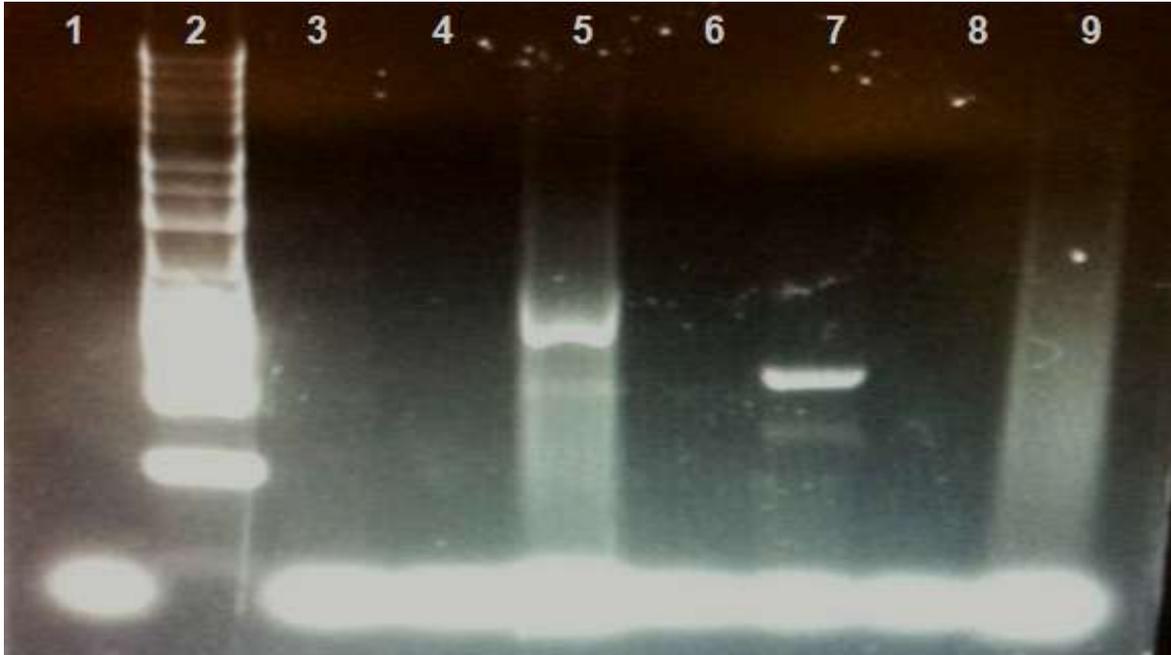


Figura 7.19. Gel de electroforesis de productos de PCR hecho a una temperatura de hibridación de 52°C. La distribución carril/muestra, es: 1/*catA* ctol -; 2/MPM 1 Kb; 3/*catA* *B.b.* ctol +; 4/*catA* ARSEF; 5/*catA* CNRCB1; 6/*catC* ctol -; 7/*catC* ctol +; 8/*catC* ARSEF; 9/*catC* CNRCB1.

Antes del siguiente experimento, se volvió a extraer ADN de ambas cepas de *I. fumosorosea* y *B. bassiana* 882.5, para asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Una vez hecho esto, se realizó un PCR con los dos genes con los que se había encontrado una amplificación (*catA* y *catD*), utilizando las respectivas temperaturas de hibridación (52 y 55°C). En el caso de *catA*, se encontró una banda de amplificación para *I. fumosorosea* CNRCB1 y para el control positivo (Fig. 7.20., carriles 2 y 4 respectivamente). En el caso de *catD*, se encontró amplificación en el control positivo, CNRCB1 y ARSEF 3302 (carriles 6, 7 y 8 respectivamente). En este experimento, se encontró una amplificación en el control negativo (carril 9), por lo que se repitió el PCR para *catD* exclusivamente; mientras que los productos de PCR para *catA* se almacenaron para posteriormente purificarlos y secuenciarlos.



Figura 7.20. Gel de electroforesis de productos de PCR hechos a una temperatura de hibridación de 52°C (carriles 1-4) y 55°C (carriles 6-9). La distribución carril/muestra, es: 1/*catA* ctol -; 2/*catA* CNRCB1; 3/*catA* ARSEF; 4/*catA* ctol +; 5/MPM 1 Kb; 6/*catD* ctol +; 7/*catD* CNRCB1; 8/*catD* ARSEF y 9/*catD* ctol -.

En la repetición de PCR para *catD*, se observaron amplificaciones para el control positivo, CNRCB1 y ARSEF 3302 (Fig. 7.21.A, carriles 2, 3 y 4 respectivamente); en este experimento, ya no se encontró la amplificación del control negativo (carril 1), por lo que estos productos de PCR se purificaron y secuenciaron. La figura 7.21.B, muestra el gel de electroforesis de los productos de PCR purificados de *catD* para CNRCB1, ARSEF 3302 y control + (carriles 1,2 y 4 respectivamente) y de *catA* para CNRCB1 (carril 5).

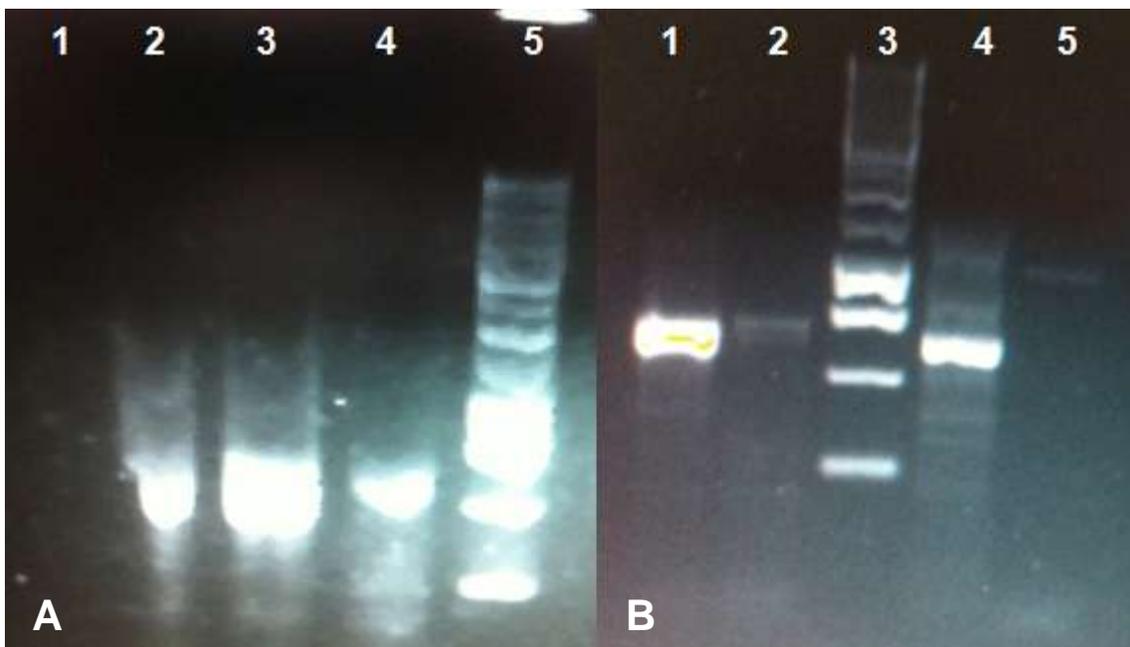


Figura 7.21. A: Gel de electroforesis de productos de PCR hecho a una temperatura de 55°C para buscar amplificación del gen *catD*. La distribución carril/muestra, es: 1/*catD* ctol -; 2/*catD* B.b. ctol +; 3/*catD* CNRCB1; 4/*catD* ARSEF y 5/MPM 1 Kb. B: Gel de electroforesis de los productos de PCR purificados para su posterior secuenciación, la distribución carril/muestra, es: 1/*catD* CNRCB1; 2/*catD* ARSEF; 3/MPM 1 Kb; 4/*catD* B.b. ctol +; 5/*catA* CNRCB1.

Los primers degenerados permitieron la amplificación de dos fragmentos supuestos genes que codifican para enzima catalasa en *I. fumosorosea* (*catA* y *catD*). Se utilizó la cepa *B. bassiana* 882.5 para evaluar la funcionalidad de los primers degenerados y servir así como un control positivo en este experimento. El gen *catP* no pudo ser amplificado con estos primers, ni siquiera con *B. bassiana*, lo cual puede deberse a que las temperaturas de hibridación no fueron las adecuadas o en un error en el diseño de los primers. El gen *catC* sí logró amplificarse en *B. bassiana* pero no en *I. fumosorosea*. De acuerdo al artículo de Wang *et al.*, (2013), esta es sólo una subunidad y su silenciamiento, en *B. bassiana*, únicamente tuvo repercusión en una mayor sensibilidad a H₂O₂. De acuerdo al artículo citado, *catA* es una catalasa específica en esporas y tiene influencia en la resistencia a radiación UV-B y en la infectividad. Mientras que *catD*, es una enzima que es secretada y tiene participación en los mismos eventos que *catA* (UV-B e infectividad).

Al no estar disponibles aún las secuencias de los genes de catalasa de *I. fumosorosea*, el uso de primers degenerados para buscar las secuencias, aún parciales, de los mismos resultó adecuado. Sin duda, la secuencia completa de los genes de dichas enzimas es lo apropiado para el estudio de su expresión en los experimentos que así lo requieran; sin

embargo, en el caso de esta investigación, se determinó que este estudio podría ser válido aún no contando con ésta y, a partir de la secuenciación parcial y la búsqueda de homología de la misma, poder continuar con el estudio de estos genes en *I. fumosorosea*.

7.7.2. Secuenciación e identificación de los genes amplificados

Una vez purificados los productos de PCR en los que se comprobó que había amplificación en *I. fumosorosea*, se determinó la secuencia de los amplicones. Estas secuencias (Anexo I) se ingresaron al *Basic Local Alignment Searching Tool* (BLAST) de la página electrónica del NCBI, para buscar homologías con secuencias de genes ya reportadas. En el caso de *catA* (forward), el resultado de la búsqueda fue de un 85% de identidad con el gen catalasa A de *B. bassiana*; 79% de homología con el gen catalasa 1 de *Magnaporthe oryzae* y un 77% de homología con el gen catalasa 1 de *Thielavia terrestris* (Fig. 7.22.).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Beauveria bassiana catalase A (catA) gene, complete cds	828	828	81%	0.0	85%	JX050138.1
Magnaporthe oryzae 70-15 catalase-1 (MGG_10061) mRNA, complete cds	510	510	76%	8e-141	79%	XM_003717387.1
Thielavia terrestris NRRL 8126 catalase (cat1) mRNA, complete cds	460	460	85%	9e-126	77%	XM_003654947.1

Figura 7.22. Resultados de la búsqueda de homologías de la secuencia obtenida del producto de PCR de *catA* (forward) de *I. fumosorosea* CNRCB1, en el BLAST de nucleótidos de la página del NCBI.

En el caso de *catD* (forward), se encontró una homología del 88% con el gen peroxidasa/catalasa 2 de *Cordyceps militaris*; del 80% con el gen catalasa P de *B. bassiana* y de 79% con el gen catalasa-peroxidasa 2 de *Aspergillus clavatus* (Fig. 7.23.).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cordyceps militaris CMO1 peroxidase/catalase 2 (CCM_09023) partial mRNA	344	344	30%	9e-91	88%	XM_006674158.1
Beauveria bassiana catalase P (catP) gene, complete cds	342	342	51%	3e-90	80%	J0250140.1
Aspergillus clavatus NRRL 1 bifunctional catalase-peroxidase Cat2 (ACLA_044200) partial mRNA	134	134	21%	2e-27	79%	XM_001275125.1

Figura 7.23. Resultados de la búsqueda de homologías de la secuencia obtenida del producto de PCR de *catD* (forward) de *I. fumosorosea* CNRCB1, en el BLAST de nucleótidos de la página del NCBI.

Llamó la atención que una de las homologías más altas fue con el gen de catalasa P de *B. bassiana*, siendo este el gen reportado por Wang *et al.*, (2013); sin embargo, la amplificación se hizo con los primers degenerados para amplificación de *catD*. Para verificar este resultado, se ingresó la secuencia obtenida de *catD* en *B. bassiana* 882.5 (control positivo). La homología más alta en este caso fue de 93% para el gen de catalasa P de *B. bassiana* (Fig. 7.24.). Esto confirmó que el resultado obtenido con *I. fumosorosea* CNRCB1 fue correcto y lo que podría justificar esta incongruencia es un posible error al registrar las secuencias en la base de datos del NCBI por parte de los autores, o un error en el reporte de los primers degenerados en el material extra del artículo.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [Graphics](#) [Reset view of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Beauveria bassiana catalase P (catP) gene, complete cds	832	832	51%	0.0	93%	JX050140.1
Cordyceps militaris CM1 peroxidase:catalase 2 (OCM_09023), partial mRNA	451	451	27%	6e-123	93%	XM_009674158.1
Aspergillus fumigatus A293 bifunctional catalase-peroxidase Cat2 (AFUA_8G01670), partial mRNA	211	211	18%	1e-50	86%	XM_741946.1

Figura 7.24. Resultados de la búsqueda de homologías de la secuencia obtenida del producto de PCR de *catD* (forward) de *B. bassiana* 882.5, en el BLAST de nucleótidos de la página del NCBI.

Los resultados encontrados permiten establecer que las secuencias obtenidas de *catA* y *catD*, en *I. fumosorosea*, tienen altas homologías con genes ya reportados de la enzima antioxidante catalasa en otros hongos y, por tanto, es posible que estas secuencias sean parte de los genes, aún no reportados, de las enzimas catalasa de este hongo. A partir de esto, se propone un experimento de PCR en tiempo real para examinar la expresión de estos genes a través del tiempo cuando el hongo es expuesto al tratamiento 26 y determinar de esta forma una respuesta más específica del hongo a la atmósfera enriquecida.

8. CONCLUSIONES

Los pulsos atmosféricos con una concentración rica en oxígeno (26%) propiciaron:

- Diferentes efectos en la infectividad de los hongos entomopatógenos. Se incrementó en el caso de ambas cepas de *I. fumosorosea*.
- Efectos variables respecto a la calidad de los conidios. Para las dos cepas de *I. fumosorosea*, se observó un efecto favorable en casi todas las pruebas.
- Un incremento en el grado general de estrés oxidante y en la concentración del anión superóxido en los conidios de las dos cepas de *I. fumosorosea*.
- Un efecto variable respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes en ambas cepas de *I. fumosorosea*. La enzima superóxido dismutasa no se incrementó; mientras que la actividad catalasa aumentó.

El poliol manitol y el disacárido trehalosa, no pueden considerarse como una explicación respecto al incremento en la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos.

