



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

---

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

**Expresión diferencial de genes asociados a la  
conidiación en hongos entomopatógenos en  
cultivo sólido bajo estado oxidante**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

**I.B.I LOZANO VERDEL SAYURI ATZIN**

DIRECTOR: **Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL**

ASESORES: **Dr. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ**

**Dra. MARÍA GABRIELA MEDINA CANALES**

**JULIO 2018**

**“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma  
Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de  
Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia  
001465”**

Ciudad de México a 20 de julio de 2018

## **Acta de aprobación de tesis**

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

**“Expresión diferencial de genes asociados a la conidiación en hongos entomopatógenos en cultivo sólido bajo estado oxidante”**

que presentó:

**I.B.I Sayuri Atzin Lozano Verdel**

### **Comité Tutorial:**

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

**Asesor:** Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez-Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Asesor:** Dra. María Gabriela Medina Canales-Instituto Politécnico Nacional-ESCA Santo Tomás

### **Jurado:**

**Presidente:** Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

\_\_\_\_\_

**Secretario:** Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dra. María Gabriela Medina Canales

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

## Agradecimientos

A mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias por confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por cuidarme en esas agotadoras noches de estudio con deliciosos cafés y frutas: gracias a mi padre por siempre desear lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida; gracias muchos de mis logros se los debo a ustedes incluyendo este.

Gracias a mi esposo por creer en mi capacidad, por su comprensión, cariño, amor y compañía incluso en los momentos más turbulentos, a mi hijo por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más.

Gracias a mi hermana, tú eres el espejo en el cual me quiero reflejar pues tus virtudes y cualidades me llevan a admirarte cada día más, gracias a mi sobrino por ser mi pareja de estudio y a tí hermano por enseñarme a luchar aun en los peores momentos.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Octavio Loera Corral por haberme aceptado ser parte de su grupo de laboratorio, por sus asesorías, por compartir su conocimiento, por guiarme en todo el desarrollo de la tesis, por su tiempo y por su apoyo para seguir adelante de verdad muchas gracias Dr.

Agradezco a mi asesor de tesis el Dr. Francisco Figueroa Martínez por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme en todo el desarrollo de la tesis gracias Dr., a mi asesora de tesis Dra. Gabriela Medina Canales por su valioso apoyo.

A Nohemí, Facundo, Jorge y Miguel quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus técnicas y conocimiento gracias por su ayuda. A mi amigo Gerardo Suarez por su apoyo incondicional.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa la cual me abrió sus puertas para formarme profesionalmente y al CONACyT por la beca otorgada.

Gracias a la vida y a dios por este nuevo triunfo y por poner en mi camino a estar personas que me apoyaron y me ayudaron a concluir esta meta.

## Resumen

El anhelo de una menor dependencia de los plaguicidas químicos alimenta el interés en medios alternativos para el control de plagas, como el uso de patógenos de origen natural para el control de plagas que son responsables de millones de muertes y pérdidas económicas significativas en todo el mundo. *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* son los hongos entomopatógenos (HE) o patógenos de insectos más ampliamente estudiados, tienen una amplia gama de objetivos que abarcan la mayoría de los órdenes de insectos (Lepidoptera, Coleoptera, Himenópteros, Diptera y otros) y algunos arácnidos (garrapatas y ácaros) (Ruíz-Corral et al., 2013; Alatorre-Rosas, 2007). La eficiencia en campo de estos HE se ve afectada principalmente por las condiciones climáticas a las que se les expone (temperatura, humedad, radiación ultravioleta), por lo que los avances recientes se han enfocado en la ingeniería genética de estos hongos con el objetivo de aumentar su virulencia y resistencia a factores abióticos (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Dado que los conidios de estos HE son las unidades infectivas, se han utilizado estrategias para mejorar la producción de conidios, como la utilización de sistemas en cultivo sólido, implementación de texturizantes y, en nuestro grupo de trabajo, se han implantado la modificación atmosférica en la producción de conidios de HE, que ha mejorado la producción de conidios y mantenido la calidad de los mismos (Tlecuitl-Beristain et al., 2010; Muñiz-Paredes et al, 2017).

En este proyecto se evaluó el efecto que tiene enriquecer con  $O_2$  la atmósfera de cultivos en estado sólido de *Isaria javanica* CHE-CNRCB303, *Beauveria bassiana* Tac-1.1 y *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1. Se encontró que la producción de conidios en cultivo sólido con 26% de  $O_2$  (atmósfera enriquecida) de *I. javanica*, *B. bassiana* y *M. robertsii* fue mayor con respecto a la producción obtenida con 21% de  $O_2$  (atmósfera normal). El efecto del tratamiento no afectó la calidad de los conidios, pues en ambas condiciones experimentales no hubo diferencia significativa en la germinación de los conidios ( $P > 0.05$ ). El efecto de la atmósfera modificada sobre la viabilidad de los conidios fue diferente para cada cepa: en el caso de *I. javanica* la viabilidad no se ve afectada por efecto de los pulsos oxidantes ( $P > 0.05$ ), se observó incremento en la viabilidad de conidios de *M. robertsii* obtenidos en atmósfera oxidante ( $P < 0.05$ ), mientras que en el caso de *B. bassiana* los pulsos oxidantes mejoran la viabilidad de los conidios respecto a los conidios obtenidos en atmósfera normal sólo cuando estos se cosechan a las 192 h de cultivo ( $P < 0.05$ ), y no se observan diferencias significativas para esta cepa cuando los conidios se cosechan a las 144 h. En cuanto a la infectividad de los conidios, los conidios producidos con 26% de  $O_2$  afectó el tiempo en que alcanza el 50% de mortalidad ( $TL_{50}$ ) siendo mejor con 21% de  $O_2$  en las tres cepas de HE ( $P < 0.05$ ), pero la sobrevivencia final fue igual en ambos tratamientos ( $P > 0.05$ ).

Es notable que la producción de conidios de *I. javanica* cultivados en atmósfera modificada aumentó más de un orden de magnitud sin alterar los parámetros de calidad (germinación, viabilidad y infectividad) con respecto a los conidios obtenidos bajo una atmósfera normal; por estas razones se eligió a este hongo para estudiar la vía de formación de conidios de este patógeno de insectos en condiciones con atmósfera normal y enriquecida en oxígeno, con el objetivo de comprender las bases moleculares subyacentes al incremento en la producción de conidios observado cuando se les cultiva en estado sólido bajo una atmósfera oxidante, y lograr mejorar la producción de conidios aún más. Para esto se realizó un análisis de los niveles de expresión de genes reguladores de la conidiación en *I. javanica*.

Se identificaron los genes ortólogos a los genes *brlA* y *abaA* (reportados como genes reguladores de la conidiación en *Apergillus nidulans* y en *B. bassiana*) en el genoma de *I. javanica* (porcentaje de identidad de 81% y 76% respectivamente), y se determinaron sus niveles de expresión bajo condiciones de atmósfera normal y atmósfera enriquecida en oxígeno. Bajo condiciones de atmósfera normal, los niveles de expresión de los genes *brlA* y *abaA* concuerdan con las etapas de desarrollo de este HE: a las 68 h, cuando ya se observa abundancia de conidios ( $2.6 \times 10^7$  conidios/gss) en el medio, ya era alta la expresión de *brlA* y *abaA*; a las 96 h de cultivo, donde ya se observa mayor abundancia de conidios que de micelio, se encontró la máxima expresión de *brlA* y *abaA* (cuatro veces más que a las 68h en condiciones normales de  $O_2$ ); a las 144 h de cultivo, en donde se observa la máxima producción conidios en condiciones normales de  $O_2$  ( $2.6 \times 10^8$  conidios/gss), y a las 192 h, tiempo en el que ya está reportado la presencia de conidióforos y conidios maduros en este HE (Castillo-Minjares, 2015), la expresión de estos genes comenzó a descender (nivel de transcripción relativa de 0.1). Por otro lado, cuando el HE se cultiva bajo una atmósfera oxidante, se observó que los máximos niveles de expresión de los genes *brlA* y *abaA* se desplazaron hasta las 144 h y la máxima producción de conidios ( $2.4 \times 10^9$  conidios/gss), también se desplazó hasta las 192 h. Se encontró que los pulsos de oxígeno aplicados no incrementaron la expresión de los genes reguladores de la conidiación, dado que la expresión de *brlA* disminuyó 13.4 veces y *abaA* se mantiene a los mismos niveles de expresión que los niveles de expresión observados antes de aplicar los pulsos de oxígeno es decir a las 68 h (por lo que se sugiere la activación de un inhibidor de la conidiación en respuesta al estrés), sin embargo sí podrían estar correlacionados con el aumento de la producción como se presenta en este trabajo.

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Control biológico.....	1
1.2 Hongos entomopatógenos.....	2
1.3 Producción de conidios de hongos entomopatógenos .....	6
1.4 Estrés oxidante.....	8
1.5 Proceso de conidiación .....	10
1.6 Cuantificación de la expresión diferencial de genes.....	14
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>20</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
5.1 Objetivo general .....	20
5.2 Objetivos particulares .....	20
<b>6. Diagrama de estrategia experimental</b> .....	<b>21</b>
<b>7. Metodología</b> .....	<b>22</b>
7.1 Microorganismos .....	22
7.2 Conservación de las cepas.....	22
7.3 Propagación de las cepas .....	22
7.4 Cultivo sólido .....	23
7.5 Modificación Atmosférica.....	23
7.6 Producción de conidios .....	24
7.7 Pruebas de calidad de conidios.....	24
7.7.1 Germinación.....	24
7.7.2 Viabilidad .....	24

7.7.3	Bioensayo .....	25
7.8	Análisis de expresión diferencial .....	26
7.8.1	Búsqueda <i>in silico</i> de genes reguladores de la conidiación en hongos .....	26
7.8.2	Diseño <i>in silico</i> de oligonucleótidos y sondas para multiplex RT-qPCR .....	26
7.8.3	Extracción de ARN y Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	26
7.8.4	Multiplex RT-qPCR .....	27
7.9	Análisis estadístico .....	28
<b>8.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
8.1	Producción de conidios .....	29
8.2	Pruebas de calidad de conidios.....	31
8.2.1	Germinación y Viabilidad .....	31
8.2.2	Bioensayo .....	34
8.3	Análisis de expresión diferencial .....	37
8.3.1	Búsqueda <i>in silico</i> de genes reguladores de la conidiación en hongos .....	37
8.3.2	Diseño de oligonucleótidos y sondas para multiplex RT-qPCR .....	38
8.3.3	Extracción de ARN y Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	40
8.3.4	Multiplex RT-qPCR .....	41
<b>9.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>44</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>55</b>
<b>11.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>56</b>
<b>12.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>57</b>
Anexo 1	.....	66
Anexo 2	.....	67
Anexo 3	.....	68
Anexo 4	.....	75



# 1. Introducción

## 1.1 Control biológico

A principios de 1970 surgió el concepto de manejo integrado de plagas (MIP), en respuesta a la contaminación del medio ambiente y a la afectación de comunidades causadas por el uso de los plaguicidas. De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el MIP se define como las técnicas que ayudan a combatir las plagas, disminuyendo el desarrollo de estas poblaciones, que son económicamente rentables y que a su vez no tengan repercusiones en la salud humana ni el ambiente (Fischbein, 2013; Unlu-Levent et al., 2012). Una de las técnicas aprobadas para el control de plagas es el control biológico (CB), que es una alternativa viable para sustituir el uso de plaguicidas que están ocasionando severos daños al ambiente, incluyendo la contaminación del agua, suelo y aire, muerte de organismos benéficos, daño a los seres humanos y un nuevo problema que es el constante incremento de plagas resistentes a estos plaguicidas químicos (Hernández-Antonio et al., 2011).

El CB se puede definir como el uso de organismos vivos (agentes de control biológico) que se consideran enemigos naturales (patógenos, parásitos, depredadores, etc.) de un organismo plaga, con el objetivo de reducir la densidad de población o el impacto de un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante o menos dañino (Eilenberg et al., 2001). El CB es una técnica eficiente para el control de plagas tanto a mediano como a largo plazo y tiene un bajo riesgo ambiental, además de que no tiene ningún efecto adverso sobre la salud humana. Los agentes de control biológico son altamente específicos a una plaga particular, la resistencia de las plagas al control biológico es muy rara y la relación costo/beneficio es muy favorable; sin embargo, la eficiencia de estos agentes de control biológico depende de las propiedades biológicas y de la especificidad hacia el insecto plaga, así como también de las condiciones ambientales donde sean implementados (Summy y French, 1988; Manley et al., 2001; Jiménez-Edgardo, 2009).

Entre los agentes de control biológico más utilizados para el control de plagas se encuentran organismo como parásitos, depredadores y patógenos del organismo plaga que se desea combatir (Alatorre-Rosas, 2007); hablando de organismo patógenos, se tiene conocimiento de que existen alrededor de 2,000 especies de microorganismos entomopatógenos, entre los que se encuentran 750 especies de hongos (Candas y Bulla, 2003). La implementación de estos microorganismos entomopatógenos como agentes de control biológico es una estrategia válida para restaurar la biodiversidad funcional en ecosistemas agrícolas (Barrera, 2007). El presente trabajo estará enfocado en el estudio de organismos patógenos, específicamente en hongos patógenos de insectos o entomopatógenos (HE).

## **1.2 Hongos entomopatógenos**

El comercio mundial de productos agrícolas se calcula en unos 100 mil millones de dólares al año, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (ONU) (2015), y el 80% de esta cifra son alimentos que suelen sufrir afectaciones por plagas o enfermedades de las plantas. Tan solo en México se pierde el 37% de los alimentos que se producen en el campo a causa de insectos, plagas, malezas y hongos, lo que se traduce en 10 millones 431 mil toneladas de alimentos desperdiciados al año de acuerdo a lo publicado por Matías Correch responsable de la División Crop Science de Bayer de México (Roció-Méndez, 2016).

Los HE son una alternativa viable para regular plagas debido a que existe una gran variedad de especies de insectos plaga de importancia económica, que son susceptibles a infecciones por estos hongos. Algunos ejemplos de insectos de importancia económica en México que son susceptibles a HE son: la mosquita blanca, mosca de la fruta, picudo del chile, pulgón del algodón, picudo negro, gusano de la raíz del maíz, chicharritas y chinches (Ruíz-Corral et al., 2013; Alatorre-Rosas, 2007). La implementación de hongos entomopatógenos para el control de plagas no sólo ayudaría a reducir el uso de químicos para el control de plagas, si no también reduciría el porcentaje de pérdidas de alimentos que se tienen en nuestro país.

Se han encontrado alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos reunidas en 100 géneros. Solamente cerca de 12 especies o subespecies de los hongos se han utilizado como ingredientes activos de micoinsecticidas (productos formulados con HE) (Faria y Wraight, 2007; Carballo y Guharay, 2004; Muñiz-Paredes et al., 2017). De acuerdo a Candas y Bulla (2003), los tres principales géneros de HE usados en la actualidad para el control de insectos plagas son *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*. En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de los hongos entomopatógenos más comercializados pertenecientes a estos géneros los cuales son objeto de estudio de este trabajo.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *M. robertsii*, *I. javanica* y *B. bassiana* de acuerdo al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés).