Fue posible encontrar las secuencias parciales de dos genes (*catA* y *catP*) que codifican para enzimas catalasa en *I. fumosorosea*.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto de la atmósfera enriquecida en los conidios de hongos entomopatógenos, en un tercer factor abiótico de importancia como es la radiación UV-B.
- Estudiar si el incremento de la infectividad en las dos cepas de *I. fumosorosea*, es reproducible en insectos plaga de mayor importancia agrícola.
- Estudios de efectividad de los conidios expuestos a la atmósfera enriquecida a nivel campo.
- Estudio en hongos entomopatógenos, de la participación de las especies reactivas del oxígeno como señalizadores celulares en condiciones de estrés.
- Estudio para comprobar el posible estrés oxidante en conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea*.
- Secuenciación completa de los dos genes de catalasa (*catA* y *catP*) en *I. fumosorosea* y análisis de la expresión de estos genes a través del tiempo de cultivo en los dos tratamientos atmosféricos estudiados (AN y 26).
- Encontrar otros tipos de enzimas catalasa en *I. fumosorosea* y su participación en resistencia a estrés y en proceso infectivo.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13:111–118.
- Alaidroos K, Roberts DW. 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 20:211-219.
- Ali S, Wang ZQ, Ren SX, Huang Z. 2011. Superoxide dismutase production by *Isaria fumosorosea* on metals and its role in stress tolerance and fungal virulence. *Biocontrol Science and Technology* 21:1457-1469.
- Ali S, Xia J, Ren S, Huang Z. 2012. Catalase production influences germination, stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana* conidia. *Pakistan J Zool.* 44:537-544.
- Altre JA, Vandenberg JD, Cantone FA. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J Invertebr Pathol* 73:332-338.
- Ángel-Cuapio RA. 2011. Producción de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa.
- Arredondo-Bernal HC. 2013. Publicación del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Colima, México.
- Barrera JF. 2007. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: Teoría y aplicación del control biológico. L.A. Rodríguez del Bosque y H.C. Arredondo Bernal (eds.). Sociedad Mexicana de Control Biológico. Capítulo 1. 2 p.
- Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245–313.
- Blanford S, Thomas MB. 2000. Thermal behavior of two acridid species: effect of habitat and season on body temperature and the potential impact on biocontrol with pathogens. *Environ Entomol.* 29:1060–1069.

- BLAST, NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (consultado el 10 de Diciembre de 2013, 14:10 hrs).
- Blumenthal HJ. 1976. Reserve carbohydrates in fungi. In: J.E. Smith and D.R. Berry (ed.). *The filamentous fungi*, vol. 2. Halsted Press, Inc., New York. 292-307 pp.
- Bradford M. 1976. A quick and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Braga GUL, Rangel DEN, Flint SD, Anderson AJ, Roberts DW. 2006. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem Photobiol* 82:418-422.
- Braga GU, Destefano RH, Messias CL. 1999. Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74:112–119.
- Brownbridge M, Costa S, Jaronski ST. 2001. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 77:280-283.
- Bussink HJ, Oliver R. 2001. Identification of two divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. *Eur J Biochem* 268:15-24.
- Calmes B, Guillemette T, Teyssier L, Siegler B, Pigné S, Landreau A, Iacomini B, Lemoine R, Richomme P, Simoneau P. 2013. Role of mannitol in the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Front Plant Sci* doi: 10.3389/fpls.2013.00131.
- Cárdenas-Rodríguez N, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J. 2008. Glutathión peroxidasas: Una familia de enzimas. En: *Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas*. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 13. 201-217 pp.
- Carpenter JF, Crowe JH. 1988. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiology* 25:459-470.

- Chagas RF, Bailão AM, Pereira M, Winters MS, Smullian AG, Deepe GS, de Almeida Soares CM. 2008 The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: protein activity and transcript analysis. *Fungal Genet Biol* 45:1470–1478.
- Chandler D, Bailey AS, Tatchell GM, Davidson G, Greaves J, Grant WP. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Phil Trans R Soc* 366:1987-1998.
- Chantasingh D, Kitikhun S, Keyhani NO, Boonyapakron K, Thoetkiattikul H, Pootanakit K, Eurwilaichitr L. 2013. Identification of catalase as an early up-regulated gene in *Beauveria bassiana* and its role in entomopathogenic fungal virulence. *Biological Control* 67:85-93.
- Chapman RF. 1998. *The insects: structure and function*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Charnley AK. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. In: JM Anderson, ADM Rayner & DWH Walton (Eds.). *Invertebrate-Microbial Interactions*. Cambridge. Cambridge University Press. 229-270 pp.
- Chowdhury S, Smith KW, Gustin MC. 1992. Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* 118:561-571.
- Clarkson JM, Charnley AK. 1996. New insights into the mechanisms of fungal insect pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* 4:197-203.
- Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, López-Reyes A, Domínguez-Pérez M, Nuño N, Domínguez-Meraz M, Bucio L, Souza V, Factor VM, Thorgeirsson S, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE. 2013. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie*. 95:1177-1184.
- Colaco CS, Sen S, Thangavelu M, Pinder S, Roser B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/Technology* 10:1007-1011.
- Colaco CALS, Smith CJS, Sen S, Roser DH, Newman Y, Ring S, Roser BJ. 1994. Chemistry of protein stabilization by trehalose. In: *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*, J.L. Cleland and R. Langer (eds.). Washington D.C.: American Chemical Society. 222-240 pp.

- Cooney DG, Emerson R. 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W.H. Freeman, San Francisco, London 188 pp.
- Coote PJ, Cole MB, Jones MV. 1991. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *Journal of General Microbiology* 137:1701-1708.
- Cornell University
<http://psep.cce.cornell.edu/Tutorials/core-tutorial/module04/index.aspx>
(Consultado 11/03/2014, 7:44 am)
- da Costa MS, Santos H, Galinski EA. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 61:117-153.
- Craig EA, Gross CA. 1991. Is HSP70 the cellular thermometer. *Trends in Biochemical Sciences* 16:135-140.
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. 1992. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10405–10409.
- Crisan EV. 1973. Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia* 65:1171–1198.
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701-703.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Wistrom CA, Spargo BJ, Anchordoguy TJ. 1988. Interaction of sugars with membranes. *Biochim Biophys* 947:367-384.
- Dawkar W, Chikate YR, Lomate PR, Dholakia BB, Gupta VS, Giri AP. 2013. Molecular insights into resistance mechanisms of lepidopteran insect pests against toxicants. *Journal of Proteome Research* 12:4727-4737.
- Debach P, Rosen D. 1991. Biological Control Ecology. In: *Biological Control by Natural Enemies*. Cambridge University Press. E.U.A. Capítulo 3. 103 p.

- De Virgilio C, Hottiger T, Dominguez J, Boller T, Wiemken A. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem*, 219:179–186.
- Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta J, Tyryshkin A. 2001. The origin of the atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2170-2175.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95.
- Dziadkowiec D, Krasowska A, Liebner A, Sigler K. 2007. Protective role of mitochondrial superoxide dismutase against high osmolarity, heat and metalloid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* 52:120–126.
- Elbein AD. 1974. The metabolism of α,α -trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 30:227-256.
- Eleutherio ECA, Araujo PS, Panek AD. 1993. Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*, 30:591–596.
- Erdei E, Molnár M, Gyémánt G, Antal K, Emri T, Pócsi I, Nagy J. 2011. Trehalose overproduction affects the stress tolerance of *Kluyveromyces marxianus* ambiguously. *Bioresource Technology* 102:7232-7235.
- EPA, 2014.
<http://www.epa.gov/pesticides/health/human.htm>
(Consultado 22/05/2014, 7:55 am).
- Fang W, Pava-Ripoll M, Wang S, St Leger R. 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol* 46:277–285.
- de Faria MR, Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237-256.
- FAO, 2004.
<http://www.fao.org/newsroom/ES/news/2004/50119/index.html>

(consultado 11/03/2014, 10:07 am).

- FAO (2010)

<http://www.fao.org/news/story/en/item/48883/icode/>

(Consultado 21/02/2014, 10:22 am).

- FAO (2013)

<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/code/en/>

(Consultado 20/02/2014, 9:47 am).

- FAO (2014)

<http://www.fao.org/agriculture/crops/obsolete-pesticides/prevention-and-disposal-of-obsolete-pesticides/en/>

(Consultado 21/02/2014, 9:40 am).

- Ferron P. 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi-Imperfecti-Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera Bruchidae). *Entomophaga* 22:393-396.

- Fillinger S, Chaveroche MK, van Dijck P, de Vries R, Ruijter G, Thevelein J, d'Enfert C. 2001. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 147:1851-1862.

- Finkel T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10: 248–253.

- Finkel T. 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15:247-254.

- Flint M. 2010. Parkinson's disease: a model dilemma. *Nature* 466:S8-S10.

- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442-446.

- Gao L, Liu XZ. 2010. Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiology* 79:612-619.

- Garza-López PM, Konigsberg M, Gomez-Quiroz LE, Loera O. 2012. Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World J Microbiol Biotechnol* 28:353-359.

- Garza-López M. 2012. Análisis de la relación entre el estrés oxidativo y la infectividad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Tesis de Doctorado. UAM Iztapalapa.

- Gómez-Quiroz LE, Cuevas-Bahena DB. 2008. Superóxido Dismutasa. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 11. 169-182 pp.
- Gornova IB, Feofilova EP, Tereshina VM, Golovina EA, Krotkova NB, Kholodova VP. 1992. Effect of carbohydrate content of *Aspergillus japonicus* spores on their survival in storage and subsequent germination. *Mikrobiologiya* 61:549-554.
- Gottlieb D. 1978. The germination of fungus spores. Durham: Meadowfield Press.
- Greathead D, Waage J. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11. 44 p.
- Hallsworth JE, Magan N. 1994a. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology* 140:2705-2713.
- Hallsworth JE, Magan N. 1994b. Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. In: Brighton Crop Protection Conference –Pest and Diseases. British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom. 1091-1096 pp.
- Hallsworth JE, Magan N. 1995. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology-SGM* 141:1109-1115.
- Hallsworth J, Magan, N. 1997. A rapid HPLC protocol for detection of polyols and trehalose. *J. Microbiol. Methods.* 29:7-13.
- Hallsworth JE, Magan N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J Invertebr Pathol* 74: 261–266.
- Hansberg-Torres W. 2008. El dioxígeno y sus especies reactivas. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 2. 25-46 pp.
- Hassan AEM, Dillon RJ, Charnley AK. 1989. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol* 54:277–279.

- Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* 95:641-655.
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336:348-350.
- Hernández-Velázquez VM, Berlanga-Padilla AM. 1999a. Control microbial de mosca pinta *Aeneolamia* spp. con *Metarhizium anisopliae*. Ficha técnica CB-08. SAGARPA.
- Hernández-Velázquez VM, Berlanga-Padilla AM. 1999b. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial. Ficha CB-03. SAGARPA.
- Hoffmann MP, Frodsham AC. 1993. *Natural enemies of vegetable insect pests*. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63 pp.
- Hohmann S, Magan WH. 2003a. What is stress?. In: *Yeast stress responses*, S. Hohmann and W.H. Mager (eds.). Saladruck, Germany: Springer-Verlag. 1-9 pp.
- Hohmann S, Mager WH. 2003b. Studies of stress responses, in *Yeast Stress Responses*, ed. by Hohmann S and Magan WH. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 4.
- Holder DJ, Keyhani NO. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrates . *Appl Environ Microbiol* 71:5260-5266.
- Hottiger T, Boller T, Wiemken A. 1987. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett*, 220:113–115.
- Hottiger T, Virgilio C, Hall M, Boller T, Wiemken A. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. *Eur. J. Biochem.* 219:187-193.
- Hwang CS, Baek YU, Yim HS, Kang SO. 2003. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* 20:929–941.

- Ibrahim L, Butt MT, Jenkinson P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Mycol Res 106:705–715.
- Ignoffo CM, McIntosh AH, Garcia C, Kroha M, Johnson JM. 1982. Effects of successive in vitro and in vivo passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Entomophaga 27:371–378.
- Ignoffo CM, Garcia C. 1992. Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. Environ Entomol 21:913-917.
- Inglis CD, Johnson DL, Goettel MS. 1997. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: *Symptodulosporae*) of grasshoppers under field conditions. Biol Control. 26:400–409.
- Jabbour R, Crowder DW, Aultman EA, Snyder WE. 2011. Entomopathogen biodiversity increases host mortality. Biol Control 59:277–283.
- Jaronski ST. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. BioControl 55:159-185.
- Jenkins NE, Grzywacz D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of products performance. Biocontrol Science and Technology, 10:753-777.
- Jeong JH, Kwon ES, Roe JH. 2001.Characterization of the manganese containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem Biophys Res Commun 283:908–914.
- Kamp AM, Bidochka MJ. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Letters in Applied Microbiology 35:74-77.
- Kapoor M, Sveenivasan GM. 1988. The heat shock response of *Neurospora crassa*: stress-induced thermotolerance in relation to peroxidase and superoxide dismutase levels. Biochem Biophys Res Commun. 156:1097–1102.
- Kawasaki L, Aguirre J. 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology 183:1434-1440.

- Kershaw MJ, Moorehouse ER, Bateman R, Reynolds SE, Charnley AK. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. *J Invertebr Pathol* 74:213-223.
- Kim JS, Kassa A, Skinner M, Hata T, Parker BL. 2011. Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:697-704.
- Krassiltschik IM. 1888. La production industrielle des parasites vegetaux pour la destruction des insectes nuisibles. *Bull Sci France et Belg* 19:461–472.
- Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. 2011. Methods in molecular biology and genetic engineering. In: J. Brunstein (ed.). *Lewin's Genes X*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA. 42-78 pp.
- Kurz M. 2008. Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. *Saline Systems* doi:10.1186/1746-1448-4-6.
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI. 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO Journal* 22:2623-2633.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vails P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?. *Biological Control* 21:230-248.
- Lambeth JD. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol* 4:181–189.
- Lee WH. 1967. Carbon balance of mannitol fermentation and the biosynthetic pathway. *Applied Microbiology* 15:1206-1210.
- Lewis JG, Learmonth RP, Watson K. 1995. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 141:687–694.
- Li ZZ. 1988. List on the insects of *Beauveria bassiana*. In: *Study and application of entomogenous fungi in China*, Vol. 1. Beijing: Academic Periodical Press. 241-255 pp.

- Liao X, Lu HL, Fang W, St. Leger RJ. 2014. Overexpression of a *Metarhizium robertsii* HSP25 gene increases thermotolerance and survival in soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:777-783.
- Liu Q, Ying SH, Feng MG, Jiang XH. 2009. Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:65-75.
- Liu SY, Peng GX, Xia YX. 2012. The adenylate cyclase gene MaAC is required for virulence and multi-stress tolerance of *Metarhizium acridum*. *BMC Microbiol* 12:163.
- Lledías F, Rangel P, Hansberg W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 273:10630-10637.
- Lopes RB, Martins I, Souza DA, Faria M. 2013. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal of Invertebrate Pathology* 112:236-242.
- Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Samson RA. 2004. The Polyphyletic Nature of *Paecilomyces* Sensu Lato Based on 18S-generated rDNA Phylogeny. *Mycologia* 96:773-780.
- Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Manoch L, Samson RA. 2005. On the Relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research*. 109:581-589.
- Macias AF, Díaz MP, Ramos-López MA, Navarro SR, Espinosa GR, Ruiz DJ. 2013. Study of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* as microbiological control of the white fly *Bemisia tabaci*. *Interciencia* 38:523-527.
- Mackenzie KF, Singh KK, Brown AD. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeast: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 134:1661-1666.
- Magan N. 1997. Fungi in extreme environments. In "The Mycota IV, Environmental and Microbial Relationships" (D.T. Wicklow and B. Soderstrom, Eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Mager WH, Moradas-Ferreira P. 1993. Stress response in yeast. *Biochem J* 290:1-13.
- Mager WH, Varela JCS. 1993. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 10:253-258.