División	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Metarhizium</i>	<i>robertsii</i>
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Isaria</i>	<i>javanica</i>
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>

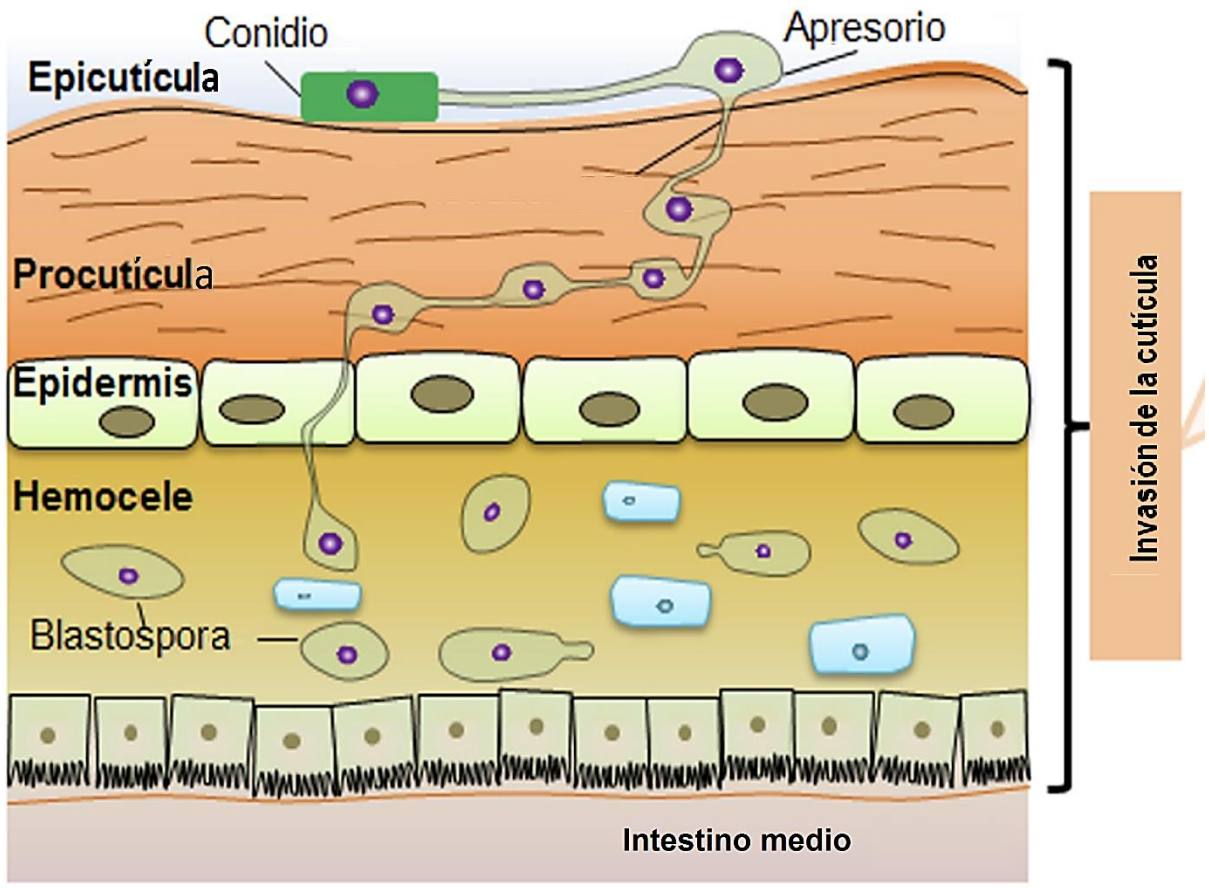
Los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesitan ser ingeridos por el insecto para ejercer su efecto insecticida (Pucheta-Diaz et al., 2006). El proceso infectivo del hongo entomopatógeno (Figura 1) inicia cuando los conidios entran en contacto con un insecto susceptible; cuando los conidios tienen las condiciones climáticas (temperatura, humedad, radiación ultravioleta) y nutricionales adecuadas, así como un hospedero susceptible de ser infectado, los conidios comienzan su ciclo de desarrollo; en términos generales éste inicia con la adhesión de los conidios a la cutícula de insecto para luego germinar y penetrar al interior del cuerpo del insecto; posteriormente comienza la colonización y reproducción del HE, además de la producción de toxinas que provocan la muerte del insecto; finalmente, ocurre la liberación de nuevos conidios y se repite el ciclo (Tanada y Kaya, 1993; Thomas y Read, 2007).

El primer paso del ciclo de infección de los HE comienza con la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto plaga, mediada por interacciones hidrofóbicas entre la superficie del insecto y la pared celular de los conidios, esto se logra porque las paredes de los conidios son ásperas, gruesas y frecuentemente tienen presencia de proteínas hidrofobinas, adhesinas y  $\beta$ - glucanos (Wang y Leger, 2007; Ibrahim et al., 2002; Muñiz-Paredes, 2016). Se ha observado que cuando los conidios se producen utilizando cultivos sólidos o bifásicos, estos presentan mayor hidrofobicidad (Holder et al., 2007; López-Perez et al., 2015). Las adhesinas se unen de forma específicas a la cutícula del insecto, se ha visto que su eliminación provoca una disminución en la infectividad del conidio, por lo que las adhesinas son consideradas como factores de virulencia (Wang y Leger, 2007; Muñiz-Paredes, 2016).

Una vez que el conidio se ha adherido comienza el proceso de germinación, que es el crecimiento de un tubo germinativo sobre la superficie de la cutícula. La rápida germinación de los conidios puede ser una ventaja, ya que evita la exposición del hongo a ambientes que pueden ser adversos para él y reduce la posibilidad de ser atacados por el sistema inmune del insecto (Tanada y Kaya, 1993; Humber, 2009). El proceso de penetración del tubo germinativo en el hospedero se da por la segregación de una gran variedad de enzimas líticas que debilitan la estructura de la cutícula, y se suman a la presión mecánica ejercida por el extremo de una hifa invasiva que forma un botón de penetración (apresorio) que deforma la capa cuticular debido a la presión ejercida por el túbulo germinativo. Entre las proteínas líticas que se han identificado se encuentran esterasas, proteasas, quitinasas, lipasas y lipooxigenasas (Kershaw y Talbot 1998; Monzon, 2001, Montesinos-Matías et al., 2011). Tanto la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto, como la germinación del conidio pueden ser afectadas por factores abióticos como la temperatura, la humedad y la luz solar (Ortiz-Urquiza et al., 2015).

Por último viene la fase de colonización y reproducción, en esta fase del ciclo las hifas se hinchan y ramifican dentro del tejido del insecto hasta llegar al hemocele, donde se da la colonización en forma de blastosporas que germinan y forman pequeñas colonias; se da la liberación de toxinas lo que provoca la muerte del insecto (García-García et al., 2008). El papel de las toxinas en el proceso de patogénesis es entre otros actuar como

inhibidores de las reacciones de defensa del hospedero (López et al., 1994). Después de muerto el insecto y al agotarse los nutrientes disponibles, los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver del insecto produciendo inóculo para infectar a otros insectos (Lomer et al., 2001).



**Fig 1.** Proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos (Zhao et al., 2016 modificada).

El uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico puede ser tan prometedor como el uso de cualquier otro insecticida, incluso mejor ya que al ser productos basados en organismos vivos, no contaminan el ambiente, tampoco producen riesgo de intoxicaciones para los agricultores, ni a animales domésticos como lo hacen los productos químicos convencionales. Además los HE de control son específicos contra las plagas y permiten obtener productos agrícolas libres de residuos tóxicos; finalmente, el uso de HE para el control de plagas puede resultar menos costoso que el uso de agentes químicos, tanto para el país como para los usuarios (Khan-Sehroon et al., 2012).

### **1.3 Producción de conidios de hongos entomopatógenos**

Como se mencionó antes, el primer paso del ciclo de infección de los HE es la adhesión de sus unidades infectivas, los conidios, a la cutícula del insecto. La eficacia de la adhesión de los conidios depende de sus características fenotípicas y éstas a su vez están determinadas por las condiciones de producción. Estas unidades infectivas pueden producirse tanto en medio sólido como en medio líquido. Existen varios problemas asociados con la producción de conidios en medio líquido, incluyendo la baja resistencia de éstos, los conidios, a temperaturas altas (factor abiótico importante), la sensibilidad a los procesos de secado y la vida útil corta, por estas razones los conidios de HE son principalmente producidos en cultivo en medio sólido (CMS) (Miranda-Hernández et al., 2017), en donde se han logrado obtener rendimientos máximos de  $10^9$  conidios por gramo de sustrato seco (Holder et al., 2007; López-Perez et al., 2015; Muñiz-Paredes et al., 2017). La producción de conidios en CMS presenta varias ventajas comparado con cultivo en medio líquido; por ejemplo, el CMS tiene un bajo requerimiento de energía, se asemeja a las condiciones de crecimiento natural de los HE, permite una alta recuperación de conidios, y los factores abióticos como temperatura, pH, oxigenación son más sencillos de controlar, lo que favorece el crecimiento de estos organismos; otras ventajas son que en el CMS no se requiere maquinaria compleja y además se reduce considerablemente el riesgo de contaminación debido a que la actividad de agua es menor (con respecto al cultivo líquido) (Pandey, 2003; Tunga et al., 1998; Ruíz-Leza et al., 2007).

El CMS implica el crecimiento de microorganismo sobre partículas de sustrato sólido que actúan como soporte y como fuente de carbono; el sustrato más utilizado para la producción de conidios de HE ha sido el arroz, muchas veces combinado con otros sustratos naturales para brindar el equilibrio nutricional que requieren los HE (Mitchell et al., 2000; Bhargav et al., 2008; Jenkins et al., 1998). Sin embargo, también se han utilizado algunos otros sustratos sólidos como se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Algunos sustratos sólidos que se utilizan para CMS.

Sustrato sólido	Hongo entomopatógenos	Rendimiento de conidios	
Salvado de trigo y paja de arroz	<i>Beauveria bassiana</i>	1.2 x 10 <sup>10*</sup>	Kang et al., 2005
Arroz		9.4 x 10 <sup>8**</sup>	Jongjangklang et al., 2011
Residuos de papa y bagazo de caña		1.0 x 10 <sup>10*</sup>	Dalla-Santa et al., 2004
Arroz precocido	<i>Metarhizium anisopliae</i>	2.7 x 10 <sup>8*</sup>	Ángel-Cuapio, 2011
Arroz y avena		1.9 x 10 <sup>9*</sup>	Gómez-Preciado, 2014
Arroz y avena	<i>Isaria javanica</i>	2.6 x 10 <sup>9*</sup>	Muñiz-Paredes, 2016
*Conidios por gramo de sustrato seco inicial		**Conidios por gramo de sustrato húmedo	

En cuanto a la comercialización la mayoría de los micoinsecticidas comercialmente disponibles se basan principalmente en cuatro especies: *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea* y *B. brongniartii* (Faria y Wraight, 2007; Miranda-Hernández et al., 2017). En nuestro país, es cada vez más amplia la comercialización y uso de bioinsecticidas basados en hongos entomopatógenos. En la Tabla 3 se enlistan algunos ejemplos de ellos.

**Tabla 3.** Hongos entomopatógenos comercializados en México (Muñiz-Paredes et al, 2016; Miranda-Hernández et al., 2017)

Agente de control biológico	Nombre del producto	Huéspedes	Compañía productora
<i>Beauveria bassiana</i>	Bea-Sin	Lepidópteros	Agrobionsa (Sinaloa)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Pae-Sin	Mosquita blanca	Agrobionsa (Sinaloa)
<i>Lecanicillium</i> sp.	Verti-Sin	Afídidos, Thripidae	Agrobionsa (Sinaloa)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Fitosan-M	<i>Phyllophaga</i> spp.	Centro de Sanidad Vegetal de Guanajuato
Mix <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> , <i>I. fumosorosea</i>	Tri-Sin	Psílidos	Agrobionsa (Sinaloa)

Actualmente la industria de biopesticidas (especie de plaguicida basada en el uso de microorganismos o productos naturales) representa una fracción muy pequeña del mercado mundial de pesticidas, puesto que sólo el 2% de los cultivos globales utiliza biopesticidas para el control de plagas. En México la baja comercialización de biopesticidas se debe al poco interés en el uso de productos biológicos en lugar de productos químicos. Para incrementar el consumo de biopesticidas se requiere de mayor investigación científica que logre una oferta de productos biológicos más eficientes en las condiciones de uso y genere una alternativa real a la problemática del uso excesivo de compuestos químicos en la agricultura (McDougall, 2010; Miranda-Hernández et al., 2017).

#### **1.4 Estrés oxidante**

Cualquier organismo vivo requiere factores ambientales óptimos (pH, presión atmosférica, radiación, temperatura, osmolaridad, disponibilidad o no de oxígeno, entre otros) que garanticen su crecimiento. Cuando se somete un organismo vivo a un estrés, es decir un cambio pequeño o extremo en cualquiera de estos factores, pone en peligro su desarrollo e incluso su supervivencia, esto es puede aumentar o disminuir la tasa de crecimiento (Ruis y Schüller, 1995).

Uno de los factores ambientales críticos para el desarrollo de los microorganismos es el oxígeno, elemento presente en forma de dioxígeno ( $O_2$ ) al 21% en la atmósfera. En la célula, el oxígeno entra por difusión y es reducido casi por completo a agua ( $H_2O$ ). Mientras se mantiene un equilibrio entre la entrada de oxígeno y su reducción, el estado de crecimiento es estable; sin embargo, cuando la célula no puede reducir todo el oxígeno intracelular se genera un estado hiperoxidante, provocado por un desequilibrio entre agentes oxidantes y la capacidad de los organismos para eliminarlos, denominado estrés oxidante (Hansberg, 2002). Bajo condiciones fisiológicas normales, aproximadamente 1-5% del oxígeno consumido por la mitocondria es convertido a aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno (ERO) (Breyer, 2011);



cuando se produce un incremento significativo en la cantidad de ERO o ROS (por sus siglas en inglés) dentro de la célula, causado principalmente por un desbalance de la capacidad antioxidante o por una deficiencia en los sistemas antioxidantes que controlan los niveles de ERO, se genera un estado de estrés oxidante (Kim et al., 2009). Los sistemas antioxidantes que controlan o evitan el daño que provocan las ERO a la célula pueden ser tanto enzimáticos como no enzimáticos. Dentro de los mecanismos enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasas (SOD) y las catalasas. En cuanto a las respuestas no enzimáticas existen moléculas que secuestran a las ERO, tales como algunos carotenoides ( $\beta$ -caroteno, licopeno), el ácido ascórbico (vitamina C), manitol, entre otros compuestos orgánicos (Aguirre et al., 2005; Kim et al., 2009).

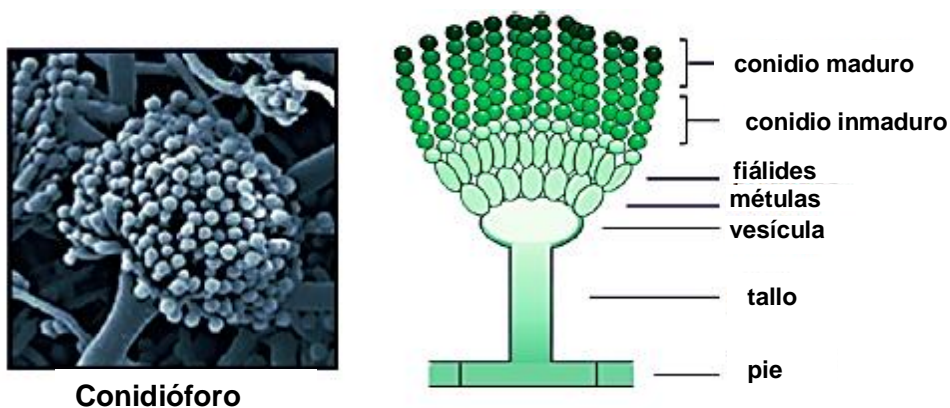
Los hongos continuamente están expuestos a un estrés oxidante en su entorno, dado que la limitación de nutrientes, toxinas químicas, los cambios bruscos de temperatura, la oxigenación y su propio metabolismo causan un incremento de las condiciones oxidantes que aumentan las ERO (Aguirre et al., 2005); sin embargo la generación de ERO no sólo está asociada a daño celular, sino que bajo ciertas concentraciones estas ERO funcionan como señalizadores de regulación en diversos procesos celulares asociadas a la diferenciación, muerte y proliferación (Beltrán-García et al., 2006; Bedard y Krause, 2007).

El efecto de las ERO ha sido muy estudiado en *Neurospora crassa*, en el cual se observó que al inicio de las diferentes fases de su desarrollo ocurren cambios en el estado redox que contribuye directamente en la germinación de las esporas, la formación del micelio aéreo y de las estructuras reproductivas del hongo (Hansberg et al., 1993). En HE se ha estudiado, desde el punto de vista de la biotecnología, el efecto del estrés oxidante ocasionado por las condiciones ricas en oxígeno y se ha asociado con el incremento en la producción, la germinación, viabilidad, infectividad y algunos otros parámetros de los conidios, como resistencia a la temperatura. Por ejemplo, Miranda-Hernández (2014) encontró que “la atmósfera (enriquecida) con 26% O<sub>2</sub> causó efectos en la calidad de los hongos entomopatógenos”, en *I. fumosorosea* la atmósfera enriquecida propició un incremento en la infectividad, resistencia a altas temperaturas, germinación y resistencia

a condiciones de hiperosmolaridad, mientras que en *M. anisopliae* los conidios producidos bajo atmósfera enriquecida en oxígeno tuvieron mayor resistencia a altas temperaturas, y los conidios de *B. bassiana* eran resistentes a condiciones de hiperosmolaridad e hiperoxidantes. García-Ortiz (2016) observó que el incremento en la concentración de oxígeno aplicado al cultivo de *M. anisopliae* “provocó cambios en el proteoma intracelular” asociados con los cambios en la calidad de los conidios producidos, es decir que las proteínas presentes en los conidios obtenidos con atmósfera enriquecida en oxígeno fueron diferentes a las presentes en conidios cultivados bajo una atmósfera normal (21 % O<sub>2</sub>). Garza-López et al 2012, también encontraron cambios en conidiación y germinación, así como estrés oxidante bajo condiciones hipo e hiperoxidantes.

## 1.5 Proceso de conidiación

La esporulación asexual es el modo de reproducción más común de los hongos; el proceso, está perfectamente sincronizado y genéticamente programado, implica una estrecha comunicación intercelular, la regulación temporal y espacial de la expresión génica, y la diferenciación celular especializada (Adams et al., 1998; Ni et al., 2010). En el proceso de esporulación se producen esporas no-móviles llamados conidios o conidiosporas, estas se forman desde el vértice del conidióforo a través de la mitosis seguido de divisiones asimétricas. En el caso de *Aspergillus nidulans* (uno de los organismos en los que se ha estudiado la esporulación con mayor detalle) la formación de conidióforos comienza con la ramificación de las células de paredes gruesas del pie del conidióforo para formar un tallo aéreo, la punta del tallo comienza a hincharse, de manera que se forma una vesícula, luego en la superficie de esta vesícula se forman dos capas de esterigmas (métulas y fiálides), y por último en las fiálides se da una división mitótica para generar cadenas de conidios, que luego experimentan un proceso de maduración como modificación de la pared conidial (Figura 2) (Adams et al., 1998; Ebbole, 2010; Yu, 2010).



**Fig 2.** Conidióforo de *Aspergillus nidulans* (Park y Yu, 2012).

La esporulación asexual está controlada por diversos reguladores que dirigen la expresión de genes asociados con la formación conidióforo y la biogénesis de los conidios. Todo el proceso de producción de conidióforos está regulado genéticamente por múltiples activadores y represores que controlan la expresión coordinada de distintos conjuntos de genes, necesarios para la progresión de cada etapa de la conidiación (Yu, 2010; Park y Yu, 2016); en *A. nidulans* se ha propuesto una vía de regulación central que coordina todo el proceso de conidiación (Yu, 2010; Ni et al., 2010; Alkhayyat et al., 2015), que contiene tres elementos clave, los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* que controlan la expresión génica de la conidiación y determinan el orden de activación de genes durante la formación de conidióforos y la maduración de conidios.

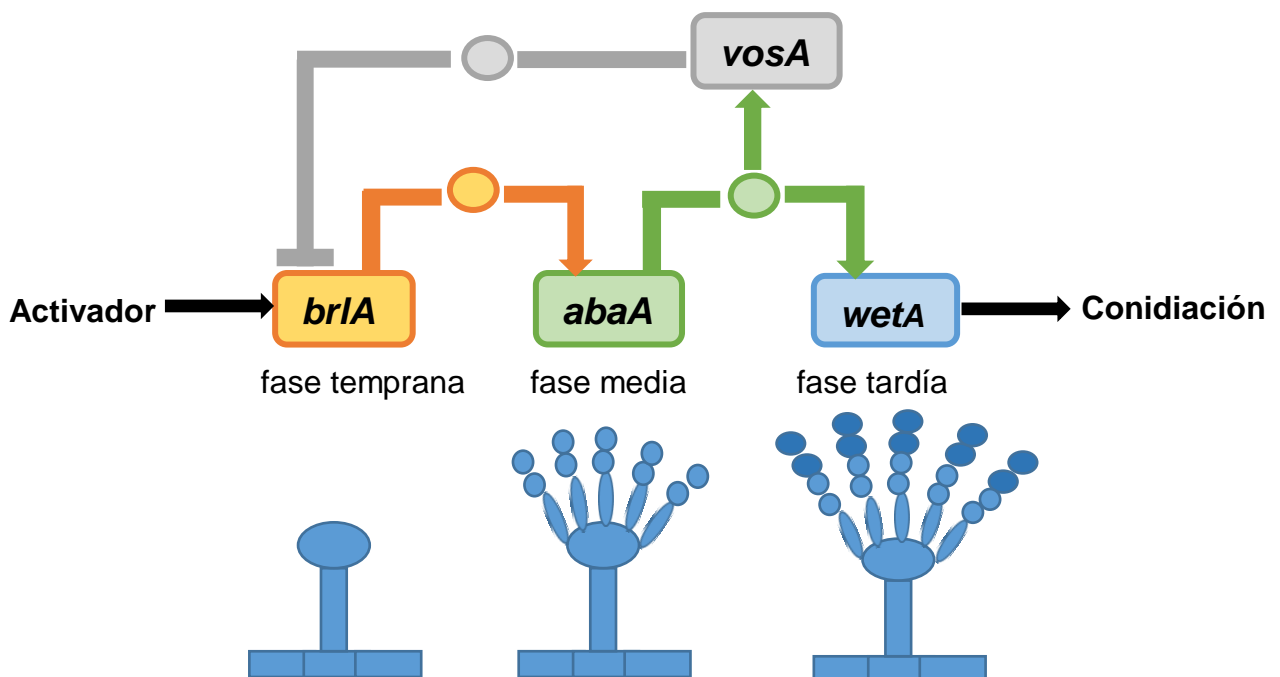
El gen *brlA* se expresa específicamente durante la fase temprana de conidiación y la activación de su transcripción es un paso esencial para la formación de conidióforos. Las mutantes nulas de *brlA* forman estructuras en forma de pelos o cerdas que producen un tallo alargado y no desarrollan vesículas o cualquier otra estructura posterior, por esta razón se les denominó “cepas *bristle*” (cerda, en español) (Mah y Yu, 2006; Alkhayyat et al., 2015). Por el contrario, la sobreexpresión del gen *brlA* en las células vegetativas conduce al cese del crecimiento y la formación de conidios viables directamente de las puntas de las hifas, lo que sugiere que el producto génico de *brlA* es esencial para la iniciación de la formación del tallo e hinchazón de la vesícula del conidióforo (Yu et al., 2010). Se ha demostrado que la expresión de *brlA* es necesaria y suficiente para inducir

la conidiación. La proteína BrlA contiene dos dominios de dedo de zinc; se localiza principalmente en vesículas y esterigma pero no en hifas o conidios, actúa como un activador transcripcional que controla los genes reguladores del desarrollo temprano (Yu et al., 2010).

La expresión del gen *abaA* es un factor clave para diferenciación y función de fiálides, y es activado por BrlA durante las etapas intermedias de desarrollo del conidióforo después de la diferenciación de mótulas. Un mutante nulo del gen *abaA* muestra un fenotipo denominado “*abacus*” (ábaco, en español), de hecho la ausencia de *abaA* causa la formación de conidióforos atípicos que tienen largas cadenas de células tipo cilindro sin conidios. El RNAm *abaA* se incrementa durante la fase media de desarrollo asexual y desaparece después de la formación de las fiálides. AbaA contiene un dominio de unión al ADN (ATTS/TEA) que regula la expresión de genes asociados con la fase tardía de la conidiación, incluyendo el gen *wetA*, por esta razón AbaA se considera un factor de transcripción (FT) de la fase tardía de la conidiación (Clutterbuck, 1969; Sewall, 1990; Park y Yu 2012).

La expresión del gen *wetA* es esencial para la finalización de la conidiación, este gen es inducido por AbaA en la fase media y tardía de la conidiación y su RNAm se acumula en conidios, lo que implica que *wetA* esté relacionado principalmente con la maduración de los conidios. La ausencia de *wetA* resulta en la formación de los conidios sin pigmentos con una pared celular defectuosa, un fenotipo denominado “*wet-white*”, además de que los conidios tienen baja viabilidad y tolerancia al estrés, lo que sugiere que *wetA* desempeña un papel crítico en la maduración de éstos (Sewall, 1990; Park y Yu, 2016, 2012). Es importante destacar que las funciones específicas de BrlA, AbaA y WetA en la conidiogénesis se conservan en muchos (si no todos) *Aspergillus* (Park y Yu, 2012).

En resumen, la expresión de *brlA* en las células vegetativas causa la terminación del crecimiento vegetativo para dar comienzo con el proceso de conidiación. El gen *brlA* es activado por elementos de inducción temprana (“*fluffy*”) y codifica para un factor de transcripción (activador BrlA); las secuencias consenso (5'-(C/A)(G/A)AGGG(G/A) -3') de los sitios de unión de este factor de transcripción (FT), están presentes en las regiones promotoras de los genes *abaA* y *wetA*, lo que sugiere que BrlA directamente activa al gen *abaA*, por lo que la expresión de *abaA* depende de la activación de *brlA* (Adams et al., 1998). Sin embargo, se piensa que *abaA* y *wetA* de alguna manera regulan negativamente a *brlA*, puesto que en mutantes de  $\Delta abaA$  o  $\Delta wetA$ , el RNAm de *brlA* se acumula (Ni y Yu 2007; Aguirre, 1993). La regulación negativa de *brlA* podría implicar a la proteína velvet VosA (proteína de terciopelo), un regulador multifuncional que es activado por AbaA y una de sus funciones es la retroalimentación negativa de *brlA*. El FT AbaA se une a una secuencia consenso (5'-CATTCTY-3') que tienen algunos genes reguladores de la conidiación en las regiones promotoras incluyendo *wetA* y *brlA*, por lo que se sugiere que *abaA* induce la expresión de *brlA* en ciertos momentos de desarrollo; sin embargo, la interacción genética entre *abaA* y *brlA* sigue siendo compleja. La sobreexpresión de *abaA* activa a la expresión de *wetA* y la sobre expresión de *wetA* no da lugar a la activación de *brlA* o conduce a una conidiación precoz (Figura 3) (Yu, 2010, Fang et al., 2015).



**Fig 3.** Vía de regulación central de la conidiación en *A. nidulans*, donde las flechas indican activación, las líneas con barras indican inhibición y los círculos el producto proteico del gen.

En *B. bassiana* se han estudiado los perfiles de transcripción de esta vía de regulación central (Fang et al., 2015), y se encontró que la sobreexpresión de *brlA* activa a *abaA* y que ambos genes se mantienen transcripcionalmente activos durante el desarrollo asexual, de manera similar a lo observado para *A. nidulans* (Park y Yu, 2016, 2012); sin embargo, *wetA* se activó junto con *brlA*, es decir durante la fase temprana de conidiación, lo que indica que la sobreexpresión de *abaA* no controla la activación de *wetA* como ocurre en *A. nidulans*. La comprensión de los mecanismos de regulación genética de la conidiación en HE inspirará nuevos enfoques para el desarrollo de micoinsecticidas, logrando productos de calidad basados en HE.

## 1.6 Cuantificación de la expresión diferencial de genes

El control de la expresión genética es el mecanismo por el cual un organismo regula los genes que se deben expresar en un momento dado, en respuesta a los requerimientos del organismo y a los cambios en el medio ambiente a los que se debe enfrentar. Para lograr esto existen varios mecanismos de regulación que controlan la expresión genética a diferentes niveles: desde la transcripción de genes y la maduración de los ARN mensajeros, hasta la síntesis de proteínas y sus modificaciones postraduccionales. La Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa y en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés) se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas en las áreas de la microbiología, la investigación médica, la biotecnología y las ciencias forenses para la detección y cuantificación de variaciones en la expresión genética, a nivel de transcripción, en respuesta a un estímulo dado (Reboucas-Emanuela et al., 2013).

La qPCR es una reacción enzimática *in vitro* que permite amplificar millones de veces una secuencia específica de ARN mensajero (ARN mensajero) o ADN complementario (ADNc, obtenido por retrotranscripción de ARN mensajero, técnica que se le conoce como RT-qPCR) durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia blanco o de interés se copia eficientemente, y el número de copias de la secuencia específica se puede detectar y cuantificar mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción, debido a que la

fluorescencia emitida en cada ciclo es proporcional al número de copias de la secuencia de interés (Mullis, 1990; Tamay et al., 2012). Por esta razón esta técnica permite evaluar y comparar la expresión diferencial de genes de manera cuantitativa o semi-cuantitativa bajo diferentes condiciones (Derveaux-Stefaan et al., 2009) y ha sido aplicada ampliamente en el estudio de la expresión génica en hongos entomopatógenos en distintas fases de su ciclo de vida (como germinación, conidiogénesis y patogénesis (Carneiro-Leao et al., 2011), en diversos medios de cultivo (Fang et al., 2015) y en la respuesta al estrés oxidante (Garza-López et al., 2015).

Por ejemplo, Garza-López et al. (2015) midió mediante qPCR, la expresión los genes *mpd* y *bbrgs1*, que están implicados en las respuesta antioxidante y esporulación de conidios de *B. bassiana*, respectivamente. La respuesta antioxidante es una protección ante las especies reactivas de oxígeno o ERO, que son una señal de inicio de la esporulación y como todo organismo tienen una respuesta ante estas ERO, una es la formación de manitol que sirve como aceptor de electrones, el gen *mpd* codifica la manitol-1-P deshidrogenasa enzima que participa en la biosíntesis de manitol. El gen *bbrgs1* codifica para una proteína G que se encarga de la percepción de estímulos ambientales y está relacionada con la conidiación de este HE; las proteínas G están implicadas en una vía de señalización que regula los genes relacionados con la conidiación en hongos filamentosos. La expresión de estos genes fue medida bajo distintas condiciones de cultivo, una en cultivos incubados en atmósfera normal (21% O<sub>2</sub>), y otras variando las condiciones atmosféricas, con concentraciones de oxígeno superiores e inferiores al 21% O<sub>2</sub> (atmósfera normal), encontrando que la concentración de manitol se correlacionó positivamente con la expresión diferencial del gen *mpd* y esta correlación fue más fuerte con atmósferas modificadas, es decir, a mayor concentración de O<sub>2</sub> mayor inducción del gen *mpd* y por el contrario, la modificación de la atmósfera afectó negativamente la expresión del gen *bbrgs1*, lo que confirma una correlación negativa entre la producción de conidios y la expresión del gen *bbrgs1*.

Otra aplicación de esta técnica en HE, es el estudio que realizó Fang et al., (2015), donde midieron la expresión de genes reguladores de la conidiación (*wetA*, *brlA*, *abaA* y *VosA*) en *B. bassiana* en diferentes medios de cultivo, utilizando qPCR. Carneiro-Leao et al. (2011) utilizaron esta técnica para medir el nivel de expresión relativa del gen *cag8* que está relacionado con la esporulación de *M. anisopliae*, durante la germinación, conidiogénesis y patogénesis.

El objetivo de la qPCR es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos amplificadas en cada ciclo mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción; estos reporteros fluorescentes pueden ser moléculas intercalantes como el SYBR Green, que tienen afinidad por el ADN (Ácido desoxirribonucleico) de doble cadena y que al ser oxidado generan una señal fluorescente que se capta en cada ciclo de la reacción, siendo proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. También se usan las sondas de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un *quencher*, (inhibidor de la fluorescencia del reportero a corta distancia), que se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando se produce la hibridación, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el *quencher*, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada en los sensores del equipo (Tamay et al., 2012).

Una ventaja de usar sondas específicas como sondas Taqman para la detección de productos amplificados es que permite amplificar simultáneamente en una única reacción de PCR diferentes secuencias de interés, dado que se pueden combinar varias sondas cada una marcada con un reportero con espectro de fluorescencia diferente al de los demás, lo que permite detectar paralelamente los niveles de expresión de diferentes genes de interés en una sola reacción; esto se conoce como multiplex qPCR y multiplex RT-qPCR si se parte de ADNc.



## 2. Antecedentes

Los hongos entomopatógenos más utilizados y comercializados para el control de plagas son *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea* (Alatorre-Rosas, 2007; Muñiz-Paredes et al., 2017). Se han estudiado y evaluado diversos medios de cultivo como superficial y sólido con el fin de incrementar la producción y calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos. En estos estudios ha destacado la implementación de medios de cultivo sólido como un sistema de producción de conidios, que a pesar de la heterogeneidad de los sustratos sólidos, con la utilización de medios de cultivo sólido se pueden obtener rendimientos competitivos de conidios que facilitan su aplicación en campo (Mitchell et al., 2000); por ejemplo, para *B. bassiana* cultivada sobre sustratos sólidos se han reportado valores máximos de producción de alrededor de  $10^9$  conidios por gramo de sustrato seco (López-Pérez et al., 2015).

Las condiciones de estrés moderado también han sido objeto de estudio para la producción de conidios; 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 reportó un mejora en la producción de conidios de *M. anisopliae*, al aumentar la concentración de oxígeno (26% O<sub>2</sub>) en cultivo superficial, esto comparado con la producción de conidios de este mismo hongo en una atmósfera normal (21% O<sub>2</sub>), además este incremento en producción de conidios no alteró los parámetros de calidad tales como la germinación y la infectividad de los conidios. Siguiendo con la implementación de pulsos oxidantes, Miranda-Hernández (2010), estudió el efecto de pulsos de 26% O<sub>2</sub> en la producción y calidad de los conidios de cuatro hongos entomopatógenos en medio superficial de harina de avena, encontrando que para *M. anisopliae* y uno de los aislados de *I. fumosorosea* ARSEF 3302, el tratamiento con 26% de O<sub>2</sub> propició una mayor producción de conidios respecto al tratamiento con atmósfera normal mientras que *B. bassiana* y el otro aislado de *I. fumosorosea* CNRCB1 tuvieron rendimientos más bajos en el tratamiento con atmósfera enriquecida en oxígeno respecto a la producción con atmósfera normal.

En una investigación reciente por Muñiz-Paredes (2016), se determinó que la relación entre el volumen del biorreactor y la cantidad de sustrato sólido es un factor importante a considerar, no sólo para cubrir la demanda de oxígeno y evitar alteraciones en los rendimientos de conidios, sino para poder estimular la producción de conidios de hongos entomopatógenos con pulsos de 26% O<sub>2</sub>. Por lo anterior, para tener un efecto positivo en los rendimientos de conidiación en cultivos sólidos, esta relación entre sustrato y espacio de cabeza considera una cantidad máxima de sustrato (48 mL de volumen por cada gramo de sustrato seco inicial), lo cual se tomará en cuenta para el presente proyecto.