- Mager WH, de Kruijff AJJ. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev*, 59:506–531.
- Maldonado-Blanco MG, Gallegos-Sandoval JL, Fernandez-Pena G, Sandoval-Coronado CF, Elias-Santos M. 2014. Effect of cultura medium on the production and virulence of submerged spores of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against larvae and adults of *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Biocontrol Science and Technology* 24:180-189.
- Margulis L. 1970. *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, New Haven and London. 102-142 pp.
- Mascarin GM, Alves SB, Lopes RB. 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:753-761.
- Mascarin GM, Kobori NN, Quintela ED, Delalibera I. 2013. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control* 66:209-218.
- McBride MJ, Ensign JC. 1987. Effect of intracelular trehalose content on *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 169:4995-5001.
- McCoy CW, Samson RA, Boucias DG. 1988. Entomopatogenous Protozoa and Fungi. In: Ignoffo CM (ed). *CRC Handbook of Natural Pesticides*, Volumen 5, Parte A. CRC Press, Boca Raton.
- Mensonides FI, Brul S, Klis FM, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ. 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 Microbiol*, 71:4531–4538.
- Milner RJ, Huppertz RJ, Swaris SC. 1991. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *J Invertebr Pathol* 57:121-123.
- Miranda-Hernández JF. 2010. Influencia del incremento de O₂ en la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.

- Miranda-Hernández JF, Alatorre-Rosas R, Saucedo Castañeda G, 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* 70:661-666.
- Mitchel REJ, Morrison DP. 1982. Heat-shock induction of ionizing radiation resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, and correlation with stationary phase growth phase. *Radiat Res.* 90:284–291.
- Montesinos-Matías R, Viniegra-González G, Alatorre-Rosas R, Gallardo-Escamilla F, Loera O. 2011. Variación de fenotipos de crecimiento y de virulencia en cepas mutantes de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Resistentes a 2-desoxi-D-glucosa. *Agrociencia* 45:929-942.
- Morales-Hernández CE, Padilla Guerrero IE, Gonzalez-Hernández GA, Salazar Solis E, Torres Guzman JC. 2010. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87:1033–1044.
- Morimoto RI. 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259:1409–1410.
- Morrow BJ, Boucias DG, Heath M A. 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, after serial in vitro passage. *J. Econ. Entomol.* 82:404–407.
- Narasipura SD, Chaturvedi V, Chaturvedi S. 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol Microbiol* 55:1782–1800.
- Nathues E, Joshi S, Tenberge KB, von den Driesch M, Oeser B, Baumer N, Mihlan M, Tudzynski P. 2004. CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:383-393.
- NCBI Genome: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11740> (consultado el 22 de Enero de 2014, 17:10 hrs).

- NCSU (2014)
<http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/text18/pestintro.html>
(Consultado 20/02/2014, 10:15 am).
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:548–572.
- Normile D. 2013. Vietnam turns back a 'Tsunami of Pesticides'. *Science* 341:737-738.
- Noventa-Jordao MA, Couto RM, Goldman MHS, Aguirre J, Iyer S, Caplan A, Terenzi, HF, Goldman GH. 1999. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology*, 145:3229–3234.
- Nuñez-Gaona O, Saucedo-Castañeda G, Alatorre-Rosas R, Loera O. 2010. Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:771-777.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 71:5544-5550.
- Oerke EC, Dehne HW, Schoenbeck F, Weber A. 1994. Crop production and crop protection: estimated losses in major and cash crops. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Science Publishers B.V.
- Oerke EC. 2006. Crop losses to pest. *Journal of Agricultural Science*. 144:31-43.
- OligoArchitect, SIGMA-ALDRICH.
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/probe-design-services.html>
- Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO, Quesada-Moraga E. 2013. Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 23:1199-1212.
- Ouedraogo RM, Cusson M, Goettel MS, Brodeur J. 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *J Invertebr Pathol*. 82:103–109.

- Owusu-Ansah E, Yavari A, Banerjee U. 2008. A protocol for *in vivo* detection of reactive oxygen species. *Nature (Protocol Exchange)*. doi: 10.1038/nprot.2008.23.
- Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latgé JP. 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*. 71:3551-3562.
- Pedrini N, Juárez MP, Crespo R, de Alaniz MJT. Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. *Mycologia* 98:528-534.
- Pfyffer GE, Rast DM. 1980. The polyol pattern of fungi as influenced by the carbohydrate source. *New Phytol* 109:121-126.
- Phipper PW. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 11:339-356.
- Pretty J. 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Phil Trans R Soc B* 363:447–465. (doi:10.1098/rstb.2007.2163).
- Qiu J, Song F, Qiu Y, Li X, Guan X. 2013. Optimization of the medium composition of a biphasic production system for mycelial growth and spore production of *Aschersonia placenta* using response surface methodology. *Journal of Invertebrate Pathology* 112:108-115.
- Rangel DEN, Braga GUL, Anderson AJ, Roberts DW. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J Invertebr Pathol* 88:116–125.
- Rangel DEN, Roberts DW. 2007. Inducing u.v.-B tolerance of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* conidia results in a trade-off between conidial production and conidial stress tolerance. *J Anhui Agric* 34:195-202.
- Rangel DEN, Anderson AJ, Roberts DW. 2008a. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol Res* 112:1362–1372.
- Rangel DEN, Alston DG, Roberts DW. 2008b. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelia growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and

virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*. 112:1355-1361.

- Rangel DEN. 2011. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World J Microbiol Biotechnol*. 27:1281-1296.

- Rhee SG. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31: 53–59.

- Roberts DW, Campbell AS. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. *Misc Publ Entomol Soc Am* 10:19-76.

- Roberts DW, Humber RA. 1981. Entomogenous fungi. In: G.T. Cole & B. Kendrick (Eds.), *Biology of Conidial Fungi*, Vol. 2. New York: Academic Press. pp. 201-236.

- Robledo-Monterrubio M, Alatorre-Rosas R, Viniegra-González G, Loera O. 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *J Invertebr Pathol* 101: 222-227.

- Rodriguez R, Redman R. 2005. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3175-3176.

- Rodríguez-Gómez D, Loera O, Saucedo-Castañeda G, Viniegra-Gonzalez G. 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 3:513-518.

- Ruijter GJG, Bax M, Patel H, Flitter SJ, van de Vondervoort PJI, de Vries RP, van Kuyk PA, Visser J. 2003. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic Cell*. 2:690-698.

- Ruis H, Schüller C. 1995. Stress signaling in yeast. *BioEssays* 17:959-965.

- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasoulilian GR, Bandani AR, Butt TM. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence off the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol Lett* 270:116–123.

- Salmeron-Santiago KG, Pardo JP, Flores-Herrera O, Mendoza-Hernandez G, Miranda-Arango M, Guerra-Sanchez G. 2011. Response to osmotic stress and temperature of the fungus *Ustilago maydis*. Archives of Microbiology 193:701-709.
- Samuels KDZ, Heale JB, Llewellyn M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. J Invertebr Pathol 53:25-31.
- Sarafian TA, Bredesen DE. 1994. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species. Free Radical Research 21:1-8.
- Scherer M, Wei H, Liese R, Fischer R. 2002. *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. Eukaryot Cell 1: 725–735.
- Schmid-Hempel P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50:529–551.
- Schaerffenberg B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. J. Insect Pathol. 6:8–20.
- SENASICA. 2009. Reporte Interno.
- Setlow B, Setlow P. 1995. Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. Applied and Environmental Microbiology 64:4109–4112.
- Setlow B, Setlow P. 1998. Heat killing of *Bacillus subtilis* spores in water is not due to oxidative damage. Applied and Environmental Microbiology 64:4109–4112.
- Singer MA, Lindquist S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. Molecular Cell 1:639-648.
- Skamnioti P, Henderson C, Zhang Z, Robinson Z, Gurr SJ. 2007. A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions 20:568-580.
- Slater AFG, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelen DJ, Orrenius S. 1995. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. Toxicology Letters 82-3:149-153.

- Smith P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information* 14:71N-78N.
- Stauderman K, Avery P, Aristizabal L, Arthurs S. 2012. Evaluation of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Biocontrol Science and Technology* 22:747-761.
- Steels EL, Learmonth RP, Watson K. 1994. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*. 140:569–576.
- Steinhaus EA. 1975. *Disease in a Minor Chord*. Ohio State University Press, Columbus, Ohio.
- Stephenson GA, Solomon KR. 1993. *Pesticides and the Environment*. Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Stehr FW. 1975. Parasitoids and predators in pest management. en: R.L. Metcalf & W.H. Luckmann (eds.), *Introduction to pest management*. John Wiley & Sons, N.Y. 147-188 pp.
- Stockholm Convention 2014
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>
(Consultado 20/02/2014, 13:43).
- Summy KR, French JV. 1988. Biological control of agricultural pests: concepts every producer should understand. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.* 41:119-133.
- 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. *Biotechnological Products and Process Engineering* 68:481-488.
- Tevini M. 1993. Molecular biological effects of ultraviolet radiation. In: M. Tevini (Ed.), *UV-B Radiation and Ozone Depletion: Effects on Humans, Animals, Plants, Microorganisms, and Materials*. Lewis Publishers. Boca Raton. 269-285 pp.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-L1028.
- Thevelein JM. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev* 48:42-59.

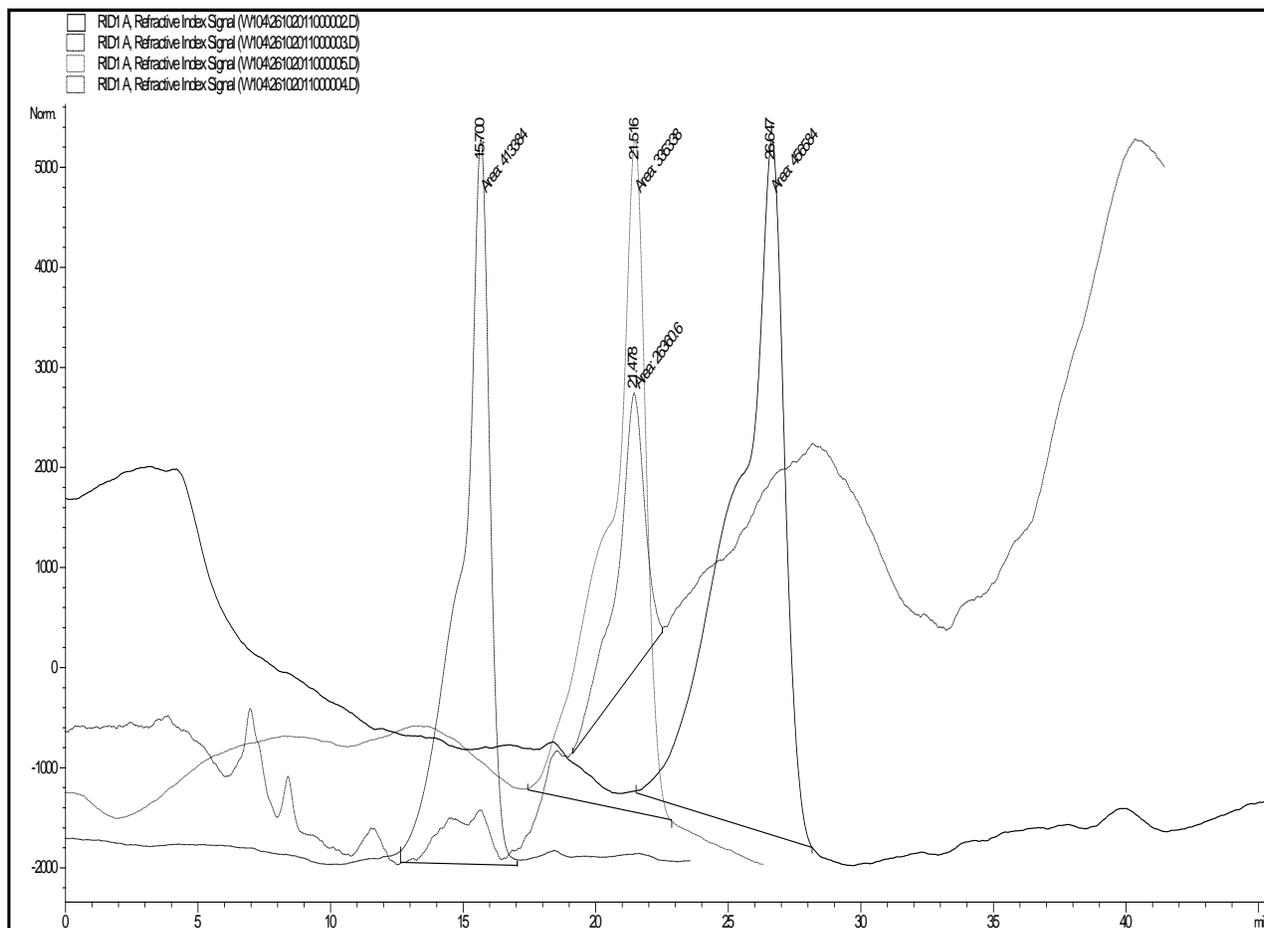
- Thomas MB, Read AF. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Microbiology Reviews* 5:377-383.
- Tlecutil-Beristain S, Viniegra-González G, Díaz-Godínez G, Loera O. 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia* 169: 387-394.
- Trollmo C, Andre L, Blomberg A, Adler L. 1988. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 56:321–326.
- Uyar EO, Hamamci H, Turkel S. 2010. Effect of different stresses on trehalose levels in *Rhizopus oryzae*. *J. Basic Microbiol.* 50:368-372.
- Van den Bosh R, Messenger PS, Gutierrez AP. 1982. *An introduction to biological control*. Plenum Press, N.Y. 247 p.
- Van Laere A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite. *FEMS Microbiology Reviews* 63:201-210.
- Van Leeuwen MR, Krijgsheld P, Bleichrodt R, Menke H, Stam H, Stark J, Wosten HAB, Dijksterhuis J. 2013. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology* 74:59-70.
- Varela JC, van Beekvelt C, Planta RJ, Mager WH. 1992. Osmostress induced changes in yeast gene expression. *Mol Microbiol* 6:2183–2190.
- Vega FE, Meyling NV, Luangsa-ard JJ, Blackwell M. 2012. Fungal Entomopathogens. En: *Insect Pathology*. F. Vega y H. Kaya (eds.) Elsevier Inc. China. Capítulo 6. 185 p.
- Wang C, St. Leger RJ. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci* 103:6647–6652.
- Wang C, St. Leger RJ. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects , and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell* 6:808-816.

- Wang CS, Duan ZB, St Leger RJ. 2008. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell* 7:302–309.
- Wang ZL, Lu JD, Feng MG. 2012. Primary roles of two dehydrogenases in the mannitol metabolism and multi-stress tolerance of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology* 8:2139-2150.
- Wang ZL, Zhang LB, Ying SH, Feng MG. 2013. Catalases play differentiated roles in the adaptation of fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environmental Microbiology*. 15:409-418.
- Weisiger RA, Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248:4793–4796.
- Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Gulson D. 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336:351-352.
- Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J, Grobben GJ. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int Dairy J* 12:151–161.
- Xie XQ, Wang J, Huang BF, Ying SH, Feng MG. 2010. A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal pathogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86:1543-1553.
- Xie XQ, Li F, Ying SH, Feng MG. 2012. Additive Contributions of Two Manganese-Cored Superoxide Dismutases (MnSODs) to Antioxidation, UV Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana*. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0030298.
- Yueqing C, Min L, Yuxian X. 2011. Mapmi gene contributes to stress tolerance and pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *J Invertebr Pathol*, 108:7–12.
- Zakharova K, Tesei D, Marzban G, Dijksterhuis J, Wyatt T, Sterflinger Katja. 2013. Microcolonial fungi on rocks: A life in constant drought?. *Mycopathologia* 175:537-547.

- Zimmermann G. 2007a. Review on the safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17:879-920.
- Zimmermann G. 2007b. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17:553-596.
- Zimmermann G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinose* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and *Isaria fumosorosea* (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Sci Technol* 18:865–901.

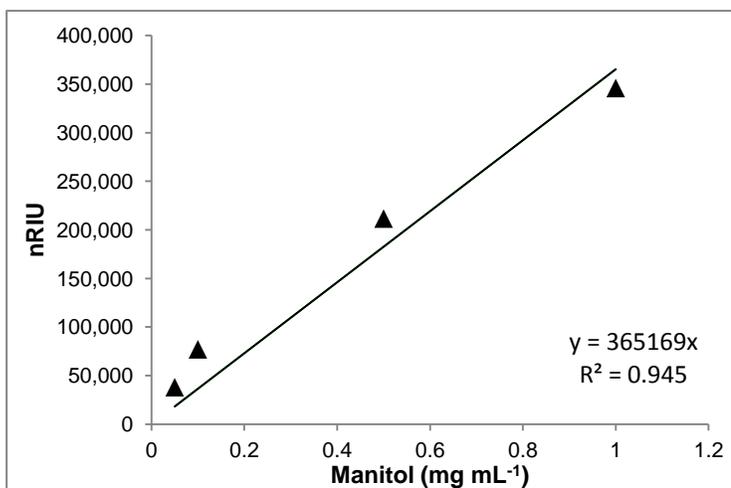
ANEXOS

Anexo A. Cromatograma a partir del cual se determinó el tiempo de retención del manitol (21.5 min) y de la trehalosa (26.6 min).

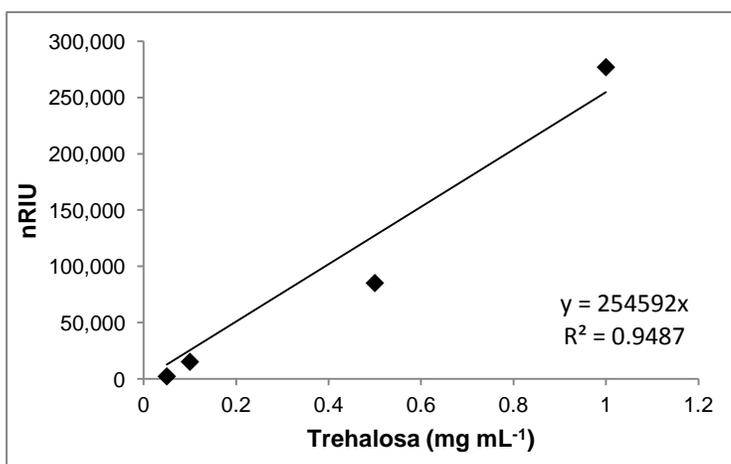


Para la construcción de las curvas estándar, tanto de manitol como de trehalosa, se utilizaron compuestos grado HPLC (Sigma-Aldrich™, No. catálogo: 63559 y T9531, respectivamente). Para ambos compuestos, se partió de una solución con agua desionizada a una concentración 1 mg mL⁻¹ y, a partir de ésta, se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 0.5, 0.1 y 0.05 mg mL⁻¹. A continuación, se presentan las unidades de índice de refracción (nRIU) encontradas en cada una de las concentraciones descritas de estos compuestos, así como las gráficas derivadas de estos datos.

Manitol	
Concentración (mg mL ⁻¹)	nRIU
1	345729
0.5	211421
0.1	76891
0.05	37945



Trehalosa	
Concentración (mg mL ⁻¹)	nRIU
1	277083
0.5	85356
0.1	15387
0.05	2447

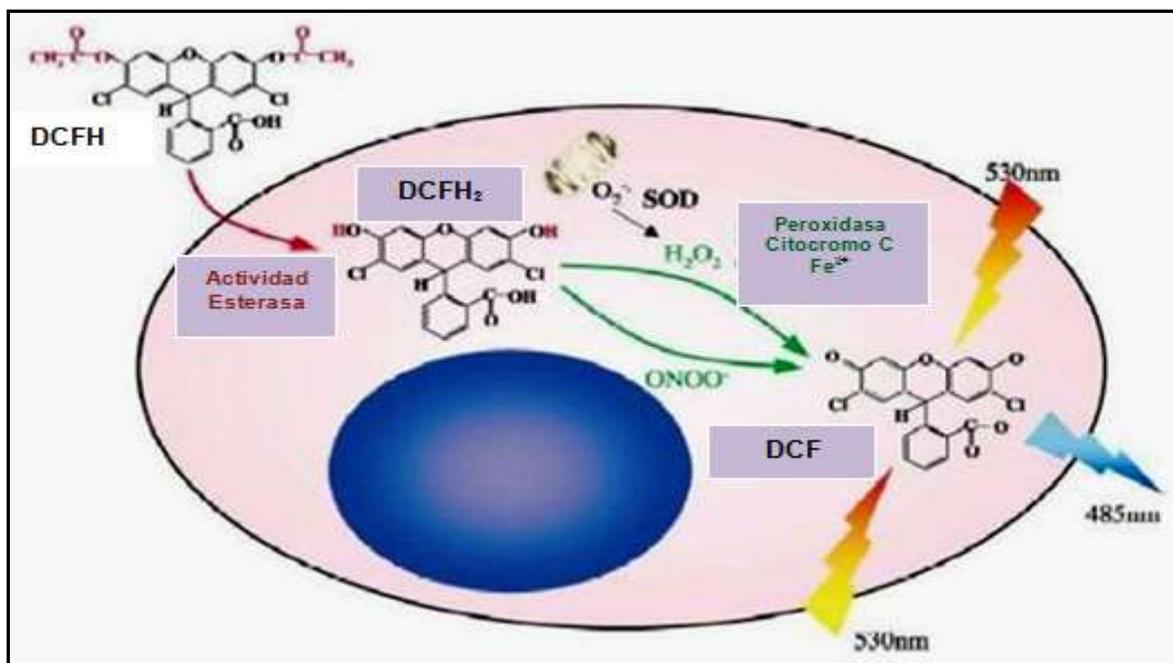


Anexo B. Efecto del tratamiento 26 (26% O₂) en la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos en comparación con el tratamiento AN (21% O₂).

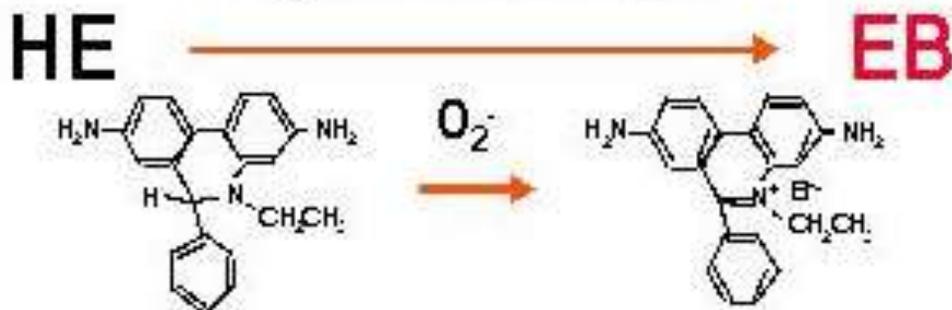
Hongo	C	I	T	G	GH	VHO
<i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	↑	—	↑	—	—	—
<i>Beauveria bassiana</i> 882.5	↓	↓	↓	↑	↑	↑
<i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302	↑	↑	↑	↑	↑	↓
<i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1	↓	↑	↑	↑	↑	↓

C= Producción de conidios; I= Infectividad; T= Resistencia a altas temperaturas; G= Germinación; GH= Germinación en hiperosmolaridad; VHO= Viabilidad en condiciones hiperoxidantes (H₂O₂). ↑ Incremento; ↓ Disminución; — No hubo diferencias.

Anexo C. Imágenes del funcionamiento de los compuestos DCFH y DHE, para la cuantificación de ROS.

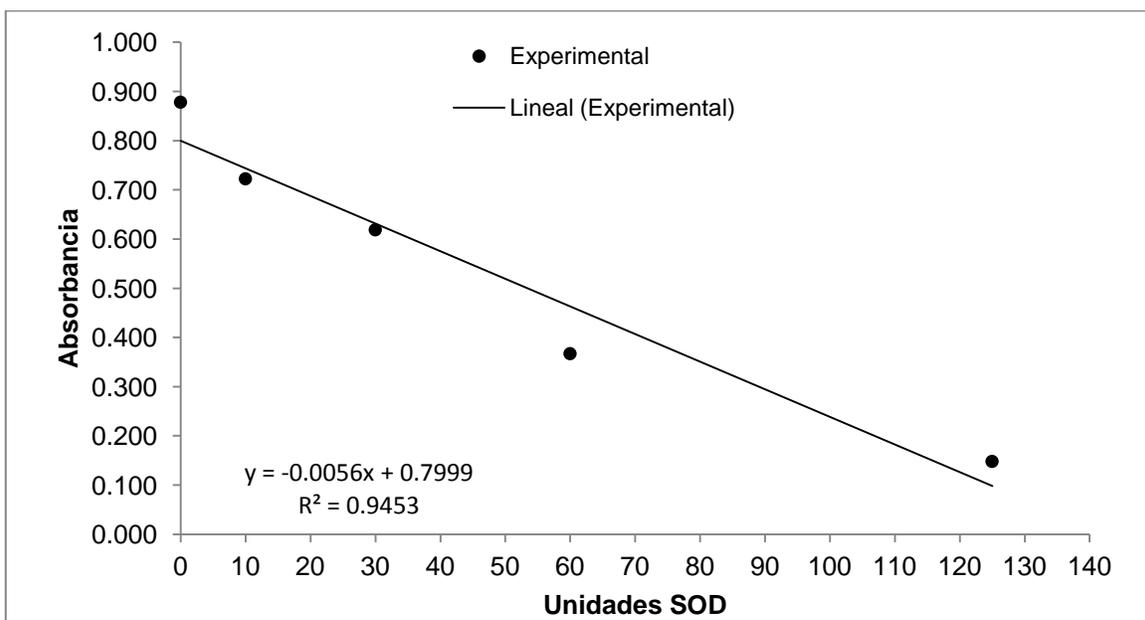


Hydroethidine



Anexo D. Curva estándar para la determinación de actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD).

Para realizar esta curva, se siguieron las instrucciones del protocolo SOD Determination Kit 19160 (Sigma-Aldrich™). Para estandarizar la actividad, se utilizó una enzima comercial (# cat. S2515, Sigma-Aldrich™) a una concentración de 1,000 U/mL, a partir de la cual se hicieron diluciones con buffer de fosfato de potasio (0.1 M, pH= 7.5), para tener concentraciones de 125, 60, 30, 10, 5, 1 y 0.1 U/mL. Las lecturas de absorbancia se hicieron en un espectrofotómetro BioTek ELx808 a una longitud de onda de 450 nm. Una vez obtenidas las absorbancias experimentales, se transformaron a U enzimáticas a partir de esta curva.



Anexo E. Primers degenerados utilizados para buscar la amplificación de 5 genes de enzima catalasa en las dos cepas de *I. fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302).

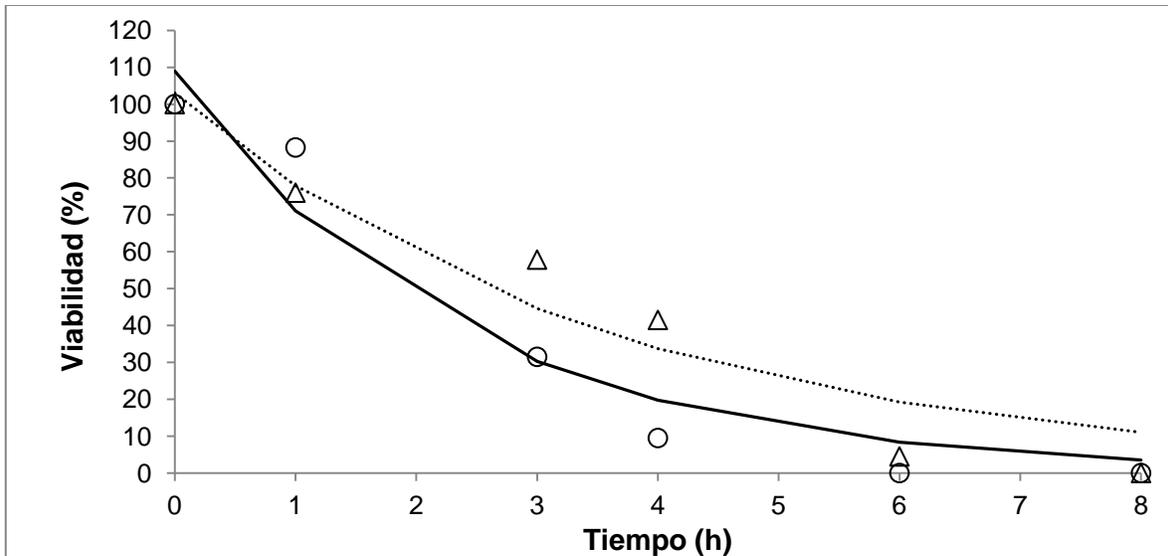
Estos primers fueron reportados por Wang *et al.*, (2013). De acuerdo a los autores, estos primers se diseñaron a partir de las secuencias consenso obtenidas a partir de las secuencias conocidas de 6 hongos.

Supplementary material	
Table S1. Paired primers designed for the manipulation of five catalase genes in <i>B. bassiana</i> (Bb2860).	
Primers	Sequences (5'–3')*
catA-F/R	ATHCCNGTNTTYTYATHCARGA/TCRTCRCARTGRTCNARYTCRAA
catB-F/R	GTNCAYGCNMGNGGNGCNGGNGC/GGNARYTYGTCRAARTTNGGNCC
catP-F/R	ATHTAYGTNAAYCCNGARGGNCC/ATNCKNGCNCRTTNGCNCNC
catC-F/R	AAYTGGGAYTGGGTNTTYAAYAA/TGYTCNACYTCNGCRAARTARTT
catD-F/R	TGGTGGCCNGCNGAYTTYGGNCA/GCNACNGTYTCYTCRTTCAT

Anexo F. Cinéticas de viabilidad (%) de los conidios de dos cepas de *I. fumosorosea* (ARSEF3302 y CNRCB1), después de ser expuestos a dos temperaturas (38 y 40°C).