En cuanto a los hongos entomopatógenos, la base molecular de las alteraciones en la producción y calidad de conidios no es tan clara debido a los pocos estudios que se han realizado. Los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* se han propuestos como una vía de regulación central que coordina la expresión de los genes involucrados en la formación y maduración de conidios y determinan el orden de activación de dichos genes durante la formación de conidióforos en el hongo filamentoso *A. nidulans* (Park y Yu, 2012). Por otra parte Fang et al., (2015) determinaron que *wetA*, *brlA*, *abaA* y la proteína VosA, son indispensables para la formación y maduración de conidios de *B. bassiana*, además de que VosA y WetA están implicados en la calidad de conidios, por lo que el estudio del orden de activación y los niveles de expresión de todos estos genes podrían tener un impacto en la efectividad del control biológico utilizando hongos filamentosos entomopatógenos contra insectos plaga.

### 3. Justificación

El consumo indiscriminado de sustancias químicas para el control de plagas representa un riesgo para la salud humana y para el ambiente, debido a la contaminación de suelos, agua, sedimentos y aire (Hernández-Antonio y Hansen-Anne, 2011). Ante esta problemática, surge el desarrollo de programas de control biológico con hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* que, además de ser amigables con el ambiente y no tener repercusiones en la salud del ser humano, resuelven el creciente problema de la resistencia que han adquirido muchos insectos plaga a los insecticidas químicos.

Hasta ahora se tiene conocimiento de que los principales factores que afectan la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos son el tipo de sistema de producción, la oxigenación y las variables de cultivo tales como la composición del medio de cultivo, contenido de humedad y pH de los sustratos (Rodríguez-Gómez et al., 2015; Miranda-Hernández et al., 2016). La mayor parte de estudios, donde se ha probado el efecto positivo de los pulsos de oxígeno en la producción o calidad de conidios, se han realizado en cultivos superficiales usando medios con agar, aptos para la propagación y para la obtención de cultivos semilla (Tlecuítl-Beristain et al., 2010; Miranda-Hernández et al., 2014), pero hay muy pocos estudios sobre el efecto de los pulsos oxidantes en la producción y calidad de conidios de HE en cultivo sólido (cultivo más utilizado para la producción de conidios a nivel industrial), y tampoco hay estudios dirigidos a la identificación de genes involucrados en dichos efectos y que podrían conducir al desarrollo de procesos de optimización por mutagénesis dirigida de genes específicos (López-Pérez et al., 2015).

Por lo anterior, la importancia de este trabajo radica en generar conocimiento acerca del efecto del estado oxidante sobre la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos obtenidos en cultivos sólidos (donde se obtienen los conidios de hongos entomopatógenos para su formulación y aplicación en campo), así como de los cambios en los niveles de expresión de genes reguladores de la conidiación. Los resultados ayudarán al desarrollo de un proceso de producción de conidios con la calidad requerida,

que contribuirá a que los hongos entomopatógenos, aislados y aclimatados a las zonas agrícolas de la Ciudad de México, se usen como agentes de control biológico, y de esta forma disminuir el uso excesivo de insecticidas químicos.

## **4. Hipótesis**

Los pulsos oxidantes (26% de O<sub>2</sub>) aplicados al cultivo sólido de hongos entomopatógenos incrementan la producción de conidios mediante el incremento en los niveles de expresión de los genes reguladores de la conidiación, *brlA*, *abaA* y *wetA*.

## **5. Objetivos**

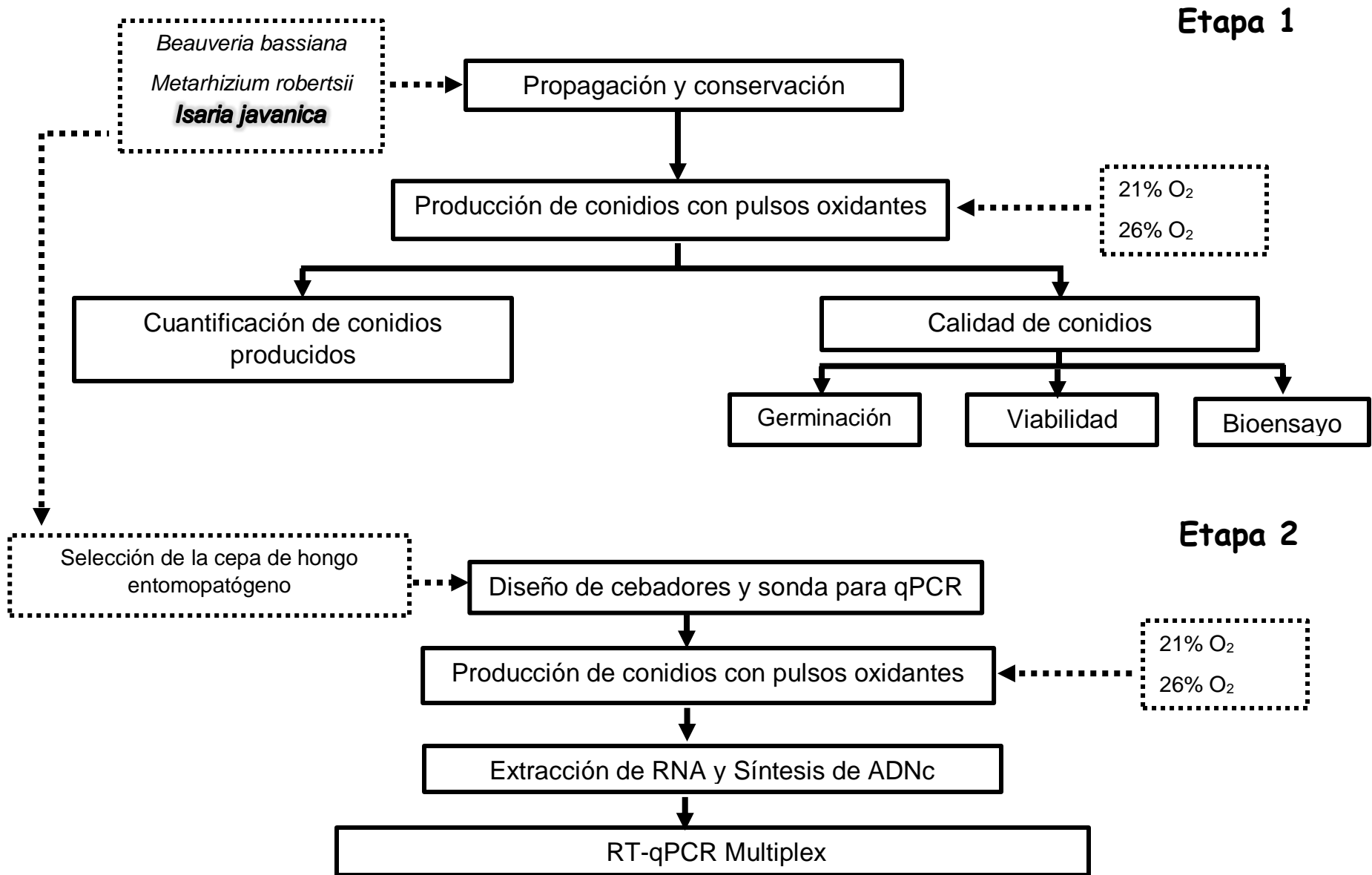
### **5.1 Objetivo general**

Determinar el efecto del estado oxidante en la producción y calidad de conidios de cepas de hongos entomopatógenos en cultivo sólido, así como los niveles de expresión de genes involucrados en la regulación de la conidiación.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Determinar el efecto de los pulsos oxidantes en cultivo sólido sobre la producción de conidios, usando distintas cepas de hongos entomopatógenos aisladas de la Ciudad de México (CDMX).
- Evaluar el efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios.
- Determinar las variaciones en los niveles de expresión de genes reguladores de la conidiación.

## 6. Diagrama de estrategia experimental



## **7. Metodología**

### **7.1 Microorganismos**

Las cepas utilizadas fueron *B. bassiana* Tac-1.1 aislada de cultivo de maíz en la delegación Tláhuac, CDMX, *M. robertsii* Xoch-8.1 obtenida de suelo de cultivo de maíz en la delegación Xochimilco, CDMX (Estefes Chávez, 2015) y por último *I. fumosorosea* CNRCB1 perteneciente al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Colima, México; cabe destacar que esta última cepa fue recientemente identificada por Gallou et al. (2016) como *I. javanica* CHE-CNRCB303, y así es como se presenta en este trabajo.

### **7.2 Conservación de las cepas**

Las cepas fueron sembradas en cajas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS marca Bioxon) a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 48 h con fotoperiodo luz-oscuridad de 12:12 h (Garza-López et al., 2012; Montesinos-Matías, 2008). Pasado el tiempo de incubación se recortaron colonias aisladas y se colocaron en cajas Petri con ADS durante 8 días, a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  con fotoperiodo luz-oscuridad de 12:12 h. Una vez obtenido el crecimiento radial, se recortaron trozos de agar de aproximadamente  $5 \text{ mm}^2$ , los cuales se depositaron en viales de vidrio con 4 mL de agua desionizada estéril y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  (López-Lastra et al., 2002).

### **7.3 Propagación de las cepas**

Para cada experimento se utilizó un vial, al cual se le adicionó 0.5 mL de Tween al 0.05%, este se agitó en el vórtex por 1 min y se tomó una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  para inocular 30 mL de medio harina de avena contenido en un matraz de 250 mL (Harina de avena 33.3 g/L, agar bacteriológico 15 g/L (Bioxon) y peptona de carne (Bioxon) 10 g/L) (Tlecuitl-Beristain et al., 2010). Posteriormente éstos se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 8 días con fotoperiodo luz-oscuridad de 12:12 h. Pasado el tiempo de incubación se obtuvieron suspensiones de conidios con una solución estéril de Tween 80 al 0.05% (20 mL) y agitación por 5 min.

## **7.4 Cultivo sólido**

La producción en cultivo sólido se hizo en botellas serológicas de 125 mL, a las cuales se les colocó el sustrato sólido que fue una mezcla de 1.25 g de arroz precocido (marca Verde Valle) y 1.25 g de avena (marca 1) y después esterilizadas a 121°C durante 15 min (Muñiz-Paredes, 2016). Por otra parte se preparó una suspensión estándar de  $1 \times 10^7$  conidios/mL que equivale a  $1 \times 10^6$  conidios por gramo de sustrato seco (conidios/gss) a partir de las obtenidas en la sección anterior (Propagación de las cepas); se tomaron alícuotas de 250  $\mu$ L para inocular las botellas serológicas, por último se ajustó la humedad al 40 % con agua destilada y se colocaron tapones de algodón en las botellas y se incubaron durante 8 días a  $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h (Garza-López et al., 2012; Muñiz-Paredes et al., 2016).

## **7.5 Modificación atmosférica**

El procedimiento se realizó tal cual se mencionó en el apartado de cultivo sólido, con la diferencia de que al tercer día de incubación de los cultivos en las botellas serológicas con el sustrato sólido (arroz-avena), se sustituyó el tapón de algodón por uno de goma para poder modificar la atmósfera a 26%  $\text{O}_2$ . Posteriormente se colocaron dos agujas, una para facilitar la salida de los gases y la segunda conectada al tanque que contenía la mezcla de 26% de  $\text{O}_2$  (Praxair, México) y se administró esta muestra gaseosa a los cultivos con flujo de 20  $\text{cm}^3/\text{s}$  durante 1 min (Garza-López et al., 2012; Tlecuitl-Beristain et al., 2010). Los recambios gaseosos se realizaron con intervalos de 12 h. Los cultivos se incubaron durante 8 días a  $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h (Muñiz-Paredes et al., 2016).

## **7.6 Producción de conidios**

La medición de la producción de conidios en cultivos con 21% de O<sub>2</sub> y 26% de O<sub>2</sub> se realizó a las 68, 96, 144 y 192 h de incubación. Se obtuvieron suspensiones de las botellas serológicas con 20 mL de solución Tween 80 al 0.05% con agitación por 10 min, posteriormente se hizo un filtrado con gasas (eliminación del sustrato sólido), finalmente se realizó el conteo de conidios en cámara de Neubauer para determinar la concentración de conidios (conidios/mL) y la producción de conidios/gss; (Muñiz-Paredes et al., 2016).

## **7.7 Pruebas de calidad de conidios**

### **7.7.1 Germinación**

Se determinó el porcentaje de germinación a los conidios producidos bajo 21% O<sub>2</sub> y 26% O<sub>2</sub> y cosechados a las 144 y 192 h de incubación. Para esta prueba se utilizaron cajas Petri que contenían 15 mL de 1.5% de Agar-Agua estéril (Samuels et al., 1989); se inocularon con 100 µL de las suspensiones de conidios con una concentración de 1×10<sup>6</sup> conidios/mL, para después dejarlas en incubación por 14 h a 28° ± 1°C (Miranda-Hernández et al., 2014; Muñiz-Paredes et al., 2016 con modificaciones en la concentración de conidios). Se cortaron pequeños trozos de agar (2 cm<sup>2</sup>) y se realizó el conteo de al menos 100 conidios para determinar el porcentaje de germinación, considerando un conidio germinado si la longitud del tubo germinal fue mayor que el diámetro de conidios (Ibrahim et al., 2002).

### **7.7.2 Viabilidad**

De igual forma la viabilidad de los conidios cosechados bajo 21% O<sub>2</sub> y 26% O<sub>2</sub>, se determinó a las 144 y 192 h. Para esta prueba se utilizaron cajas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud adicionado con 0.5 g/L desoxicolato de sodio las cuales fueron inoculadas con 30 µL de las suspensiones de conidios con una concentración 1×10<sup>4</sup> conidios/mL (equivalente a 300 conidios) y después incubadas a 28 °C durante 72 h con fotoperiodos



luz-oscuridad 12:12 h. Pasado el tiempo de incubación se hizo el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) y el resultado se expresó como % de viabilidad (Tlecuil-Beristain et al., 2010; Miranda-Hernández, 2010).

### 7.7.3 Bioensayo

La prueba de infectividad se realizó con conidios obtenidos a las 144 h de cultivo, ajustados en una suspensión de  $5 \times 10^7$  conidios/mL. Para *M. robertsii* y *B. bassiana* se utilizaron grupos de 12 larvas de *Tenebrio molitor*, para *I. javanica* grupos de 12 larvas de *Galleria mellonella*. Cada grupo de larvas fue sumergido en 20 mL de las suspensiones de conidios durante 15 s y depositadas en cajas Petri con alimento estéril, las cuales se colocaron en una caja de plástico transparente con papel filtro húmedo y estéril (cámara húmeda) y se incubaron a 28°C con fotoperiodos luz-oscuridad 12:12 h. Como tratamiento testigo, un grupo de larvas se sumergieron en Tween 80 al 0.05% (Muñiz-Paredes et al., 2016). El porcentaje de sobrevivencia se registró cada 24 h durante 10 días. Se corroboró que la muerte de la larva fuese ocasionada por la infección de los HE, colocando los insectos muertos en otras cajas Petri e incubadas bajo las mismas condiciones (28°C con foto periodos luz-oscuridad 12:12 h en cámara de húmedad), para promover el crecimiento del HE y poder confirmar la muerte de las larvas por micosis. Por último los resultados del porcentaje de sobrevivencia con respecto al tiempo de infección en días (d) se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial:

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

Donde:

Y = sobrevivencia en el tiempo t (%)

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

$t_0$  = tiempo de retardo en el que ocurre la primera muerte (d)

S = sobrevivencia final (%)

A partir del modelo se estimaron parámetros de calidad tales como: el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad ( $TL_{50}$ ), la velocidad específica de muerte (k) y el tiempo de retardo de muerte ( $t_0$ ) (Rodríguez-Gómez et al., 2009).

## **7.8 Análisis de expresión diferencial**

### **7.8.1 Búsqueda *in silico* de genes reguladores de la conidiación en hongos**

Se realizó un análisis *in silico* para encontrar la secuencia de nucleótidos de los genes ortólogos a los genes *wetA*, *brlA* y *abaA*, reportados como genes reguladores de la conidiación en *A. nidulans* y en *B. bassiana* (Anexo 1) en el genoma *I. javanica*. Las secuencias de las proteínas codificadas por los genes reguladores de la conidiación en *A. nidulans* y de *B. bassiana* se obtuvieron de la base de datos del Genbank, y se usaron para identificar la secuencia de nucleótidos de los genes reguladores de la conidiación en *I. javanica* por medio del programa tBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **7.8.2 Diseño *in silico* de oligonucleótidos y sondas para multiplex RT-qPCR**

El diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando las herramientas en línea del Genscript (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>) (Anexo 2) y el diseño de las sondas para multiplex RT-qPCR se realizó utilizando las herramientas de Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) (Anexo 4).

### **7.8.3 Extracción de ARN y Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

Se realizó la extracción de los conidios a partir de cultivos de HE cultivados con atmósfera normal y enriquecida a las 68, 96, 144 y 192 h, como se describe en el apartado de determinación de la producción de conidios; una vez obtenidas las suspensiones se centrifugaron a 8000 rpm por 15 min a -4°C y se desechó el sobrenadante. Posteriormente la lisis del paquete de conidios se realizó con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se procedió a la extracción y purificación del ARN con el RNeasy Plant Mini Kit (cat. # 74904, QIAGEN) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La integridad del ARN se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa (Aranda Patrick et al., 2012). El ADNc se sintetizó utilizando el kit QuantiTect Reverse Transcription (cat. # 205310, QIAGEN), que comprende dos pasos principales: eliminación del ADN genómico y transcripción inversa. Se partió de una solución de ARN de 500 ng/mL y se siguió el protocolo del fabricante; una vez sintetizado el ADNc, se cuantificó su concentración y pureza en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

#### 7.8.4 Multiplex RT-qPCR

La determinación de la expresión diferencial de los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* se hizo mediante RT-qPCR multiplex, para esto se utilizó el kit comercial Rotor-Gene Multiplex RT-PCR (cat. # 204772, QIAGEN); cabe mencionar que la cuantificación de la expresión de los genes en ambas condiciones experimentales fue relativa, utilizando como gen de referencia (gen housekeeping) el de beta-tubulina ( $\beta Tub$ ), diseñado por Miranda-Hernández (2014). Los componentes de la reacción de acuerdo al protocolo del fabricante para una multiplex qPCR de dos pasos, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4):

**Tabla 4.** Componente de cada reacción de qPCR.

Componentes		Volumen/Reacción ( $\mu\text{L}$ )	Concentración Final
Master Mix		12.5	1x
Mezcla de iniciadores/sonda	<i>brlA</i>	1.25	1x iniciador-sonda*
	<i>abaA</i>	1.25	
	<i>wetA</i>	1.25	
	$\beta tub$	1.25	
ADNC		5	100 ng/reacción
Agua (para un volumen final de 25 $\mu\text{L}$ )		2.5	

\*1x iniciadores-sonda esta mezcla consiste en: 10  $\mu\text{M}$  iniciador sentido, 10  $\mu\text{M}$  iniciador antisentido y 2.5  $\mu\text{M}$  sonda.

La reacción que sirvió como control negativo tenía todos los componentes de las reacciones a excepción de ADNC y como control positivo ADN genómico en vez de ADNc. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el equipo Rotor-Gene Q (Series Software versión 2.3.1 (Build 49), las condiciones de temperatura fueron las siguientes: la etapa de activación a 90°C por 5 min seguido de 40 ciclos de amplificación que incluían una desnaturalización 15 s a 95°C y una alineación 15 s a 57°C, la detección de la fluorescencia fue el canal verde (para *brlA*), amarillo (*abaA*), anaranjado (*wetA*) y rojo ( *$\beta$ tub*). El nivel de transcripción relativa (NTR) de cada gen se calculó a las 68, 96, 144 y 192 h de cultivo sólido, bajo condiciones normales y modificadas de oxígeno, usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak, 2001).

El NTR de cada gen se estimó como el nivel transcripción del gen en cuestión al tiempo de cosecha de los conidios con respecto al nivel de transcripción del mismo gen en conidios cosechados a las 68 h de cultivo para atmósfera normal (Figura 11b.1) y para atmósfera modificada (Figura 11b.2).

## 7.9 Análisis estadístico

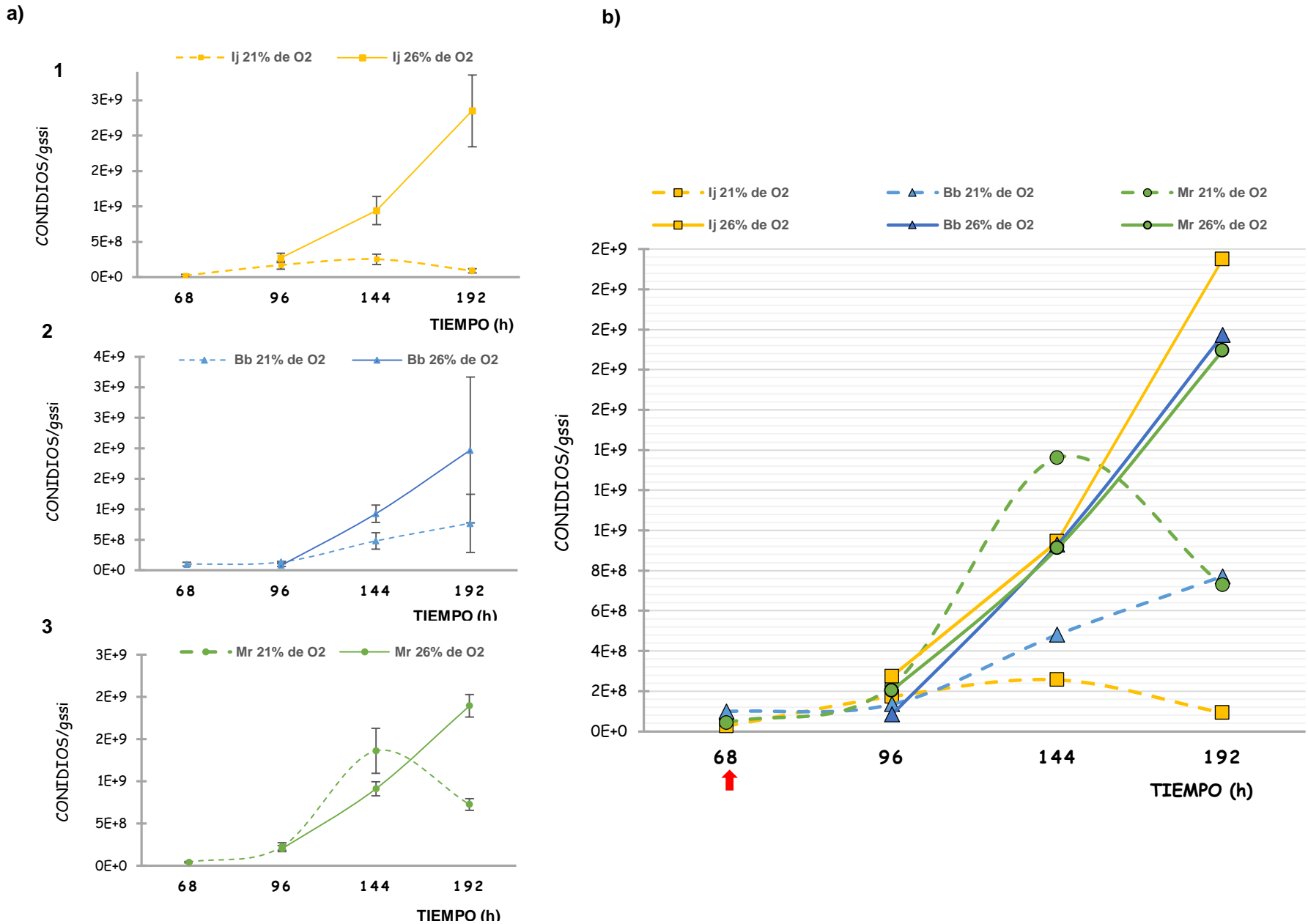
La comparación de medias de los datos obtenidos de producción y calidad de conidios se analizó mediante una prueba de *t* de Student, utilizando el programa SPSS 18.0 versión para Windows. El análisis estadístico para el ajuste de los datos al modelo logístico y de decaimiento exponencial fueron realizados en el programa SPSS 18.0; la comparación de los parámetros obtenidos de los modelos se hizo en el programa SigmaPlot 12.5 utilizando una *t* de Student, mientras que el análisis estadístico de los niveles expresión relativos se analizó mediante un ANOVA y una *t* de Student utilizando el programa SPSS 18.0 versión para Windows. Cabe mencionar que todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## 8. Resultados

### 8.1 Producción de conidios

Se midió la producción de conidios de *I. javanica*, *B. bassiana* y *M. robertsii* con el propósito de determinar el efecto que tiene el incremento de la concentración de oxígeno en la atmósfera en este parámetro. En la Figura 4a.1 se muestran los resultados obtenidos de la producción de conidios (conidios/gss<sub>i</sub>) de *I. javanica* a las 68, 96, 144 y 192 h de cultivo bajo atmósfera normal (21% de O<sub>2</sub>) y atmósfera enriquecida en oxígeno (26% de O<sub>2</sub>). Para esta cepa se observó que a las 92 h la producción de conidios fue notoria con ambos tratamientos, sin embargo no hay una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en la producción de conidios en las dos condiciones experimentales. Se logró observar una diferencia significativa en la producción de conidios a las 144 horas de cultivo, en donde el hongo cultivado en la atmósfera modificada incrementó su producción en 3.77 veces respecto al hongo cultivado en atmósfera normal. Esta diferencia fue aún más notoria a las 192 h de cultivo, en donde la producción de conidios con atmósfera modificada ( $2.35 \times 10^9$  conidios/gss<sub>i</sub>) aumentó más de un orden de magnitud con respecto a la atmósfera normal ( $9.22 \times 10^7$  conidios/gss<sub>i</sub>). Por otra parte el máximo de producción con 21% de O<sub>2</sub> y 26 % de O<sub>2</sub> fue a las 144 ( $2.56 \times 10^8$  conidios/gss<sub>i</sub>) y 192 h ( $2.35 \times 10^9$  conidios/gss<sub>i</sub>) respectivamente.

El aumento en la producción de conidios cuando se enriquece la atmósfera con pulsos de 26% de O<sub>2</sub> se observó de igual forma en *B. bassiana* (Figura 4a.2); la producción a las 192 h fue 2.6 veces mayor con atmósfera modificada con respecto a la atmósfera normal, sin embargo, no se logró observar diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). En cuanto a la producción de conidios de *M. robertsii* (Figura 4a.3), se observó una diferencia significativa en la producción a las 192 h de cultivo, siendo 2.6 veces mayor con 26 % de O<sub>2</sub>; el máximo de producción con atmósfera normal y atmósfera modificada fue a las 144 h ( $1.36 \times 10^9$  conidios/gss<sub>i</sub>) y 192 h ( $1.89 \times 10^9$  conidios/gss<sub>i</sub>) respectivamente, la productividad (conidios/gss<sub>i</sub>h) en estos puntos máximos de



**Fig 4.** a) Producción de conidios por gramo de sustrato seco inicial (ggs<sub>i</sub>) de *I. javanica* (Ij Fig. a1), *M. robertsii* (Mr Fig. a2) y *B. bassiana* (Bb Fig. a3). Líneas discontinuas = atmósfera normal y líneas continuas = atmósfera modificada. b) Producción de conidios de Ij, Bb y Mr, la fecha roja (a) indica el inicio de los pulsos enriquecidos con 26% de O<sub>2</sub>.

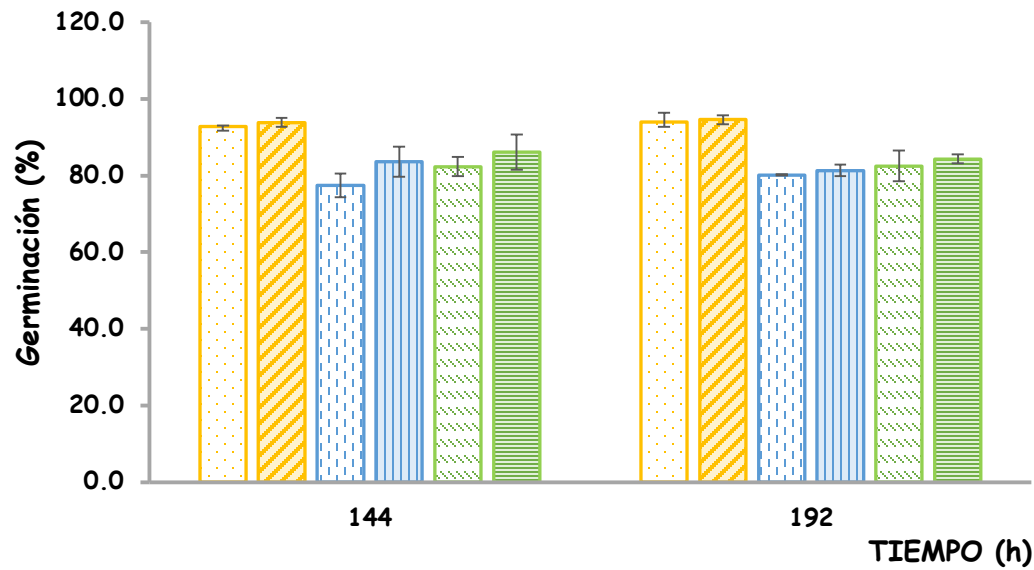
producción con atmósfera normal y modificada de esta cepa son de  $9.5 \times 10^6$  conidios/gss; h y  $9.9 \times 10^6$  conidios/gss h respectivamente, lo que está indicando que con el sistema con atmósfera enriquecida la productividad es ligeramente superior (cuatro porciento) con respecto a la atmósfera normal en *M. robertsii*.

En estos resultados de producción de conidios se puede observar que enriquecer la atmósfera con pulsos con 26% de O<sub>2</sub> incrementó la producción de las unidades infectivas de estos hongos, pero la magnitud del incremento varía dependiendo de la cepa; es decir, si comparamos los puntos máximos de producción de estos hongos con atmósfera enriquecida a las 192 h la producción de conidios en *I. javanica* es 1.24 veces mayor con respecto a la producción de *M. robertsii* y con respecto a la producción de *B. bassiana* es 1.19 veces mayor como se puede ver en la Figura 4b.

## **8.2 Pruebas de calidad de conidios**

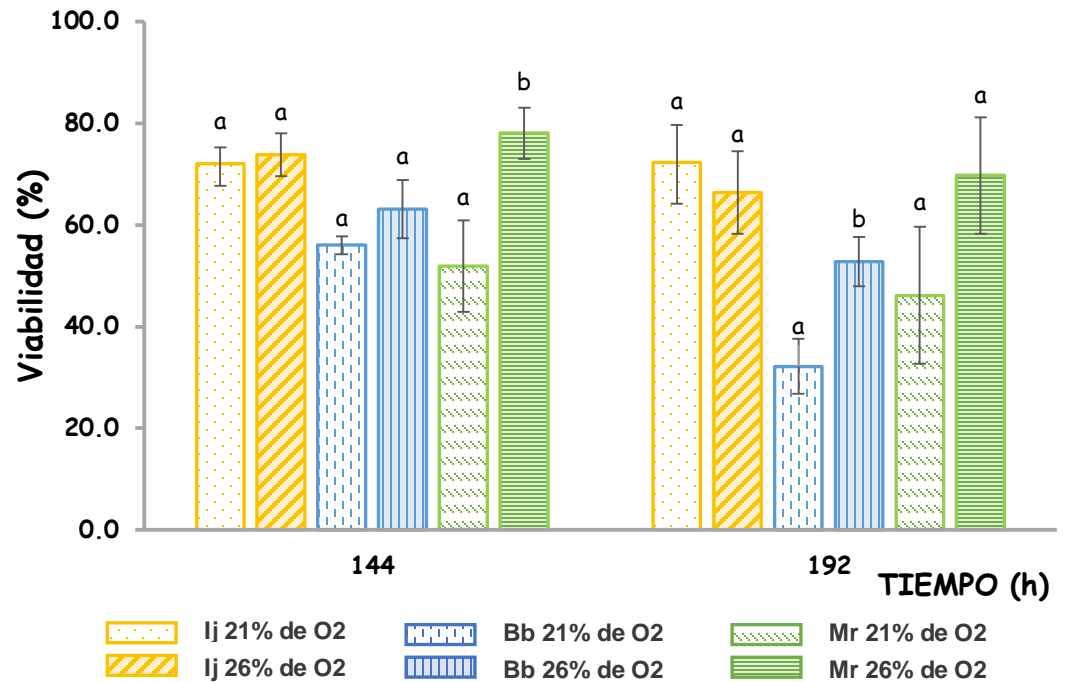
### **8.2.1 Germinación y viabilidad**

Se realizaron las pruebas de germinación (Figura 5) y viabilidad (Figura 6) para verificar que el aumento en la producción de conidios de *I. javanica*, *M. robertsii* y *B. bassiana* que se logró con los pulsos oxidantes, no alteró la calidad de los conidios producidos, además de evaluar la calidad de los conidios producidos sobre cultivo de sobre arroz y avena. Las pruebas se evaluaron a las 144 y 192 h de cultivo (puntos máximos de producción de conidios con atmósfera normal y atmósfera modificada respectivamente). En *I. javanica* la germinación observada en los conidios en ambos tratamientos es de alrededor del 93 %, sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ambas condiciones experimentales ni entre ambos tiempos. El mismo efecto se observó en la viabilidad de conidios, donde la viabilidad no se afectó por los pulsos oxidantes en los dos tiempos ensayados ( $P > 0.05$ ). En *B. bassiana* se logró alcanzar un porcentaje de germinación en ambos tiempos del 81% y una viabilidad, en conidios cosechados a las 144 h de cultivo, del 60%; sin embargo, la viabilidad en conidios de *B. bassiana* disminuyó a las 192 h, siendo mayor la de conidios



**Fig 5.** Geminación de los conidios en porcentaje de *I. javanica* (Ij), *M. robertsii* (Mr) y *B. bassiana* (Bb) con atmósfera normal (21% de O<sub>2</sub>) y atmósfera modificada (26% de O<sub>2</sub>). Sin diferencias significativas entre tratamientos (P > 0.05).

**Fig 6.** Viabilidad de los conidios en porcentaje de *I. javanica* (Ij), *M. robertsii* (Mr) y *B. bassiana* (Bb) con atmósfera normal (21% de O<sub>2</sub>) y atmósfera modificada (26% de O<sub>2</sub>). Las letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05) entre tratamientos.