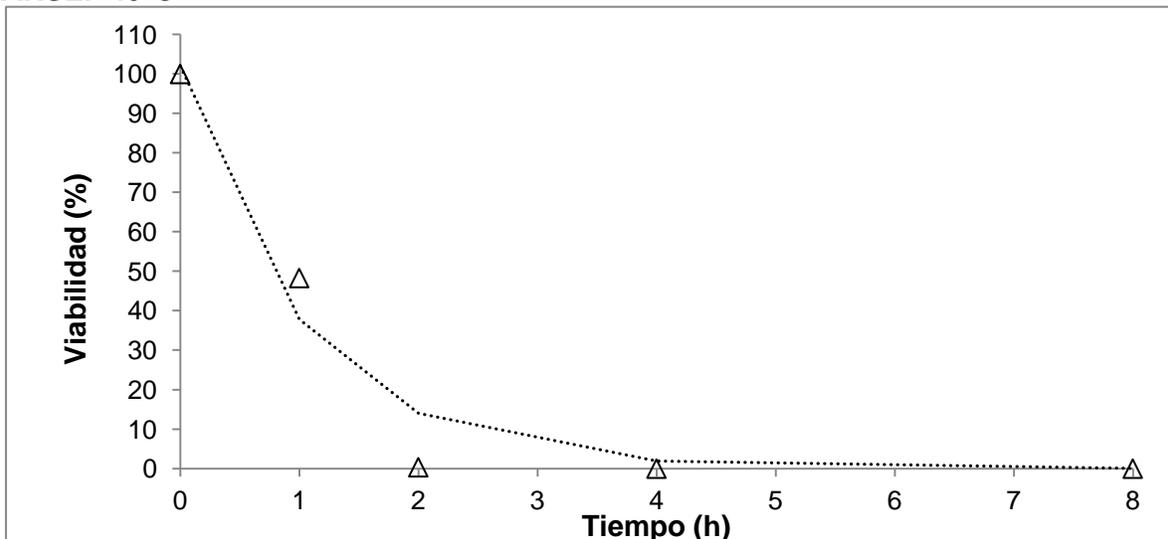
Para la cepa ARSEF3302, se identifican los resultados de los conidios con tratamiento AN (círculo) y 26 (triángulo). Para la cepa CNRCB1, se muestran los resultados de los conidios del tratamiento AN (cuadrado) y 26 (rombo). Las líneas representan la proyección del modelo propuesto (continua:AN; punteada:26). Los valores de R^2 aparecen debajo de cada gráfica.

ARSEF 38°C



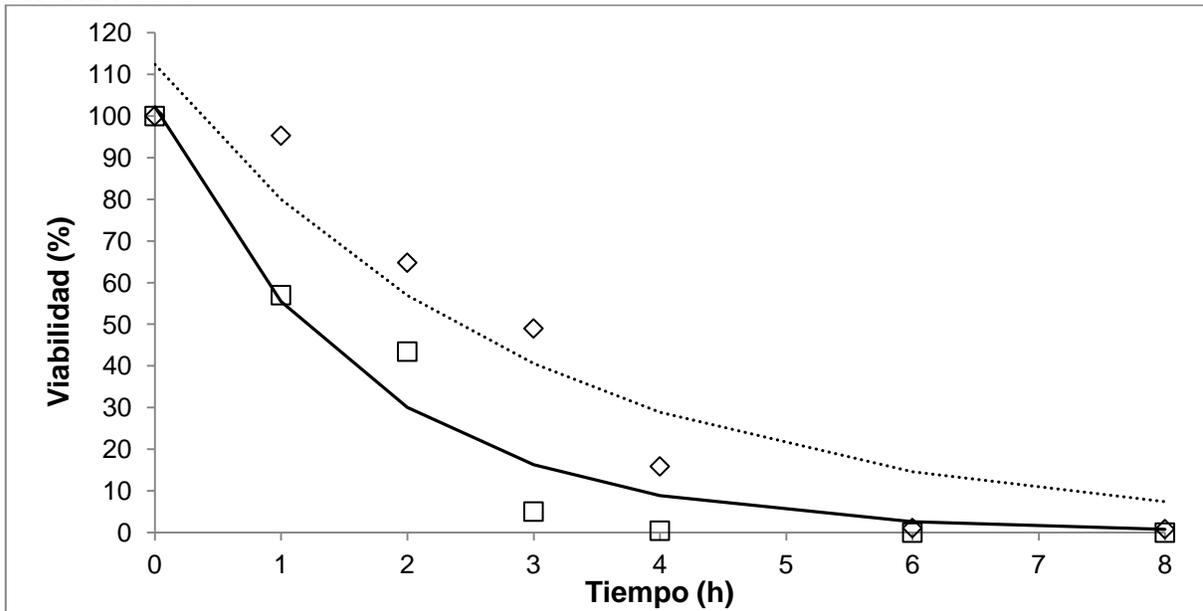
AN R^2 : 0.9747/ 26 R^2 : 0.9648

ARSEF 40°C



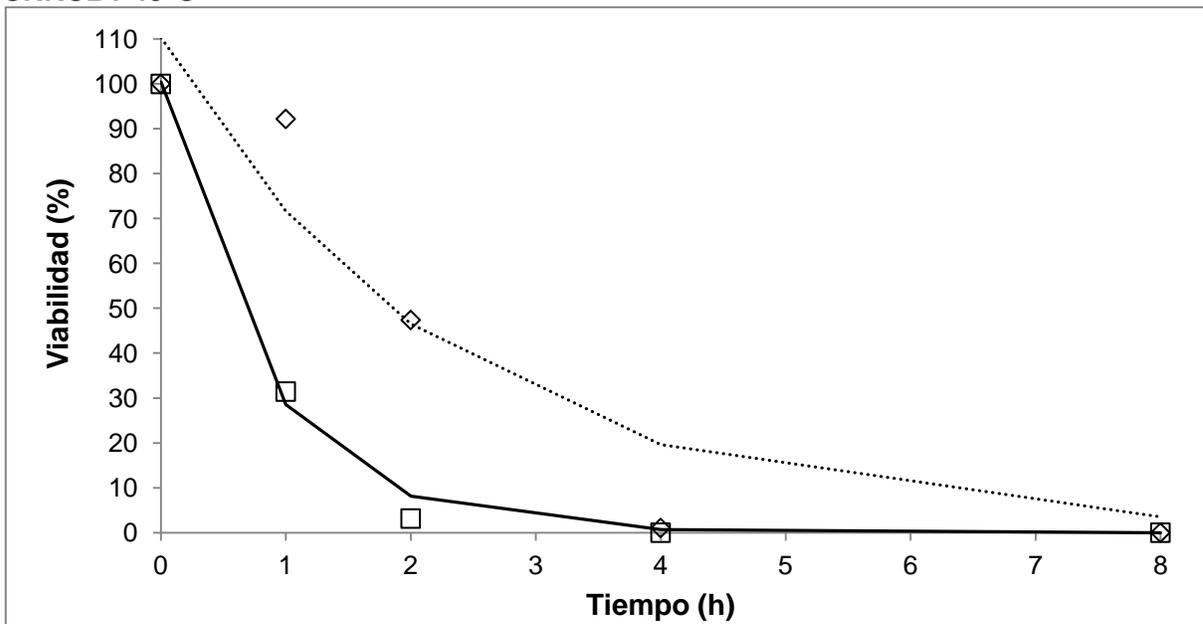
26 R^2 : 0.9816

CNCRB1 38°C



AN R²: 0.9799/ 26 R²: 0.9600

CNCRB1 40°C

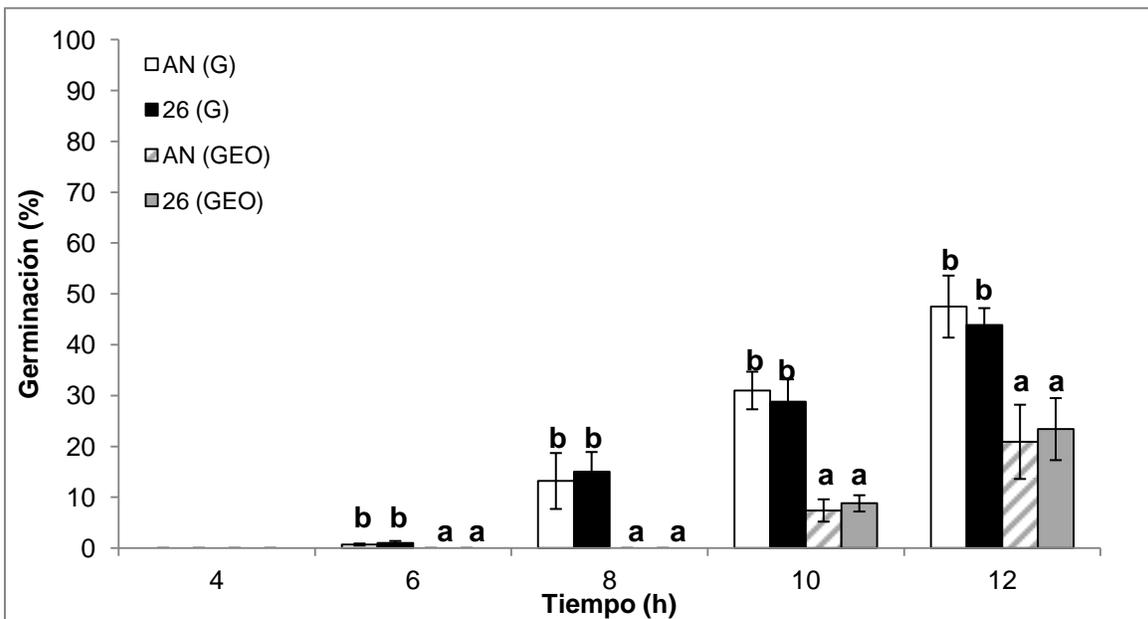


AN R²: 0.9979/ 26 R²: 0.9541

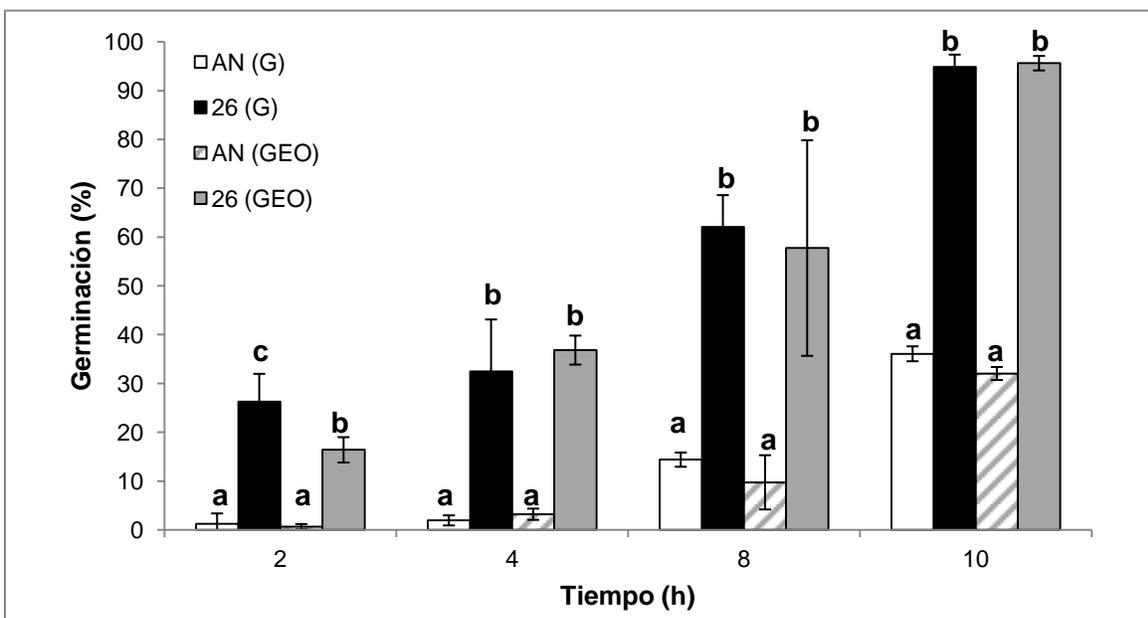
Anexo G. Gráficas del segundo experimento de germinación en medio SDA (G) y germinación en medio SDA más NaCl (GEO), de los 4 hongos entomopatógenos.

Se presentan los resultados encontrados en *M. anisopliae* CP-OAX, *B. bassiana* 882.5 y las dos cepas de *I. fumosorosea*, CNRCB1 y ARSEF 3302. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo de muestreo (ANOVA, $P < 0.05$).