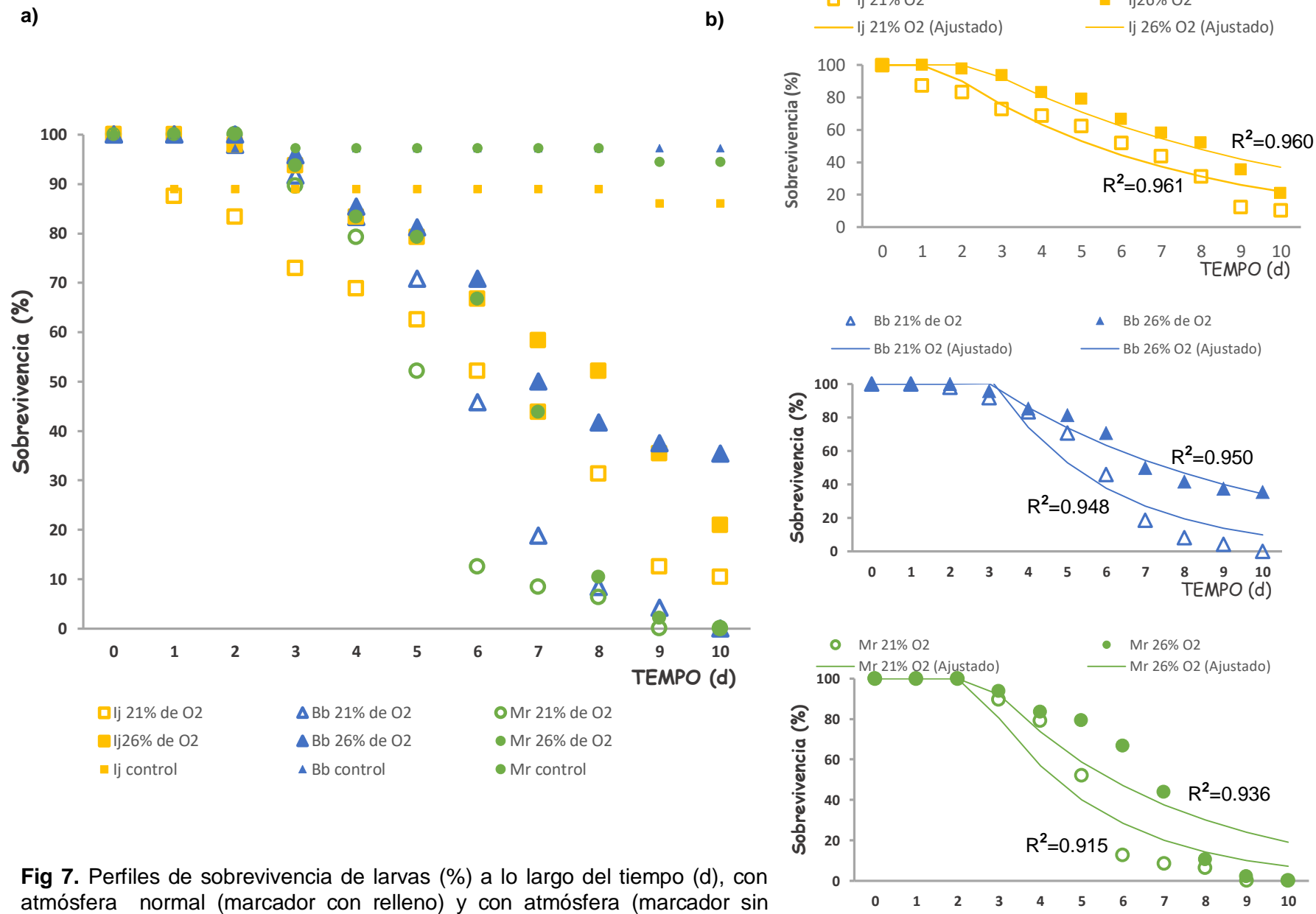
obtenidos bajo atmósfera modificada (53%) que la de los obtenidos bajo atmósfera normal (32%). En cuanto a *M. robertsii* (Figura 5,6), se obtuvieron resultados similares en cuanto al porcentaje de germinación, siendo con atmósfera normal y modificada del 84 %. En el caso de la viabilidad a las 144 h se observó una mejor viabilidad de los conidios obtenidos con pulsos enriquecidos en esta cepa, alcanzó (78% con atmósfera modificada, contra 52% observado con atmósfera normal) logrando aumentar la viabilidad de los conidios un 26%, por efecto de los pulsos de oxígeno, mientras que la viabilidad de los conidios cosechados a la 192 h la viabilidad comienza a disminuir, sin diferencia significativa en ambas condiciones ( $P > 0.05$ ).

Los pulsos oxidantes aumentaron la producción de conidios en las tres especies de hongos entomopatógenos utilizados en este estudio, sin afectar negativamente la germinación y la viabilidad de éstos, e incluso en algunos casos el tratamiento con los pulsos oxidantes mejoró este parámetro de calidad, comparado con la atmósfera normal. La germinación de los tres hongos no fue afectada por el tratamiento con los pulsos enriquecidos. Por otra parte la viabilidad de los conidios de *I. javanica* y *B. bassiana* no se ve afectada por los pulsos enriquecidos con  $O_2$  a las 144 h, sin embargo, la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* disminuyó 48 h después de aplicar los pulsos, mientras que la viabilidad de los conidios de *M. robertsii* a las 144 h mejora con los pulsos enriquecidos y a las 144 h no se encuentra diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre ambas condiciones experimentales. Por estas razones, se consideró que los pulsos oxidantes tienen un mayor efecto positivo en la producción y calidad de conidios *I. javanica* en comparación con *M. robertsii* y *B. bassiana*.

## 8.2.2 Bioensayo

Para saber si los conidios producidos en ambas condiciones son capaces de parasitar los insertos plaga, se realizaron los bioensayos sobre larvas de *Tenebrio molitor* para *M. robertsii* y *B. bassiana*, mientras que para *I. javanica* se utilizaron larvas de *Galleria mellonella*. Esta prueba de calidad se realizó con conidios cosechados a las 144 h de cultivo, tiempo en que la germinación y viabilidad de conidios fue mayor. Los datos experimentales de sobrevivencia de las larvas a lo largo del tiempo se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial, con el que se obtuvieron los siguientes parámetros: tasa específica de muerte ( $k$  [ $d^{-1}$ ]), tiempo de retardo en el que ocurre la primera muerte ( $t_0$  [d]), sobrevivencia final ( $S_f$  [%]) y el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad ( $TL_{50}$  [d]). Los perfiles de sobrevivencia de larvas se muestran en la Figura 7a y los ajustes de los datos experimentales al modelo de decaimiento exponencial se presentan en la Figura 7b. Para cada curva se determinó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) como se muestra en la Figura 7b.1, 2 y 3, el cual en todos los ajustes fue mayor al 90 %, por lo que el ajuste de los datos a este modelo describe adecuadamente el proceso de infectividad de estas cepas de HE a lo largo del tiempo y en relación a la concentración de  $O_2$  en la atmósfera.

Como se puede ver en la Tabla 5 no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en  $t_0$ , y  $k$  entre tratamientos en ninguna de las cepas de HE. El  $t_0$  promedio de los tratamientos para el caso de *I. javanica* es de 1.9 d, para el caso de *B. bassiana* es de 3.1 d y para *M. robertsii* en promedio se requiere 2.5 d para que ocurra la primer muerte. La  $k$  promedio de los tratamientos de *I. javanica*, *B. bassiana* y *M. robertsii* es de 0.2, 0.3 y 0.3  $d^{-1}$  respectivamente, mostrando que después de la infección todos los conidios fueron capaces de matar a las larvas a una tasa menor a 0.3  $d^{-1}$ . Solo se encontró diferencia significativa en la  $TL_{50}$  ( $P < 0.05$ ), obteniendo que los conidios cultivados bajo atmósfera modificada para el caso de *I. javanica*, *B. bassiana* y *M. robertsii* requieren 2.33, 2.37 y 1.36 d más para para matar el 50% de larvas con respecto a los conidios cultivados bajo condiciones normales, pero aunque al  $TL_{50}$  sea mayor con atmósfera modificada, los conidios cultivados bajo ambas condiciones tuvieron una  $S_f$  igual a cero.



**Tabla 5.** Parámetros de infectividad de *I. javanica*, *B. bassiana* y *M. robertsii*, donde las letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. La  $S_f$  en las cepas y en ambos tratamientos fue cero.

Cepa	Atmósfera	$t_0$ (d)	$k$ (d <sup>-1</sup> )	TL <sub>50</sub> (d)
<i>I. javanica</i>	21% de O <sub>2</sub>	1.41 ± 0.43 <b>a</b>	0.18 ± 0.08 <b>a</b>	5.34 ± 0.39 <b>a</b>
	26% de O <sub>2</sub>	2.32 ± 0.46 <b>a</b>	0.13 ± 0.02 <b>a</b>	7.67 ± 0.82 <b>b</b>
<i>B. bassiana</i>	21% de O <sub>2</sub>	3.11 ± 0.16 <b>a</b>	0.34 ± 0.09 <b>a</b>	5.18 ± 0.13 <b>a</b>
	26% de O <sub>2</sub>	3.01 ± 0.47 <b>a</b>	0.15 ± 0.14 <b>a</b>	7.55 ± 0.19 <b>b</b>
<i>M. robertsii</i>	21% de O <sub>2</sub>	2.37 ± 0.14 <b>a</b>	0.35 ± 0.78 <b>a</b>	4.36 ± 0.13 <b>a</b>
	26% de O <sub>2</sub>	2.63 ± 0.27 <b>a</b>	0.22 ± 0.11 <b>a</b>	5.72 ± 0.40 <b>b</b>

### 8.3 Análisis de expresión diferencial

Para esta segunda etapa se eligió a *I. javanica* para realizar el análisis de la expresión de los genes *brlA*, *abaA* y *wetA*, reportados como genes reguladores de la conidiación en *A. nidulans* y en *B. bassiana*, dado que la producción de conidios en atmósfera modificada aumentó más de un orden de magnitud en esta cepa, con respecto a la producción obtenida bajo atmósfera normal (21% O<sub>2</sub> Figura 4b), sin afectar la calidad de los conidios. Por ejemplo, la germinación observada en los conidios de ambos tratamientos estuvo alrededor del 93 % y la viabilidad de conidios, no se afectó por los pulsos oxidantes. En cuanto al bioensayo con ambos tratamientos no se encontró diferencia significativa en la sobrevivencia final sobre larvas de *Galleria mellonella* (Tabla 5). Por estas razones se eligió a este hongo entomopatógeno para esta segunda etapa y se buscaron en el genoma de *I. javanica* a los genes ortólogos a los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* utilizando como plantilla de búsqueda las secuencias ya reportadas en *B. bassiana*. Los resultados se presentan a continuación.

#### 8.3.1 Búsqueda *in silico* de genes reguladores de la conidiación en hongos

Los resultados de los tBlastn se muestran en la Figura 8, el cual permitió obtener las secuencias de los genes *brlA* (Figura 8a), *abaA* (Figura 8b) y *wetA* (Figura 8c) de *I. javanica*, utilizando como plantilla de búsqueda las secuencias de los genes reguladores de la conidiación reportadas en *B. bassiana* (Fang et al., 2015). Como se muestra el valor E en todos los casos es 0.0 (Fig 8) lo que nos indica que la probabilidad de que el alineamiento entre la plantilla y la secuencia identificada ocurra al azar o por casualidad es de 0.0; por otra parte el porcentaje de identidad para el caso de *brlA* es del 81%, es decir que la proteína *brlA* tiene 365 aminoácidos de longitud, se pudo alinear el 96% de la proteína con la secuencia identificada (Query cover), pero solo el 81% de la alineación es idéntico. Para el caso de *abaA*, la identidad fue del 76% y para *wetA* fue del 54%.

a)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding protein partial mRNA</a>	586	586	96%	0.0	81%	<a href="#">XM_018852840.1</a>

b)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 transcription factor AbaA partial mRNA</a>	1386	1386	100%	0.0	76%	<a href="#">XM_018853014.1</a>

c)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA</a>	548	548	100%	0.0	54%	<a href="#">XM_018850497.1</a>

**Fig 8.** Resultados de los tBlastn para los genes involucrados en la conidiación. a) gen *brlA*, b) gen *abaA* y c) gen *wetA*.

### 8.3.2 Diseño de oligonucleótidos y sondas para multiplex RT-qPCR

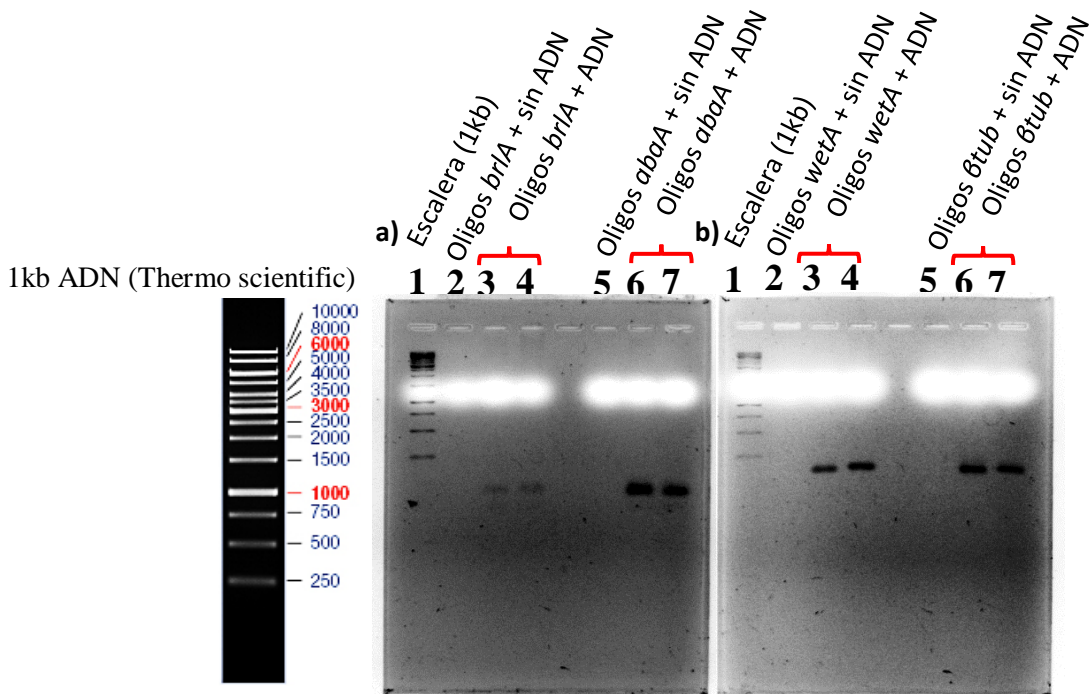
Una vez identificadas las secuencias de los genes (*brlA*, *abaA* y *wetA*), se procedió a realizar el diseño de los oligonucleótidos (como se mencionó en el apartado de metodología). El diseño de cebadores o iniciadores y sondas es uno de los aspectos más importantes para realizar RT-qPCR multiplex, ya que los cebadores mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN o ADNc distintos a los buscados (amplificación inespecífica), mientras que las sondas con fluoróforos iguales no permitirían identificar la expresión de diferentes genes. Los cebadores y sondas diseñados para los genes involucrados en la conidiación y para el gen de referencia se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Cebadores (Sentido y antisentido) y sondas (PROVE) para RT-qPCR multiplex.

Gen	Oligo	Secuencia (5'-3')
<i>brlA</i>	Sentido	GAGACACAAGCAGACGTTCC
	Antisentido	GCGGTGGTTGTTGAGATTGT
	Sonda	/56-FAM/CCGCAGAAC/ZEN/TCACACGAGAAACGGT/3IABkFQ/
<i>abaA</i>	Sentido	AAGATGCCTTCGTCGACTCT
	Antisentido	CCCATCTGCTCAATGCTGTC
	Sonda	/5HEX/CCTCACATG/ZEN/GGCCGCCGCAA/3IABkFQ/
<i>wetA</i>	Sentido	AGTTTGACGACCCATTTGGC
	Antisentido	TTGGCTGTAGTACCGCATCT
	Sonda	/5Cy3/TCCAACACACGCGCCGCCAC /3IAbRQSp/
<i>βtub</i>	Sentido	GCTTCTGACCTCCGTAAC
	Antisentido	TCCTCAACCTCCTTCATG
	Sonda	/5Cy5/ACCTGACCTGCTCTGCCATT/3IAbRQSp/

\*ZEN™ es un *inhibidor de fluorescencia (quencher)* interno, acorta la distancia entre el colorante y el inhibidor de fluorescencia del extremo 3', y en combinación con este, proporciona un mayor grado de inactivación y reduce el fondo inicial.

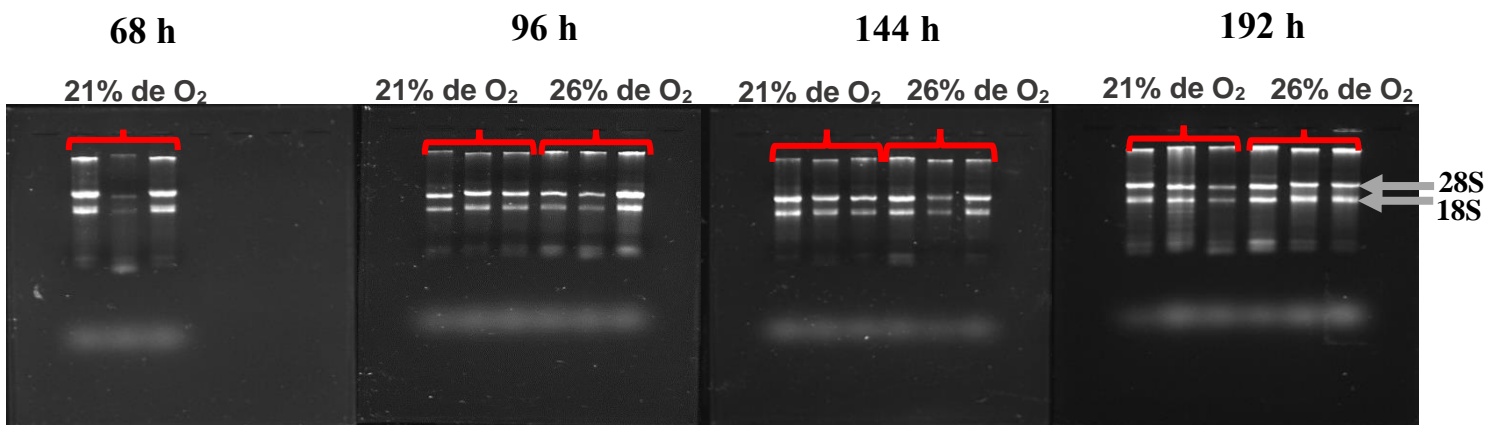
Dado que el diseño de los iniciadores y sondas es crucial para este proyecto se comprobó su funcionalidad; se muestra en la Figura 9a el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados de ADN, en los carriles 3, 4, 6 y 7 se observan amplicones de menos de 250 pb que corresponden al tamaño del amplicón con los cebadores del gen *brlA* y *abaA*, 103 y 187 pb, respectivamente, y su control negativo (carril 2 y 5) que era la mezcla de todos los componentes de la reacción excepto ADN. En la Figura 9b se observa algo similar, bandas menores de 250 pb que corresponden al tamaño del amplicón de los iniciadores del gen *wetA* y *βtub*, 104 y 100 pb, respectivamente, y sus controles negativos en el carril 2 y 5, en estos controles no se observa bandas que es lo esperado ya que comprueba la funcionalidad de los iniciadores diseñados.



**Fig 9.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados.

### 8.3.3 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

La calidad del ARN extraído de los conidios de *I. javanica* cultivados, con atmósfera normal y enriquecida con oxígeno, a las 68, 96, 144 y 192 h, se evaluó mediante electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa. Se observó la presencia de dos bandas distintas en todas las muestras y en sus respectivos triplicados (Figura 10). La primer banda (banda superior) corresponde a la subunidad grande del ribosoma 28S y la segunda banda (banda inferior) corresponde la subunidad pequeña del ribosoma 18S, y no se observó barrido en ninguna de las muestras, por lo que se logró extraer el ARN total y se confirmó su integridad.



**Fig 10.** Electroforesis en gels desnaturalizantes de agarosa donde se muestra la integridad del ARN purificado de la cepa *I. javanica* de las dos condiciones atmosféricas (21% de O<sub>2</sub> y 26% de O<sub>2</sub>) a las 68 h, 96 h, 144 h y 192 h.



### 8.3.4 Multiplex RT-qPCR

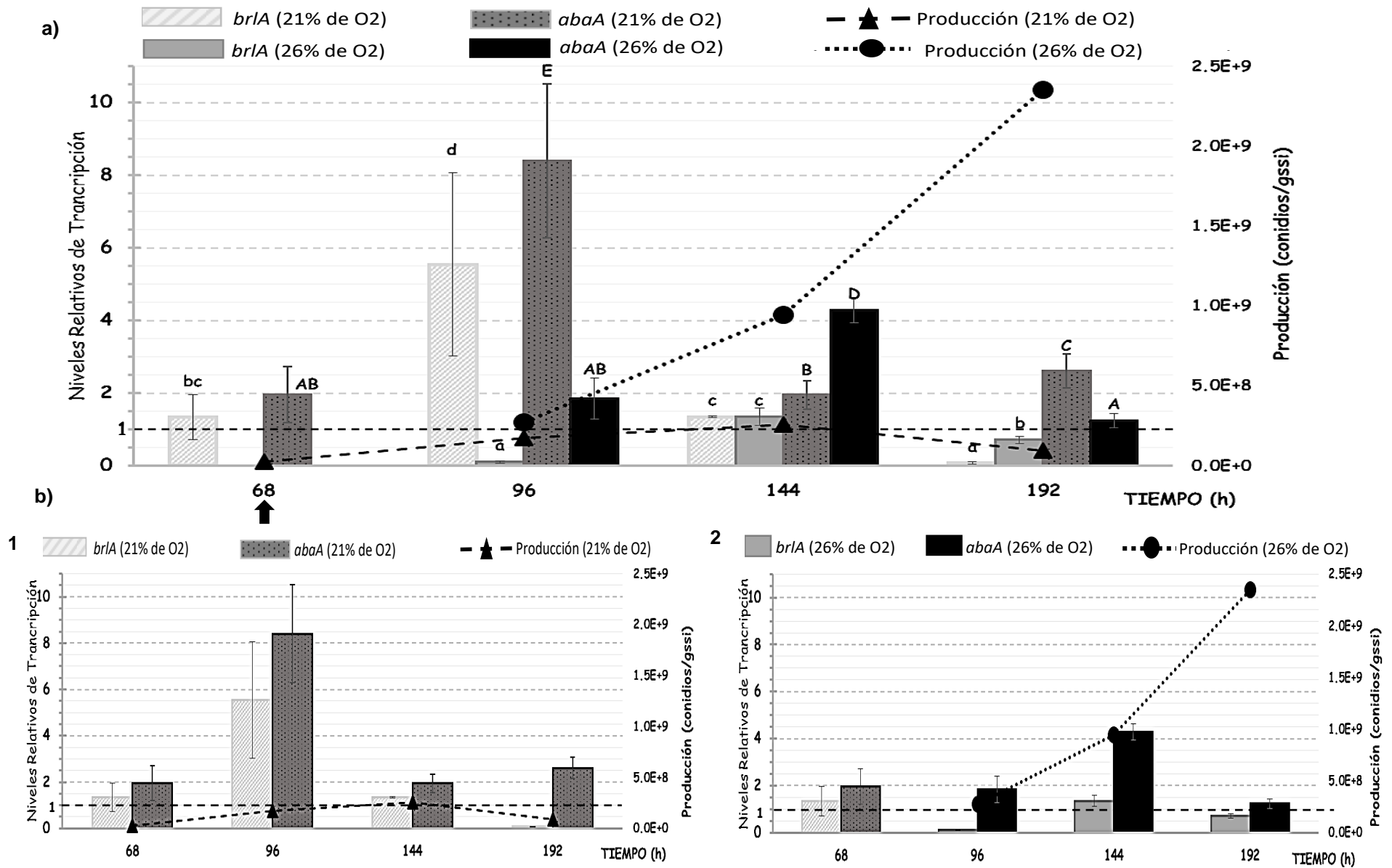
La expresión relativa de los genes *brlA* y *abaA* en *I. javanica*, evaluada en distintos puntos a lo largo de 192 h de cultivo, en cultivo sólido con atmósfera normal y atmósfera modificada se muestran en la Figura 11a. Los niveles relativos de transcripción (NRT) del gen *brlA*<sup>1</sup>, en condiciones normales de oxígeno se muestra en la Figura 11b.1. Para este gen se observó una máxima expresión relativa (cuatro veces más que a las 68h, punto de referencia antes de la aplicación de los pulsos oxidantes) a las 96 h de cultivo; este tiempo concuerda con el periodo de crecimiento de las hifas o tallos aéreos de esta cepa. Los niveles de expresión relativa de *brlA* regresan al nivel ( $P > 0.05$ ) a las 144 h de cultivo, y continúa descendiendo. Por otra parte, para estas mismas condiciones de cultivo, se observó el NRT máximo de *abaA*<sup>2</sup> a las 96 h de cultivo y fue cuatro veces más alta su expresión que a las 68h ( $P < 0.05$ ); posteriormente su expresión relativa desciende al nivel observado a las 68 h de cultivo, y se mantiene relativamente constante hasta las 192 h.

En la figura 11a.1 se puede observar que la máxima producción de conidios de *I. javanica* obtenidos en cultivo sólido se alcanza 48 h después del máximo nivel de expresión relativa de los genes *brlA* y *abaA*, a ambas concentraciones de oxígeno en la atmósfera; sin embargo, los máximos niveles de expresión de ambos genes se alcanzan a diferentes tiempos dependiendo de la concentración de oxígeno atmosférico durante el cultivo sólido.

---

<sup>1</sup> Gen *brlA* que codifica para la proteína identificada como un activador transcripcional de los genes reguladores del desarrollo temprano de la conidiación en *A. nidulans* (BrlA), (Yu et al, 2010).

<sup>2</sup> La activación de los genes reguladores de la conidiación es secuencial, después de la activación del gen *brlA*, que inicia la conidiación, la proteína BrlA activa la transcripción del gen *abaA*, justo durante la fase media de desarrollo asexual, al menos en *A. nidulans* (Park y Yu 2012).



En el caso de los conidios obtenidos bajo atmósfera normal, la máxima expresión de *brlA* se observa a las 96 h (por lo tanto la máxima producción de conidios se observa a las 144 h) y posteriormente decae hasta un mínimo de 18.3 veces a las 192 h respecto a sus niveles de expresión a las 68 h. El gen *brlA* tienen un perfil de expresión diferente en el caso de los conidios obtenidos bajo atmósfera modificada; en la Figura 11b.2 se observa que la expresión de *brlA* decae 13.4 veces tan sólo 28 h después de la aplicación de los primeros pulsos de oxígeno (96 h de cultivo), respecto a los niveles de expresión observados para este gen a las 68 h. Posteriormente la expresión de *brlA* se incrementa de nuevo hasta alcanzar niveles similares a los observados antes de la aplicación de los pulsos de oxígeno (a las 144 h), es decir una segunda activación del gen (la primera ocurre entre las 60 y las 68 horas de cultivo e induce la aparición de los primeros conidios del cultivo), y podría explicar el aumento en la producción de conidios más de un orden de magnitud con respecto a la producción con atmósfera normal. Posteriormente la transcripción relativa de *brlA* se reduce a las 192 h (47% con respecto al control), pero, durante la duración de estos experimentos, no se observa que disminuya hasta los niveles mínimos observados en los conidios obtenidos bajo atmósfera normal (95% con respecto al control, Figura 11b.1 vs Figura 11 b.2, 192 h), esto indica que la segunda activación de *brlA* no es tan intensa en magnitud, pero tiene mayor duración que la activación del gen bajo condiciones de atmósfera normal.

Respecto a la transcripción del gen *abaA*, en nuestros experimentos no se observó la expresión secuencial de *brlA* seguida de la activación de *abaA* como han reportado (Fang et al., 2015), sino que desde las 68 horas de cultivo (antes de la administración de los pulsos de oxígeno) ya se podía detectar la expresión de ambos genes y el perfil de expresión. Al igual que ocurre con *brlA* la máxima expresión de *abaA* se obtiene 48 h antes del punto máximo de producción de conidios en ambos tratamientos. Se puede observar que existe una correlación en que a medida que se incrementan los niveles de expresión de *brlA*, se incrementa la expresión de *abaA* (Figura 11b.1, 96 h y 11b.2, 144 h), sin embargo, la expresión de *abaA* no cae a niveles mínimos a las 192 h en conidios obtenidos bajo 21% de O<sub>2</sub> como ocurre en el caso de *brlA*, ni tampoco se inhibe por efecto agudo de la aplicación de pulsos con 26% de O<sub>2</sub>.

Aun cuando el producto génico del gen *wetA* desempeña un papel crítico en la maduración de conidios en *A. Nidulans*, no se presentan resultados de cambios en la expresión de este gen, dado que en ninguna muestra de ADNc se logró la amplificación del producto de PCR utilizando los cebadores diseñados; sin embargo, sí se obtuvieron amplicones de este gen por PCR de punto final, cuando se usa como templado ADN genómico de *I. javanica* CHE-CNRCB303 (Figura 9).

## 9. Discusión

El CMS es uno de los métodos más usados para la producción de conidios aéreos de hongos entomopatógenos, pues los conidios obtenidos de esta manera presentan una mayor viabilidad e hidrofobicidad y tienen mayor termotolerancia en comparación con los obtenidos en cultivo líquido o cultivo superficial (Miranda- Hernández et al., 2017; Muñiz-Paredes et al., 2016). Como se mencionó, el sustrato sólido más utilizado para la producción de conidios de HE ha sido el arroz, por su equilibrio nutricional, costo, tamaño, forma del grano y propiedades de hidratación e integridad estructural, incluso después de la colonización por hongos (López-Pérez et al., 2015). Se ha utilizado el arroz combinado con varios texturizantes para cambiar la porosidad del medio (Muñiz-Paredes, 2016; Ángel-Cuapio, 2011; Gómez-Preciado, 2014), con esto se evita que el sustrato se compacte, se incrementa el área de contacto entre sustrato y el microorganismo, además de facilitar la transferencia de oxígeno y bióxido de carbono (Ángel-Cuapio et al., 2015).

Diversos investigadores han realizado pruebas para optimizar el sustrato sólido para el cultivo de HE; por ejemplo, Taylor et al., (2013) determinó que el porcentaje de germinación de conidios de *B. bassiana* es mucho mayor sobre arroz precocido que en arroz no precocido (96% y 81% respectivamente) y la diferencia es mas significativa despues de 8 semanas de almacenamiento, alcanzando un 96% de germinación en arroz precocido y 56% sobre arroz no precocido. Gómez-Preciado (2014) por su parte, demostró que al cultivar *M. anisopliae* sobre una mezcla arroz-avena incrementa la producción de conidios del HE, respecto a los sustratos por separado, pues la mezcla proporciona mejor equilibrio nutricional para el hongo.

Muñiz-Paredes et al., (2016) utilizó como sustrato para la producción de conidios de *I. javanica* e *I. fumosorosea* una mezcla de arroz-avena obteniendo rendimientos de  $10^8$  conidios/ggsi. Algo similar se obtuvo en el presente trabajo en donde la utilización de la mezcla arroz precocido-avena como sustrato sólido permitió obtener rendimientos máximos, bajo condiciones normales, de  $10^8$  conidios/ggsi, y con atmósfera modificada los rendimientos alcanzaron  $10^9$  conidios/ggsi, datos similares a los reportados (Dalla-Santa et al., 2004; Kang et al., 2005; Arzumanov et al., 2005; Jongjangklang et al., 2011; Muñiz Paredes et al., 2016). Por otra parte, se ha reportado que la producción máxima de conidios obtenidos por CMS se logra entre 7 y 21 d de cultivo para HE como *Isaria*, *Metarhizium* o *Beauveria* (Arzumanov et al., 2005; Nuñez-Gaona et al., 2010; Miranda-Hernández et al., 2017); sin embargo, en este trabajo la producción máxima de conidios de *I. javanica*, *M. robertsii* y *B. bassiana* bajo atmósfera normal y modificada con 26% de O<sub>2</sub> en cultivo sólido a base de arroz y avena, se obtuvo entre los 6 (144h) y 8 d (192h) un promedio de  $7 \times 10^8$  conidios/gssi y  $2 \times 10^9$  conidios/gssi respectivamente (atmósfera normal y modificada), estos resultados son similares a otros reportes (García-Ortiz et al., 2015; Santoro et al., 2014).

La mayor parte de los estudios para evaluar el efecto de los pulsos oxidantes en la producción y calidad de conidios se han realizado en cultivos superficiales (Rodríguez-Gómez et al., 2009; Miranda-Hernández et al., 2014; Suarez-Vergel, 2017). Por ejemplo,

Miranda-Hernández (2010) evaluó el efecto que tiene enriquecer la atmósfera con 26% de O<sub>2</sub> después de 60 horas de cultivo, con intercambio de la atmósfera cada 24 h, en diferentes cepas de hongos entomopatógenos en cultivos superficiales. Este estudio encontró que a las 204 h la producción de conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 (*I. javanica* CHE-CNRCB303) con una atmósfera enriquecida disminuye 100% con respecto a la misma cepa incubada en atmósfera normal, algo similar obtuvo con *B. bassiana* 882.5, los rendimientos de conidios fueron más bajos con el tratamiento con atmósfera enriquecida respecto a los producidos con atmósfera normal, estableciendo que “los hongos tienen diferentes grados de tolerancia y mecanismos de respuesta distintos a tal condición” (Miranda-Hernández, 2010).