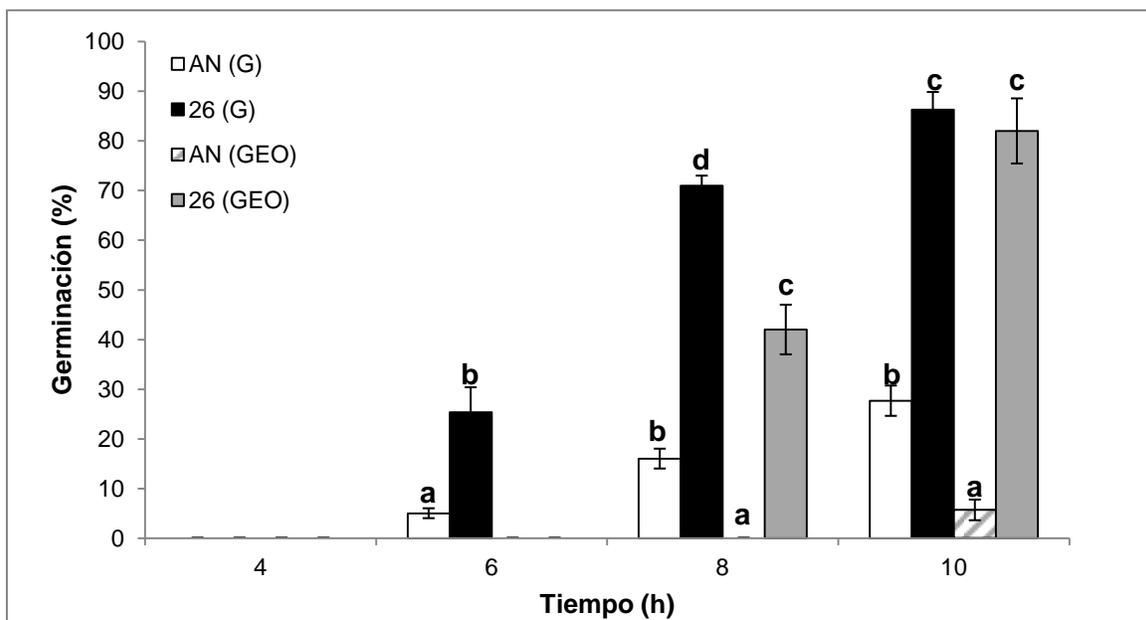
***M. anisopliae* CP-OAX**



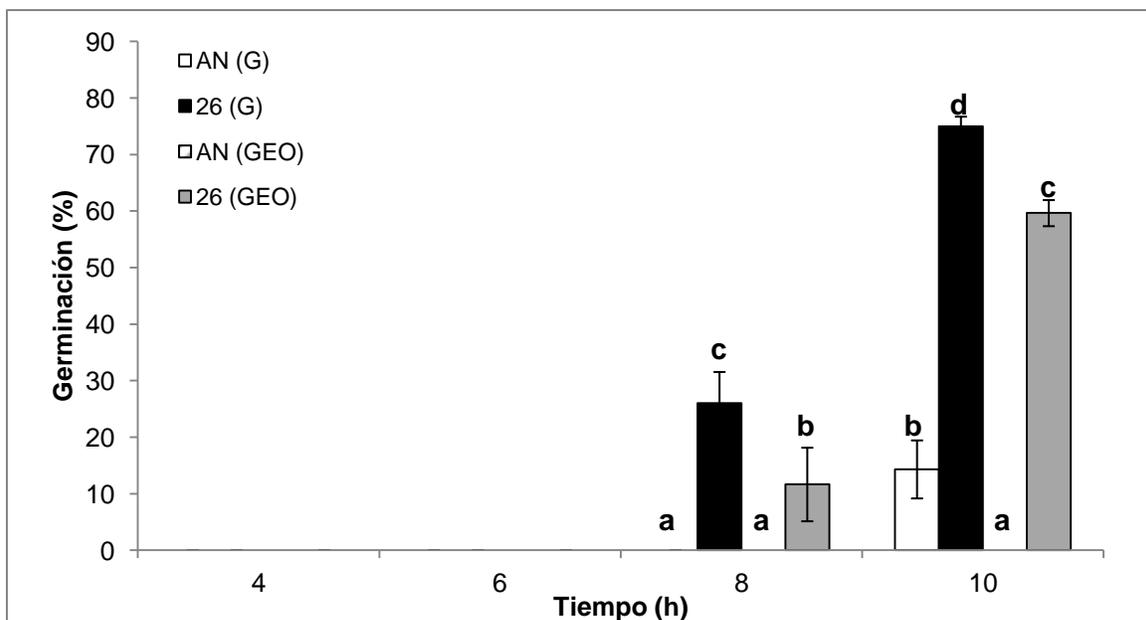
***B. bassiana* 882.5**



***I. fumosorosea* CNRCB1**



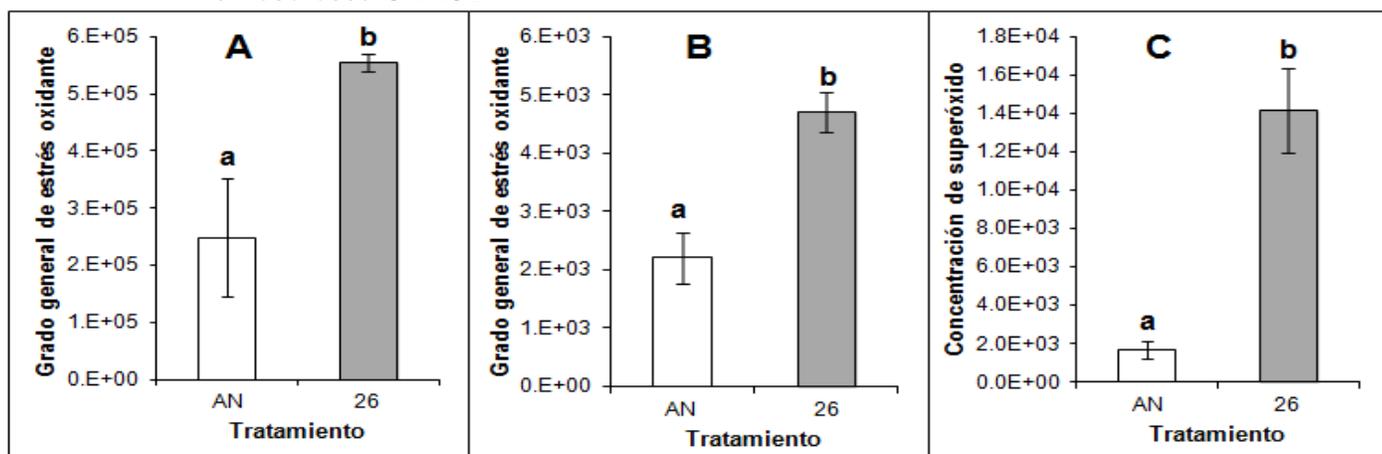
***I. fumosorosea* ARSEF 3302**



Anexo H. Cuantificación, en Unidades de Fluorescencia (UF), del grado general de estrés oxidante (DCFH) y del anión superóxido (DHE) de los conidios de las dos cepas de *I. fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302).

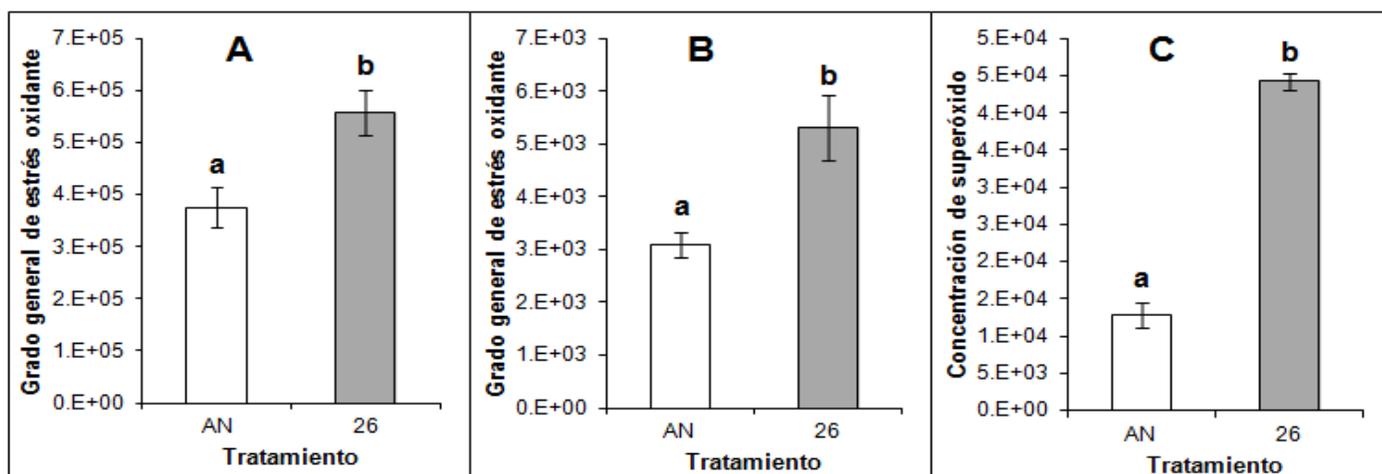
Se presentan los resultados encontrados en los conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea*, expuestos a los tratamientos AN y 26. Se indican las lecturas en unidades de fluorescencia (UF) de los tratamientos una vez restadas de la lectura de la muestra control. En la muestra control se sustituyó el volumen de la suspensión de conidios por buffer PBS.

- *I. fumosorosea* CNRCB1



A: Grado general de estrés oxidante en la parte superior del pozo.
 B: Grado general de estrés oxidante en la parte inferior del pozo.
 C: Concentración del anión superóxido.

- *I. fumosorosea* ARSEF 3302



A: Grado general de estrés oxidante en la parte superior del pozo.
 B: Grado general de estrés oxidante en la parte inferior del pozo.
 C: Concentración del anión superóxido.

Anexo I. Secuencias obtenidas de los productos de PCR que evidenciaron la amplificación de *catA* y *catD* en *I. fumosorosea* CNRCB1.

Secuencia *catA* Forward

>COL-A-F sequence exported from COL-A-F.ab1

```
GTGAGCGACTATCGCGACAGCGGTGGCAGAGGTGAGATTCCCACGTACAGACGGCGCACAC
ACGGGATTTTGTATGTCATCGGTAGGCAACACACATGTTTCATAGATGGGCACATGTCGGAC
CGCGGGATCCCAAGGTCCTACCGCATGATGCAAGGGTTCGGCGTCAACACGTTTACGCTGA
TCAACGCGCAGGGCAAGCGTCATTTTGTCAAATTTACTTTACGCCCAGCTCGGCGTGCAC
TCGCTGGTGTGGGACGAGGCACTCAAGATTGGCGGGCAGGATCCCGACTTTCACAGAAAGG
ACTTGATGGAGGCCATCGAGAATGGTGCCTATCCCCGGTGGAAAGTTTGGCATCCAGACAATT
GCCGAGGGCGAGGAGGACAGATTTGAGTTTGACGTCTCGACGCCACCAAGGTGTGGCCC
GAGGACCTCGTCCCGATCCGCTACATTGGCGAGCTGGAGCTGAACCGCAACGTGGACGAGT
ATTTACCGAGACGGAGCAGGTTGCGTTTTGCACCAGCCACGTGTCGCCGGCATCGGCTT
CTCCGACGACCCTCTCCTGCAGGGCCGCAACTTTTCTATTTTGCACGCGAGCTGAGCCGCC
TGGGCATCAACTGGGAGGAGCTGCCATCAACAAGCCGCTCTGTCCAATGATGAACTTTAAC
CGCGACGGCGCCATGCGCCACCGCGTCTCCAGGGCAAGTTCAACTACTGGCCCAACAGG
GGCGAGGTGCAGCCGCCCGCTGCCACCTCGGAGGGCGGCTACCACGACTACCCGCAAAAG
GTGGGCCGGGATCAAAGTGCGCGGCAAGAGCGAAAAGTTCAAGGGAGCATATTTCCCAAGC
GCAGCTGTTCTAACTCCCCTCAGCGCCATCGAACAGAAGCACCTGCAAGGCGGCACTCC
GCCGTTTGAATCTTGAACATTGGCGGACCGAAAATA
```

Secuencia *catA* Reverse

>COL-A-R sequence exported from COL-A-R.ab1

```
ACGGCTAAAATCCCAAAGAAACCGTTGAAGCCTGGGGGAGTTGTAGAACAGCTGCTCTTGA
AGAAATATGCTCCTTGAGAGAAGGGGGTGGCGCGCACCTTGATTTTCGGACACCTTTTTCGG
GTAGACGTGGTAGCCGCCCTCCGAGGTGGCAGCGGGCGGCTGCACCTCGCCCCTGTTGGG
CCAGTAGTTGAACTTGCCCTTGAGACGCGGTGGCGCATGGCGCCGTCGCGGTTAAAGTTC
ATCATTGGACAGACGGGCTTGTTGATGGGCAGCTCCTCCAGTTGATGCCAGGCGGCTCA
GCTGCGTGTCAAATAGGAAAAGTTGCGGCCCTGCAGGAGAGGGTCGTCGGAGAAGCCGAT
GCCGGGCACGACGTGGCTGGTCAAACGCAACCTGCTCCGTCTCGGTGAAATACTCGTCC
ACGTTGCGGTTTAGCTCCAGCTCGCCAATGTAGCGGATCGGGACGAGGTCCTCGGGCCACA
CCTTGGTGGCGTCGAGGACGTCAAACCTCAAATCTGTCTCCTCGCCCTCGGCAATTGTCTGG
ATGCCAACTTCCACCGGGGATAGGCACCATTCTCGATGGCCTCCATCAAGTCTTTCTGTG
AAAGTCGGGATCCTGCCCGCCAATCTTGAGTGCCTCGTCCCACACCAGCGAGTGCACGCCG
AGCTCGGGCGTAAAGTGAAATTTGACAAAATGACGCTTGCCCTGCGCGTTGATCAGCGTAA
CGTGTTGACGCCGAACCTTGCATCATGCGGTAGGACCTTGGGATGCCGCGGTCCGACATG
GCCCCACATGAACATGTGTGTGCGCTCCGAGTGCATAAACATAAAGTCCCAAAGGTTGTTG
TGCGCCCGACTGTGCCCTGGGGGAATTCTACCGTCCCGGGCTCCGGCTTGCCCGGCGTG
GGAATGAGGTGCGGGGGAAACTTTCATGGGCATTCTTGTATGAAAAAACACCCCGGGAA
TAACCCG
```

Secuencia *catD* Forward

>COL-D-F sequence exported from COL-D-F.ab1

```
AACCGACGCTAAGTGACTGTCGCTACGGTACTACGTGTGCTTGACGGTCGAGGAGGAGCTC
GTCTAGGTCAGCAGCGATTTCGCTCATCACAGGTGGGGCGAAACGGACAACGCCATCGAATT
CGGCCAGCTCTGTCACTGACGTCACTCGCAGCTGGCCCGACAACCTGTAGCCTGGACAAGGC
CGGTCATCTTCGCTGGCCCATCAAGCAAAACATGGGCAACAAGATTAAGTGGGCTGATTTGC
TCGTCCTTGCTGGCTGGTCGCCCTCGAGTCCATGGGCTTCAAGACCTTAGGCTTTGCCGGTG
GCCGTGTCGACACCTGGGAGTCTGACTAGGCCGTCTACTGGGGCTCCGAGCCCGAGTGGAT
GACCGACAGCCACCGTTACAGCGAGGACTCTTCTGGCAAGCGTGACCGTGAGAGCCTTGAG
AAGCCTATGTGTGCCGACATTATGTCTAAGTCTCTTGAAGCAGCCCTCTGCTATACTACGCTG
TCATGTTTAATTTCACTTGTCTAACAATTTGCAGGTCTCATCTACGTTAACCCCGGTGTCGAG
GACCCCGCATGGCTGCACACGACATCCGCACCACCTTTGGTCGCATGGCCATGAACGACG
AGAGAACGGTCGCAAGGCGGTGCAAATTCCTGATTTTCTCCCTGAGCATGGCTGCGCGCCA
CTTTCTGCTAGTAGGCATATACTGAGGTGAGCGTTTCTTTGACCGACAGACCTAGCACTGGTT
CGGGCCAGCGTATTAGATGATTGACAACCTTGACAGAAGACATGCCTATTGCTACGTAACACG
GAAGAAATGCAACGTGGTGAGAGCGGAAGATTCAATTATTGATATGGGAGTGTGGGCGAAAG
GAGGAATGACTTCTGTGGGAAGCTATAAGTTACTGGAGCACGGTTTGAGACTCCTGCC
AATCTATAGTAGTGCGGTCT
```

Secuencia *catD* Reverse

>COL-D-R sequence exported from COL-D-R.ab1

```
GGCCAGGCTGTGCGATCTCGTGCCGCAGGACGAGTCTCTTACACCGGCGTTACGTAGATGT
AGACCTGTATATTGTTAGGCCAAGGGAAGCTAATCATGCTCGCGTAGTATAGCAGATGGCTG
GTTACAGGGACTTACCCATAATCTGGGCACCCACAGGCTTCTTTGGCTCTCAGGGTCACGCTT
GCCAGAAGAGTCCTTGCTGTAACGGTGGCTGTCCGGTCATCCACTCAGGATCGGAGCCAGT
ACACGGCCTCGTCAGACTCCCAGGTGTGACACGGCCACCGGCAAAGCCGAAGGTCTTGAA
GCCCATGGACTCATGGGCGACGTTGCCAGCAAGGACGAGCAAATCAACCCAGCTAATCTTGT
TGCCGAACTTTTGGCTTGATGGGCCAGAGAAGACGACGGGCCTTGTCCAGGTTACCGTTGTCG
GGCCAGCTGCGAGTGACGTCACTGACTGGAACCTGGCACAATTCCATGGCGTTGTGGGGGTT
TGCTTACCTGTTGAGGGGAGCGAAACGCTGCTGTCCCTCGCCGCCACCACCGCGACCGTC
AAAGACACGGTAGGTCCGGGCAGCATGCCAGCTCATACGGATGAAGAGGCCACCATAGTGA
CCAAAATCTGCGGGCCACCAA
```

Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes

Francisco Miranda-Hernández,^a Gerardo Saucedo-Castañeda,^a
Raquel Alatorre-Rosas^b and Octavio Loera^{a*}

Abstract

BACKGROUND: In addition to high production levels of conidia, the success of entomopathogenic fungi as biological control agents depends both on their prevalence under the environmental conditions found in open fields (resistance to stress) and on the capacity of these conidia to infect pests. This study compares conidium production, infectivity and resistance to thermal and osmotic stress in two strains of *Isaria fumosorosea* (ARSEF 3302 and CNRCB1) grown either under a normal atmosphere (21% O₂) or using enriched oxygen pulses (26% O₂).

RESULTS: After 180 h, the ARSEF 3302 strain with 26% O₂ pulses increased conidium production nearly fivefold compared with the normal atmosphere, while conidium production by the CNRCB1 strain decreased by 50% under O₂ pulses, relative to the values measured with the normal atmosphere. The conidia obtained with 26% O₂ pulses had a greater germination rate and resistance to thermal and osmotic stress, in addition to improved infectivity against *Galleria mellonella* (Lepidoptera) larvae. These findings were associated with an increase in catalase activities for both strains.

CONCLUSION: An enriched oxygen atmosphere increases the quality of conidia of both strains of *I. fumosorosea*, with a variable effect on conidium production.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: cross-protection; germination; thermal tolerance; osmotic stress; catalases; oxidative stress

1 INTRODUCTION

Owing to problems associated with the use of chemical pesticides, incentives have been made available to create programmes involving integral pest management (IPM) systems, encouraging the development of healthy crops, promoting natural mechanisms for pest control and causing the least possible damage to agroecosystems (FAO, <http://www.fao.org/docrep/005/y4544e/y4544e00.htm#Contents>). Entomopathogenic fungi, including *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* and *Lecanicillium lecanii*, have been included in these control programmes in different parts of the world. In this context, *I. fumosorosea* (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*) is an entomopathogenic, mesophilic fungus (Ascomycota) with an optimal growth range between 20 and 30 °C, a worldwide distribution and an ability to infect a wide range of insects.¹

Current interest has centred on the study of the different factors that may improve conidium production in entomopathogenic fungi by evaluating both commercial media and natural substrates.^{2,3} In most cases, the quality of the conidia and their capacity for resistance to abiotic factors have not been considered in the selection of these possible biocontrol agents; in fact, Tarocco *et al.*⁴ mentioned the importance of infectivity, in addition to other factors such as the ability to survive in hostile habitats,

growth rates, spore generation and genetic stability. The main factors influencing the effectiveness of entomopathogenic fungi as biocontrol agents include temperature and osmotic stress.⁵ In the field, conidia can lose viability in a few hours by solar irradiation, and even by a limited amount of water, which also leads to osmotic stress.⁶ Also, in the last stage of the infectious process, fungi need to adapt to high osmotic pressures in the insect haemolymph.⁷

The exposure of an organism to sublethal stress increases the capacity for resistance not only to that particular type of stress but also to other stresses of a different nature (cross-protection).⁸ In this context, some reports have determined the role of antioxidant enzymes, mainly superoxide dismutases and catalases, in fungi during hyperoxidant states, and also as a

* Correspondence to: Octavio Loera, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, CP 09340 Iztapalapa, Mexico, DF, Mexico; E-mail: loera@xanum.uam.mx

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico, DF, Mexico

^b Colegio de Posgraduados, Instituto de Fitosanidad, Edo de Mexico, Mexico

response to different types of stress, which in turn is associated with improved infectivity.^{9–12}

Oxidising atmospheres have been studied as a cause of moderate stress in *B. bassiana* cultures,¹³ as well as an enhancer for conidium formation in *M. anisopliae*.¹⁴ In the present work, the effects of an oxygen-rich atmosphere with two strains of *I. fumosorosea* on conidium production, germination rate and resistance to heat and osmotic stress were analysed, as well as the effects on the infectivity properties on *Galleria mellonella* larvae.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganisms

Two strains of *Isaria fumosorosea* were studied: strain CNRCB1 belonged to the fungal collection of the Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) in Colima, Mexico; strain ARSEF 3302 belonged to the Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF) in Ithaca, New York, which had been originally isolated in Baja California, Mexico. Both strains were identified as *Isaria fumosorosea* by an amplification of the ribosomal region using primers ITS1 and ITS4 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). The access numbers in the GenBank ID are HM209049 for *I. fumosorosea* CNRCB1 and HM209050 for *I. fumosorosea* ARSEF 3302. The experimental inoculum was obtained after 10 days of growing in an oat flour medium¹⁴ containing 33.3 g L⁻¹ of oat flour (Grupo Industrial Vida, Zapopan, Jalisco, Mexico), 15 g L⁻¹ of bacteriological agar (Bioxon, Mexico City, Mexico) and 10 g L⁻¹ of meat peptone (Bioxon).

2.2 Conidium production in the two atmospheres

An oat flour medium was used with the composition described in Section 2.1. A quantity of 10 mL of the culture medium was added to each serum bottle (120 mL; Distbrand, Mexico City, Mexico) and inoculated with 1×10^7 conidia, equivalent to 5.7×10^5 conidia cm⁻². Normal (21% O₂) and oxygen-rich atmospheres (26% O₂) were studied according to the methodology described by Tlecuítl-Beristain et al.¹⁴ Briefly, for 21% O₂ conditions, the bottles were covered with cotton caps, allowing a free gaseous exchange during the culture period. Treatment with 26% O₂ began similarly to the conditions used in 21% O₂ experiments. After 60 h, the oxygen-rich pulses were then applied to a series of bottles that were covered with plastic stoppers and sealed with plastic paraffin film (Parafilm; American Can Co., Neenah, WI). The atmosphere was renewed daily with a flow of 20 cm³ s⁻¹ for 1 min using a needle to inject the oxygen and another needle as an exit port. The gas mixture was 26% O₂ and 74% N₂ (Praxair Mexico, Monterrey, Mexico). For each sampling period, three independent samples were evaluated for each treatment. For each bottle, 20 mL of 0.05% Tween 80 (Amresco, Solon, OH) was added and agitated for 10 min using a magnetic stirrer. The conidium production was determined using a Neubauer chamber (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and reported as conidia cm⁻².

2.3 Quality tests

For these tests, the conidia produced in both atmospheres were collected with 0.05% Tween 80 (Amresco) at the time of maximum production (156 h or 6.5 days) in both strains. The samples were then analysed for the parameters described below. All these tests were repeated twice.

2.3.1 Germination

After harvesting the conidia from five bottles in each treatment, the suspensions were standardised to a concentration of 1×10^8 conidia mL⁻¹, and 30 μ L was added to 90 \times 15 mm petri dishes (three per sampling time) using a Sabouraud dextrose agar medium (Bioxon). The inoculum was uniformly distributed over the surface medium using a glass rod. The dishes were then sealed with plastic paraffin film (Parafilm) and incubated at 28 °C. The sampling time points were 4, 6, 8 and 10 h. At each sampling time, a section of agar was cut and placed on a sterile slide, and then at least 100 conidia were counted using a microscope. The conidia were considered to be germinated when the length of the germinating tube was greater than the diameter of the conidia.¹⁵

2.3.2 Osmotic stress tolerance

This test was performed with SDA medium containing 0.5 M of NaCl (Reasoí, Mexico City, Mexico). The salt concentration in the SDA medium gave a water activity (a_w) of 0.975, which was measured using an AQUALAB CX-2 water activity device (Decagon Devices, Pullman, WA). The same methodology as that described in Section 2.3.1 was followed.

2.3.3 Thermal tolerance test

This test was performed according to the method published by Rangel et al.,¹⁶ with some modifications. After the conidia had been harvested from five bottles in each treatment, the suspensions were filtered using sterile gauze and standardised to a concentration of 1×10^8 conidia mL⁻¹. Aliquots of 1 mL of these suspensions were placed in 8 mL glass tubes with stoppers (Wheaton, Millville, NJ). The tubes were then placed on a rack in water baths at 38 or 40 °C. The time points to evaluate the viability were 0 (control), 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h. At each sampling time, the selected tubes were agitated with a vortex (Scientific Industries, New York, NY), and 30 μ L (approximately 300 conidia) was inoculated onto petri dishes (90 \times 15 mm) in duplicates containing both SDA and 0.5 g L⁻¹ of sodium desoxycholate (Sigma-Aldrich, Auckland, New Zealand). These dishes were then sealed with plastic paraffin film (Parafilm) and incubated at 28 °C. The colony-forming units (CFUs) were counted after 96 h of incubation. The viability percentages were determined in the duplicates by comparing the CFUs of each treatment with those measured for the control. The experimental data were fitted to the exponential decay model

$$S = S_0 e^{-kt} \quad (1)$$

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 time (h).

Using this model, an estimation of the ST₅₀ parameter was made, indicating the time (h) at which 50% of the conidia were still viable at a given temperature.

2.4 Infectivity bioassay

The infectivity of the conidia of both strains of *I. fumosorosea*, obtained in normal and oxygen-rich atmospheres, was evaluated using wax moth, *G. mellonella*, larvae (Petmml, Mexico). After the conidia had been harvested with 0.05% Tween 80 (Amresco), 20 mL of the conidium suspensions from the two atmospheric conditions were standardised to a concentration of 2×10^7 conidia mL⁻¹. The larvae were immersed for 5 s in these suspensions.¹⁷ As a control,

a 0.05% Tween 80 (Amresco) solution was used without conidia. The experimental units were petri dishes (90 × 15 mm) containing ten insect larvae that were incubated at 28 °C without feeding and with a 12:12 h light–dark photoperiod. Four independent samples were used for each treatment. The bioassay lasted for 6 days with daily recording of mortality. The dead larvae were separated from the experimental units and placed in damp chambers to stimulate conidiation and to corroborate that the death had been caused by the fungus.¹⁸ The experimental data were fitted to the model reported by Rodríguez-Gómez *et al.*:¹⁹

$$Y = (100 - S) e^{-k(t-t_0)} + S \quad (2)$$

assuming that $Y = 100$ for $0 \leq t \leq t_0$, where Y is the percentage of survival at time t (days), k is the specific death rate (day^{-1}), t_0 is the time of the first death (days) and S is the estimated asymptotic final survival (%).

2.5 Catalase activity

For both strains, after 156 h of culture, conidia were harvested using 0.05% Tween 80, and three replicates per treatment were analysed. These suspensions were filtered through sterile gauze and then sonicated for 5.5 min on a Cole-Parmer 8892 sonicator (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). After that, filtered conidial suspensions were centrifuged for 5 min at 13 000 rpm on an Eppendorf 5402 centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany). The supernatant was analysed for catalase activity by measuring the oxygen release as previously reported^{20,21} using a Clark microelectrode (YSI oxygen monitor, model 53; YSI, Dayton, OH). One unit of catalase was defined as the amount of enzyme that released one nanoatom of atomic oxygen per minute (na O min^{-1}).¹³ The activity was reported as $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ protein.

2.6 Statistical analysis

Student's t -test ($\alpha = 0.05$) was used to compare the means of conidium production and the infectivity bioassays. Data for the percentage of germination, germination under osmotic stress and catalase activity were analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's least significant difference test with $P < 0.05$. The statistical program used was SPSS (SPSS, Chicago, IL).

3 RESULTS

3.1 Production of conidia in the two atmospheres

The production of conidia for the two strains of *I. fumosorosea* in the normal atmosphere (21% O_2) and with pulses of high O_2 every 24 h (referred to as 26% O_2) can be seen in Fig. 1. For the ARSEF 3302 strain, a high production of conidia was observed under 26% O_2 conditions during almost the entire culture period, with a fivefold increase at 180 h relative to the normal atmosphere (1.69×10^8 and 3.38×10^7 conidia cm^{-2} respectively). For the CNRCB1 strain, the opposite effect was found: at 180 h with 26% O_2 the conidium production decreased by more than 50% (2.21×10^8 conidia cm^{-2}) compared with the production observed with 21% O_2 (4.72×10^8 conidia cm^{-2}). The effect of the atmosphere with 26% O_2 was noticeable for the ARSEF 3302 strain from the first 24 h after the atmospheric change (84 h of culture), given that the conidium production increased threefold compared with 21% O_2 (1.29×10^8 and 4.26×10^7 conidia cm^{-2} respectively). The CNRCB1 strain seemed to adapt to 26% O_2 treatment, although

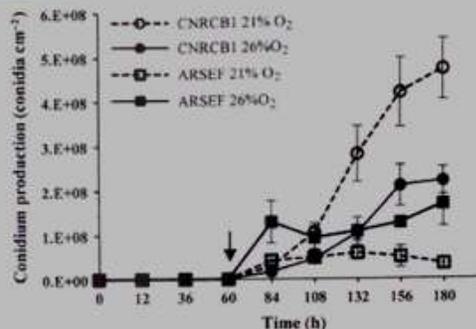


Figure 1. Production of conidia by *I. fumosorosea* CNRCB1 and *I. fumosorosea* ARSEF 3302 in a normal atmosphere (21% O_2) and in an atmosphere with pulses of 26% O_2 . The arrow indicates the time when the atmosphere was changed to 26% O_2 .

the conidium production values were lower than the amounts produced under the normal atmosphere from 108 h to the end of culture.

3.2 Quality tests

As the quality of the conidia can be independent of the production levels,¹⁹ the conidia produced in each treatment were evaluated. These tests were performed on conidia produced under both 21% O_2 and 26% O_2 conditions at 156 h. At this time, the maximal conidium production level was reached for these strains in the two treatments studied.

3.2.1 Germination

The germination rate is important, as this parameter is linked to the infectivity in entomopathogenic fungi such as *I. fumosorosea* and *M. anisopliae*.^{22,23} For both strains, the conidia harvested from 26% O_2 treatments had higher percentages of germination relative to the conidia produced under 21% O_2 ($P < 0.05$) at 6, 8 and 10 h (Fig. 2). The greatest difference between the strains was observed after 8 h. At this time, the percentages of germination for the strains ARSEF 3302 and CNRCB1 were 17.8 and 17.3%, respectively, for those conidia produced with 21% O_2 , whereas the conidia produced with 26% O_2 pulses had germination rates of 80.6% (ARSEF 3302) and 90% (CNRCB1). After 10 h, the percentage of germination of the conidia in both strains treated in 26% O_2 was nearly 100%.

3.2.2 Osmotic stress tolerance

According to Hallsworth and Magan,²⁴ the availability of water in the environment is a critical abiotic parameter that determines the germination, growth and infection capacity of the conidia. Inch and Trinci²⁵ showed that water activity (a_w) levels lower than 0.977 reduced the specific growth rate for *I. farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*), in this study, the water activity was 0.975, resulting from the addition of a 0.5 M NaCl solution to the SDA medium. After 6 h, no germination was found for the conidia from either strain, indicating the effect of a low a_w on conidium germination (Fig. 3). However, in both strains of *I. fumosorosea*, the germination of conidia collected from cultures subjected to 26% O_2 pulses was greater at 8 and 10 h, relative to those values observed in the conidia from 21% O_2 ($P < 0.05$). The differences between the

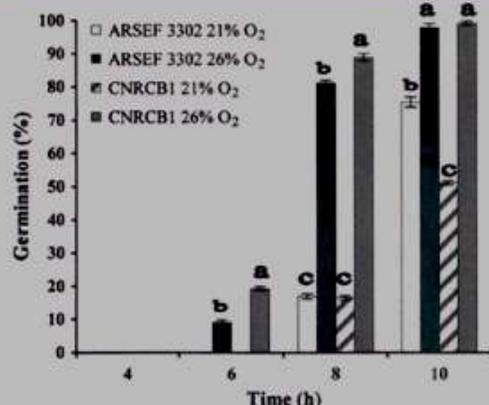


Figure 2. Germination test for *I. fumosorosea* ARSEF 3302 and *I. fumosorosea* CNRCB1 conidia. For each sampling time, bars with different letters show significant differences (Tukey's test, $P < 0.05$).

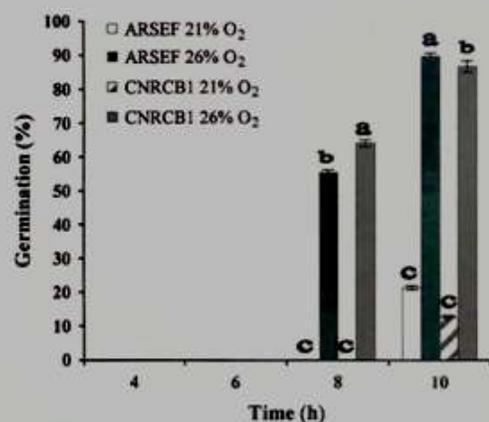


Figure 3. Germination test under osmotic stress for *I. fumosorosea* ARSEF 3302 and *I. fumosorosea* CNRCB1 conidia. For each sampling time, bars with different letters show significant differences (Tukey's test, $P < 0.05$).

two treatments were noticeable after 8 h. At this time, germination of conidia obtained with 21% O₂ was not observed, whereas the values for conidium germination from 26% O₂ pulses were 56.2 and 64% for the ARSEF 3302 and CNRCB1 strains respectively. After 10 h, the differences remained between the treatments. Under the normal atmosphere, the values of conidium germination were 22 and 12.4% for the ARSEF 3302 and CNRCB1 strains respectively. Meanwhile, the germination values for the conidia harvested after the O₂ pulses were 90% for the ARSEF 3302 strain and 88% for the CNRCB1 strain.

3.2.3 Thermal stress tolerance

A tolerance to high temperatures is a desired trait in the conidia from entomopathogenic fungi, as this is directly related to the persistence and development of the conidia in the field. According to Li and Feng,²⁶ a parameter that can be used to estimate the

Strain	Temperature (°C)	Treatment (% O ₂)	ST ₅₀ ^b (h)
CNRCB1	38	21	1.1 ± 0.19
		26	2.0 ± 0.32
	40	21	0.5 ± 0.18
		26	1.6 ± 0.13
ARSEF 3302	38	21	1.6 ± 0.21
		26	2.4 ± 0.46
	40	21	n.d. ^c
		26	0.7 ± 0.02

^a Data values represent the mean and the standard deviation of two measurements.
^b Indicates the time (h) at which 50% of the conidia are still viable.
^c Viability was not detected from the first sampling time.

conidial tolerance to a given temperature is the half-lethal time (LT₅₀). In the present study, a similar parameter named the half-survival time (ST₅₀) is proposed, a value that estimates the time at which 50% of the conidia are still viable in a given temperature, obtained after fitting experimental data to model (1) given above. The conidia of both strains produced with 26% O₂ increased the resistance at both temperatures studied (40 and 38 °C). For the CNRCB1 strain, conidia obtained with 26% O₂ pulses and exposed to 38 °C increased the ST₅₀ parameter nearly twofold compared with conidia harvested from a normal atmosphere (Table 1); additionally, at 40 °C the ST₅₀ increased threefold. For the ARSEF 3302 strain, conidia from the oxidising atmosphere increased the ST₅₀ value by 50% at 38 °C; interestingly, conidia harvested from 26% O₂ conditions and exposed to 40 °C were viable for at least the first hour.

3.3 Bioassay with *Galleria mellonella*

Wax moth larvae are a beehive pest and have been used to evaluate the infectivity of entomopathogenic fungi.^{17,27} The infectivity parameters after 6 days for the two *I. fumosorosea* strains are presented in Table 2. For the CNRCB1 strain, the survival rate (S), lethal time (LT₅₀) and time of first death (t₀) were different between the treatments ($P < 0.05$). In fact, for this strain the final survival value for the conidia produced using 26% O₂ was S = 0% (100% mortality). For the normal atmosphere treatment (21% O₂), the conidia achieved S = 12.5% (87.5% mortality). In addition, the conidia from 26% O₂ pulses required 1.5 days less to kill 50% of the insects (LT₅₀). The ARSEF 3302 strain showed a reduction in infective capacity on *G. mellonella* compared with the CNRCB1 strain. Comparison of the two treatments showed that conidia obtained with 26% O₂ were more aggressive than those produced with 21% O₂, as characterised by the final survival (S) parameter. At the end of these bioassays, 26% O₂ treatment increased the infectivity of both strains of the conidia on this pest, as indicated by the parameters LT₅₀, S and t₀ ($P < 0.05$).

3.4 Catalase activity

The catalase activity was measured for conidia from both strains and subjected to both treatments. As shown in Fig. 4, relative to cultures using the normal atmosphere, this enzymatic activity was significantly higher in conidia harvested from cultures with 26% O₂ pulses (Student's *t*-test, $P < 0.05$). For the ARSEF 3302 strain,

Table 2. Infectivity parameters of the CNRCB1 and ARSEF 3302 strains of *I. fumosorosea* with *G. mellonella* as the host (6 days)^a

Strain	Treatment	S ^b (%)	LT ₅₀ ^c (days)	t ₀ ^d (days)	k ^e (day ⁻¹)
CNRCB1	21% O ₂	12.5 ± 5*	4.6 ± 0.3*	3.4 ± 0.2*	0.7 ± 0.05
	26% O ₂	0 ± 0	3.1 ± 0.3	2 ± 0.4	0.6 ± 0.07
ARSEF 3302	21% O ₂	32.5 ± 5*	5 ± 0.1*	4 ± 0.6*	2.2 ± 2.5
	26% O ₂	15 ± 5.7	3.8 ± 0.8	2.8 ± 0.4	1.1 ± 0.7

^a Values with an asterisk in each column show significant differences in each strain (Student's *t*-test, *P* < 0.05).

^b Final survival.

^c Lethal time for 50% of the insects.

^d Time at which the first death occurred.

^e Specific death rate.

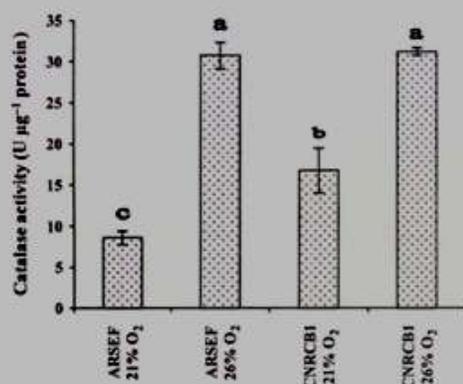


Figure 4. Catalase activity in the conidia of the two strains of *I. fumosorosea* exposed to a normal atmosphere (21% O₂) and oxygen-rich pulses (26% O₂). Letters distinguish significantly different values (Tukey's test, *P* < 0.05).

catalase activity per microgram of protein in conidia harvested from the oxygen-enriched atmosphere was 30.7 U µg⁻¹, whereas catalases in conidia from the normal atmosphere were 8.6 U µg⁻¹. Similarly, the CNRCB1 strain showed catalase activities, measured in conidia collected after enriched oxygen pulses, up to 1.8-fold higher than the value determined for conidia from the normal atmosphere (31.2 and 16.7 U µg⁻¹ respectively).

4 DISCUSSION

In the present study, the conidia of two strains of *I. fumosorosea* were exposed to pulses of an oxygen-rich atmosphere, resulting in contrasting features when compared with cultures under a normal atmosphere. Some reports have found that there are no homogeneous responses for entomopathogenic fungi exposed to similar conditions of stress. For instance, when *M. anisopliae* was exposed to an oxygen-rich atmosphere (26% O₂), the conidium production doubled compared with a normal atmosphere.¹⁴ Using this same system, the amount of conidia produced from *B. bassiana* increased by at least 82% after modifying the atmosphere to 26% O₂.¹³ In contrast, according to Rangel *et al.*,²⁶ *M. anisopliae* decreases conidium production under conditions of nutritional and osmotic stress. These reports are consistent with the responses

to stress conditions, which vary among species and even, as shown in this study, between strains of the same species.

In several cases, the exposure of cells to conditions of moderate stress generates protection, not only against the factor causing the stress but also against other stress factors.⁸ The exposure of *M. anisopliae* to 0.1 mM of menadione (oxidative stress) or to 0.4 M of NaCl (osmotic stress) led to a cross-protective effect at a temperature of 45 °C.²⁶ In this study, a similar effect was observed for both strains of *I. fumosorosea* exposed to 26% O₂ pulses, as conidia increased the germination rate as well as the resistance to thermal and osmotic stress. These increased resistances contribute to the overall quality of the conidia exposed in an open field, even before an insect attack is initiated. These findings show that O₂ pulses stimulate conidium cross-protection traits and might initiate a genetic response of both *I. fumosorosea* strains to this atmospheric manipulation. Both thermal tolerance and hypersmolality tests are conducted to prove, in genetic analysis, if a gene of interest can cause a relevant stress phenotype.⁸

The conidia of both strains of *I. fumosorosea* obtained with 26% O₂ treatments also had an increased infectivity against *G. mellonella* larvae. The effect of this atmosphere on the infectivity of *M. anisopliae*¹⁴ against adults of the insect *Tenebrio molitor* has previously been studied without finding any differences compared with a normal atmosphere. This is the first study to reveal an increased infectivity against *G. mellonella* for strains of an entomopathogenic fungus treated with oxygen-rich pulses. Previous reports established a close relation between the infectivity of entomopathogenic fungi and antioxidant enzymes. Morales-Hernández *et al.*¹¹ found that overexpression of the catalase gene *cat1* improved the infectivity of *M. anisopliae*, in addition to faster germination and higher tolerance to hydrogen peroxide. Recently, Wang *et al.*¹² determined the role of five catalase genes in *B. bassiana*; the infectivity diminished after the knock-out of genes *catA*, *catP* or *catD*; also, these enzymes were linked to thermal tolerance and resistant to UV-B radiation. In the present work, the quality improvements in conidia were also associated with an increase in catalase activity for both strains of *I. fumosorosea* after exposure to oxygen-rich pulses, which has not been described before. A more comprehensive understanding of the factors involved in the acquisition of this cross-protection effect, along with an increase in pathogenicity, has not yet been gained.

This study showed that the manipulation of the oxidising atmosphere during the growth of *I. fumosorosea* affected the conidium production yields in a strain-dependent manner. Positive effects on conidium quality may be achieved as a general response in both strains, suggesting that there are different transduction pathways in these responses that have practical implications for the processes of conidium mass production. These effects may be critical in the design of these novel production schemes for biocontrol products based on entomopathogenic fungi.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CONACYT for the scholarship granted to F Miranda Hernández and for the Basic Science Project CONACYT/152420-Z, as well as the UAM-Iztapalapa and Red Promep for joint financing of this study.

REFERENCES

- 1 Zimmerman G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Pezizomyces farinosus*) and *Isaria fumosorosea* (formerly *Pezizomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Sci Technol* 18:865–901 (2008).

2. Kamp AM and Bidochka MJ, Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letts Appl Microbiol* **35**:74–77 (2002).
3. Dalla Santa HS, Sousa NJ, Brand D, Dalla Santa OR, Pandey A, Sobotka M, et al, Conidia production of *Beauveria* sp. by solid state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguayensis* caterpillars. *Folia Microbiol* **49**:418–422 (2004).
4. Tarocco F, Lecuona RE, Couto AS and Arcas JA, Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**:481–488 (2005).
5. Liu SY, Peng GX and Xia YX, The adenylate cyclase gene *MaAC* is required for virulence and multi-stress tolerance of *Metarhizium acridum*. *BMC Microbiol* **12**:163 (2012).
6. Montiel-Gonzalez AM, Viniestra-Gonzalez G, Fernández FJ and Loera O, Effect of water activity on invertase production by improved diploids strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochem* **39**:2085–2090 (2004).
7. Wang CS, Duan ZB and St Leger RJ, MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell* **7**:302–309 (2008).
8. Hohmann S and Mäger WH, Studies of stress responses, in *Yeast Stress Responses*, ed. by Hohmann S and Magan WH. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 4 (2003).
9. Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D and Hansberg W, Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13**:111–118 (2005).
10. Xie XQ, Li F, Ying SH and Feng MG, Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidant, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE* **7**:e30298 (2012).
11. Morales-Hernández CE, Padilla Guerrero IE, Gonzalez-Hernández GA, Salazar Solís E and Torres Guzman JC, Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:1033–1044 (2010).
12. Wang ZL, Zhang LB, Ying SH and Feng MG, Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environ Microbiol* **15**:409–418 (2013).
13. Garza-López PM, Königsberg M, Gómez-Quiroz LE and Loera O, Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World J Microbiol Biotechnol* **28**:353–359 (2012).
14. Tieculti-Beristain S, Viniestra-Gonzalez G, Diaz-Godínez G and Loera O, Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiorum* conidial production and quality. *Mycopathologia* **169**:387–394 (2010).
15. Ibrahim L, Butt MT and Jenkinson P, Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* **106**:705–715 (2002).
16. Rangel DEN, Braga GUL, Anderson AJ and Roberts DW, Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J Invertebr Pathol* **88**:116–125 (2005).
17. Fang W, Piva-Ripoli M, Wang S and St Leger R, Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol* **46**:277–285 (2009).
18. Shah FA, Wang CS and Butt TM, Nutrition influence growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* **251**:259–266 (2005).
19. Rodríguez-Gómez D, Loera O, Saucedo-Castaneda G and Viniestra-González G, Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World J Microbiol Biotechnol* **25**:513–518 (2009).
20. Kawasaki L and Aguirre J, Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **183**:1434–1440 (2001).
21. Lledias F, Benjume P and Hansberg W, Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**:10 630–10 637 (1998).
22. Arita JA, Vandenbergh JD and Cantone FA, Pathogenicity of *Paecliomycetes fumosaroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J Invertebr Pathol* **73**:332–338 (1999).
23. Harkin AEM, Dillon RJ and Chamley AK, Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol* **54**:277–279 (1989).
24. Hallsworth JE and Magan N, Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecliomycetes farinosus*. *J Invertebr Pathol* **74**:261–266 (1999).
25. Inch JMM and Trinci APJ, Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecliomycetes farinosus* in liquid and solid media. *J Gen Microbiol* **133**:247–252 (1987).
26. Li J and Feng MG, Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycol Res* **113**:93–99 (2009).
27. Jabbour R, Crowder DW, Aultman EA and Snyder WE, Entomopathogen biodiversity increases host mortality. *Biol Control* **59**:277–283 (2011).
28. Rangel DEN, Anderson AJ and Roberts DW, Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol Res* **112**:1362–1372 (2008).