Varios autores han realizado la comparación de los rendimientos de conidios producidos en CMS y cultivo superficial, pero por lo general la composición del medio de cultivo es diferente entre los dos sistemas (Wyss et al. 2001; Jaronski y Jackson 2012). En el 2016 se publicó el primer estudio en el que compara la producción y calidad de unidades infectivas de *I. javanica* y *I. fumosorosea* bajo diferentes concentraciones de O<sub>2</sub> atmosférico utilizando el mismo sustrato en CMS y en cultivo superficial (Muñiz-Paredes et al., 2016); En dicho trabajo se encontró que el efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios es distinto dependiendo del tipo de cultivo que se realiza; cuando los pulsos de O<sub>2</sub> se administran en cultivo superficial y en CMS la producción de conidios disminuyen en ambos sistemas pero en CMS sin embargo la conidiación en CMS fue dos órdenes de magnitud más sensible a los pulsos oxidantes. En otro estudio Muñiz-Paredes, 2016 determinó que el efecto positivo sobre la producción de conidios en medio sólido ocurre siempre y cuando se considere una relación entre la cantidad de sustrato y el volumen del biorreactor que cubra la demanda de oxígeno del cultivo y evite alteraciones en los rendimientos de biomasa y conidios.

Considerando la bibliografía (Muñiz-Paredes et al., 2016, 2016) en este trabajo se consideró la relación entre el sustrato y el volumen del biorreactor para cubrir la demanda de oxígeno del cultivo y se aplicaron pulsos de oxígeno al 26% cada 12 h, a partir de las 68 h de cultivo en estado sólido. Observamos que en el caso de *I. fumosorosea* el tratamiento favoreció la producción de conidios; de hecho, la producción de conidios aumentó más de un orden de magnitud con respecto a la atmósfera normal (192 h) aumento que no había obtenido Miranda-Hernández (2010) con los pulsos enriquecidos con O<sub>2</sub> en este HE. El efecto de los pulsos oxidantes también incrementó la producción de conidios tanto de *B. bassiana* como de *M. robertsii* (2.6 veces más conidios a las 192 horas), de manera mucho más modesta que lo observado para *I. javanica*. Es importante señalar que el incremento en la producción de conidios de *M. robertsii* por efecto del cambio en la concentración de O<sub>2</sub> encontrado en este trabajo es superior al incremento en la conidiación reportado en trabajos previos para la cepa *Metarhizium lepidiotum* CP-Oax, bajo el mismo tratamiento de los pulsos oxidantes, (Miranda-Hernandez, 2010; Tlecuitl-Beristain et al., 2010), en el que se reporta un incremento en la producción de conidios de hasta 1.75 veces y 100% más con respecto a atmósfera normal.

Castillo-Minjares (2015), introdujo el término “índice de conidiación” (*I*) definido como el cociente de la producción de conidios en cierto tiempo entre la cantidad de inóculo por unidad de volumen. Este *I* se considera un parámetro que indica qué tan avanzado está un cultivo, y cuantifica el efecto favorable que tiene enriquecer la atmósfera con oxígeno en la formación de conidios; es decir, si comparamos el valor de *I* en los puntos máximos de producción de conidios (144 h para atmósfera normal y 192 h para atmósfera modificada), con atmósfera normal es de 26, 48 y 136, mientras que para atmósfera modificada es de 235, 197 y 189, para *I. javanica*, *B. bassiana* y *M. robertsii*, respectivamente. En otras palabras, dependiendo de la cepa, por cada conidio que se inocula bajo atmósfera normal se producen hasta 136 conidios nuevos, mientras que en los cultivados con atmósfera modificada se producen hasta 235 conidios por cada conidio cultivado.

El nivel de producción de conidios, no es el único elemento esencial para la selección de cepas de HE con potencial para el control biológico, otros factores como la germinación, viabilidad, e infectividad (pruebas de calidad de conidios) son igualmente importantes (Goettel y Roberts, 1992; Jackson et al., 2010; Miranda-Hernández et al., 2017). El objetivo de realizar estas pruebas de calidad es predecir la eficacia de los HE cuando se aplican en campo, por esta razón, estas pruebas juegan un papel importante en la evaluación de la calidad de los bioplaguicidas fúngicos (Jenkins et al., 1998; Miranda-Hernández et al., 2017). Por eso se realizaron estas pruebas a los conidios producidos en cultivo sólido, corroborando que los pulsos enriquecidos no alteran a estas variables, en relación a los producidos con atmósfera normal y lo ya reportado, dado que son parámetros importantes de calidad relacionados con la eficacia de los HE en campo.

Como se mencionó, la germinación es la formación de tubos germinativos y se puede expresar en porcentaje, el cual es un estimador de qué tan rápido se produce un tubo germinal, que permite que las hifas crecientes rompan la cutícula del huésped (insecto) (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Los conidios de los HE que tengan una germinación rápida tendrán un mayor éxito que aquellos con tasas bajas de germinación, puesto que estos últimos están expuestos durante más tiempo a cambios en las condiciones nutricionales o cambios de temperatura, es decir están expuestos a factores que afectan la germinación (Ibrahim et al., 2002; Miranda-Hernández et al., 2017). El valor recomendado por Jenkins y Grzywacz (2000) para la prueba de germinación es un valor mayor a 85%. Los resultados de este trabajo muestran que la germinación de los conidios de *I. javanica* fue del 93% con pulsos de 26% y 21% de O<sub>2</sub>, superando el valor recomendado de germinación; por otra parte, con ambos tratamientos se obtuvieron viabilidades de 67-73%, estos datos de calidad de *I. javanica* son similares a los obtenidos por Muñoz-Paredes et al. (2016). La viabilidad indica qué porcentaje de conidios son capaces de desarrollar unidades formadoras de colonias, valor que debe mantenerse o mejorarse después de los tratamientos aplicados. En el caso *M. robertsii* este porcentaje de viabilidad se mejoró con los pulsos oxidantes, con valores recomendados para las formulaciones, algo similar ya había sido observado por Tlecuitl-Beristain et al. (2010), es decir que los pulsos no modifican negativamente la viabilidad de los conidios de *M. robertsii*. En el caso de *B.*



*bassiana* también tuvo una respuesta positiva a los pulsos en cultivo sólido, pero no tanto como *I. javanica* y *M. robertsii*, corroborando que los hongos entomopatógenos tienen diferentes grados de tolerancia y mecanismos de respuesta a los pulsos oxidantes (Miranda-Hernández, 2010). Estas diferentes respuestas al estrés, como señala Muñiz-Paredes et al., (2016), también dependen del sistema de cultivo en el que crecen los HE. Estos resultados muestran que los conidios producidos con este sistema tienen un potencial prometedor para su eficiencia en campo, sin embargo, para corroborar esto se requieren más pruebas de calidad como hidrofobicidad, termotolerancia e infectividad (bioensayo).

El bioensayo es una prueba de calidad que implica el uso de plagas vivas para determinar la capacidad de biocontrol de los HE (Miranda-Hernández et al., 2017), esta prueba es importante dado que los HE durante el proceso de infección deben enfrentar la respuesta inmune de los insectos como: ecdisis, el aumento de su temperatura (fiebre inducida), las secreciones de las glándulas y la comunidad microbiana (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Por ejemplo las chinches inhiben a *M. anisopliae* con secreciones glandulares de (E) -2-hexenal y (E) -2-octenal (Ulrich et al., 2015). Algunas bacterias endógenas como *Bacillus pumilus* en la cutícula de *Dalbulus maidis* (la chicharrita), inhibe la germinación de *B. bassiana* (Toledo et al., 2011). A través de bioensayos se ha reportado un incremento en la infectividad de las cepas de *I. fumosorosea* con pulsos oxidantes en cultivo superficial (Miranda-Hernández et al., 2014), sin embargo, estos resultados no se pudieron observar en este estudio, ya que para todas las cepas no hubo diferencia en los parámetros de infectividad con atmósfera enriquecida y atmósfera normal, incluyendo las variables como  $t_0$  y  $k$ , de hecho se obtuvo con ambos tratamientos una sobrevivencia final igual a cero. Por otra parte obtuvimos que el  $TL_{50}$  con atmósfera enriquecida fue mayor con respecto a la atmósfera normal, estas diferencias podrían deberse a que probablemente a las 144 h (tiempo en que se realizó el bioensayo) ya teníamos conidios maduros de *I. javanica* en el tratamiento con atmósfera normal, mientras que con atmósfera modificada seguíamos en la fase media de la conidiación y aun así la sobrevivencia final fue cero en ambos tratamientos.

Por lo tanto, la implementación de los pulsos con 26% de O<sub>2</sub> en un sistema de producción en cultivo sólido no solo aumentan la producción de los conidios, sino además no afectan la infectividad de estos, convirtiendo este sistema en un modelo base para el desarrollo de un proceso de producción a gran escala de conidios de HE que va tener gran eficacia para el control biológico de plagas.

Entender el proceso de conidiogénesis (proceso primario para la reproducción asexual) en HE es importante para entender cómo estos hongos interactúan con su entorno para regular su desarrollo, por lo que el estudio de los cambios en los niveles de expresión de los genes de la vía central de conidiación (*brlA*, *abaA* y *wetA*) en HE, bajo condiciones de estrés oxidante ayuda a comprender el incremento en la producción de conidios; además, permitiría generar nuevas estrategias biotecnológicas para mejorar aún más la producción de conidios de HE utilizados para el control biológico de plagas.

Se a reportado que la vía central de la conidiación está conservada en HE (Fang et al., 2015; Zeng et al., 2017). Zeng et al., (2017) analizaron la expresión de los genes de la vía reguladora de la conidiación (*brlA*, *abaA* y *wetA*) y a *vosA* a los 2, 3, 5 y 8 días de cultivo superficial de *M. robertsii*. Estos autores encontraron que la expresión de los genes *brlA*, *wetA* y *vosA* permaneció constante durante la conidiación (no observaron diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) con respecto a su expresión en el día 2), mientras que la expresión *abaA* se mantuvo por arriba de *brlA*, *wetA* y *vosA*, encontrando la máxima expresión de *abaA* a los 3 días, permaneciendo elevada a los 8 días. Mientras que en en este estudio se encontró algo muy similar, en donde los niveles de expresión de *abaA*, fueron superiores a los niveles de expresión de *brlA* en *Isaria javanica* CHE-CNRCB303 con ambos tratamientos.

Por otra parte Fang et al., (2015) al estudiar la transcripción de *brlA*, *abaA*, *wetA* y *vosA* en *B. bassiana*, en cultivo superficial en un periodo de 7 días estandarizando los NTR con respecto a la expresión en el día 1, observaron que la expresión comenzó a ser notoria en el día 3 (aproximadamente 6 veces más la expresión de *brlA* con respecto al día 1); la máximo expresión de *brlA* y *abaA* fue al 5 día (20 veces más su transcripción con respecto al día 1). La máxima expresión de *abaA* en *M. robertsii* fue al 3 día (Zeng et al., 2017);

en ambos HE (*M. robertsii* y *B. bassiana*) la expresión de *brlA* en *B. bassiana* y *abaA* en *M. robertsii* al 3 día ya era notoria hasta 6 y 15 veces más con respecto a la del día 1 y 2, respectivamente (Fang et al., 2015; Zeng et al., 2017). En el caso de nuestro trabajo, utilizamos la expresión de *brlA* y *abaA* a las 68 h ( $\approx 3$  días) para establecer el valor de normalización de los datos, aunque probablemente la expresión de estos genes ya era alta se obtuvieron NRT solo de hasta 10 veces más, en comparación a los reportados de hasta  $\approx 40$  y  $\approx 17$  NRT (Fang et al., 2015; Zeng et al., 2017).

Además en este trabajo se observó que la expresión de los genes *brlA* y *abaA* se correlaciona con algunas fases de la conidiación. Castillo-Minjares (2015) observó el crecimiento de *I. javanica* en medió harina de avena en condiciones normales de O<sub>2</sub> quien encontró que en un periodo de 24-36 h hay formación de micelio proveniente de la germinación de los conidios, además en este tiempo aparecen algunos brotes iniciales de conidióforos. A las 48 h de cultivo ya hay conidios abundantes, pero en su mayoría continua siendo micelio; a continuación, de las 60 a las 156 h hay máxima abundancia de conidios, además de formación de conidioforos maduros con entre 4 y 6 fiálides (Castillo-Minjares, 2015). El inicio de la expresión de *brlA* y *abaA* concuerda con las fases de desarrollo de esto HE (Castillo-Minjares, 2015), es decir que a las 60 h ya hay abundancia de conidios y la expresión de *brlA* y *abaA* era alta; a las 96 h, en donde había mayor abundancia de conidios que micelio, se encontró la máxima expresión de *brlA* y *abaA*. A las 144 y 192 h, lapso en el que ya había conidióforos y conidios maduros, la expresión de estos genes comenzó a descender. Este patrón de formación de conidios y perfil transcripcional *brlA* y *abaA*, fue similar a lo observado en *B. bassiana* por Fang et al., (2015).

Mientras que con atmósfera enriquecida se vió que el máximo de expresión de *brlA* y *abaA* se retrasó 48 h, encontrándolo a las 144 h algo similar a lo reportado por Castillo-Minjares (2015) al comparar micrografías de la producción de conidios de *I. javanica*, en condiciones atmosféricas normales y oxidantes, observó que en las condiciones oxidantes se produjo un retardo en la conidiación en esta cepa, esto también podría atribuirse al desplazo de la expresión de *brlA* y *abaA*, en coincidencia con nuestros resultados. Por otra parte se encontró en este estudio que la expresión relativa máxima

de *brlA* y *abaA* (relativa a los niveles de expresión de estos genes a las 68h de cultivo) fue significativamente menor en el tratamiento con 26% de O<sub>2</sub> que los niveles de expresión relativa cuando el HE se cultiva en atmósfera normal.

La baja expresión relativa máxima de *brlA* y *abaA* en condiciones ricas de oxígeno podría deberse a que al inicio de los pulsos *I. javanica* tuvo que adaptarse al cambio de un entorno con atmósfera normal a una atmósfera enriquecida de O<sub>2</sub>; este cambio pudo repercutir en el metabolismo, probablemente desencadenando respuestas generales a estrés que podría incluir la activación de algún regulador negativo de la vía de regulación central de la conidiación. Hasta el momento se conocen tres reguladores negativos clave de la conidiación: SfgA, VosA y NsdD, estos dos últimos regulan la vía central de la conidiación. El factor de transcripción VosA, cuya expresión se activa por AbaA, gobierna la maduración de las esporas y ejerce una regulación por retroalimentación negativa de *brlA* al unirse a su promotor en *A. nidulans* (Yu, 2010, Li et al., 2015). La eliminación del gen *nsdD* en la represión de la conidiación provoca una activación mejorada y precoz de la conidiación en *A. fumigatus* y *A. flavus*. El factor de transcripción NsdD tiene tres regiones de unión en el promotor del gen *brlA*, lo que indica un papel represivo directo de NsdD en la conidiación (Lee M. et al., 2014). Lee M. et al., (2016) hicieron estudios genéticos combinatorios en *A. nidulans*, encontrando que VosA y NsdD son los principales factores que reprimen la expresión de *brlA*; en dicho estudio reportan que la cepa mutante  $\Delta nsdD$  produjo 2.3 veces más conidios que la cepa parental, mientras que el mutante doble  $\Delta nsdD \Delta vosA$  produjo una cantidad similar de conidios a la cepa parental (esto porque VosA es un regulador multifuncional que por un lado regula negativamente a *brlA* y por otro está relacionado con la regulación positiva de la biosíntesis de trehalosa y maduración de conidios). Resultados similares se observaron en *A. flavus*, con lo que sugieren que NsdD es un determinante principal del número de conidios que se producen en condiciones de cultivo sólido y que la unión de NsdD y VosA al promotor *brlA* da como resultado la represión total de *brlA*. NsdD y VosA son proteínas altamente conservadas en varias especies de *Aspergillus* y otros hongos como *Penicillium*, *Coccidioides*, *Ajellomyces*, and *Fusarium* y posiblemente existan proteínas homólogas de estos reguladores en HE, incluyendo *I. javanica*; es probable que la atmósfera rica en oxígeno estimuló la transcripción, o la unión de alguno de estos genes ortólogos a las secuencias regulatorias de *brlA*, que inhibieron la expresión

del gen durante las primeras horas después de los pulsos oxidante. La disminución inicial de la expresión del gen *brlA* causada por los pulsos oxidantes se refleja en que los niveles de expresión del gen *abaA* no alcancen los máximos niveles de expresión observados en el cultivo realizado bajo atmósfera normal, pues la transcripción de *abaA* es activada por la proteína BrlA. Sin embargo, es interesante destacar que aun cuando los niveles de expresión de *brlA* si mostraron variaciones importantes durante el tiempo que se monitoreó el cultivo, bajo condiciones de atmósfera enriquecida, los niveles de *abaA* no disminuyeron en la misma magnitud, y se mantuvieron al menos al mismo nivel que lo observado a las 68 h de cultivo.

Los niveles de transcripción de *brlA* se incrementaron nuevamente a las 144 horas de cultivo (76 horas después de iniciar los pulsos con 26% de oxígeno) y alcanzaron los niveles de expresión observados a las 68 horas de cultivo (antes de los pulsos), y esta segunda activación del gen *brlA* podría ser la causa del incremento de un orden de magnitud en la producción de conidios observada bajo condiciones de atmósfera rica en oxígeno. La proteína BrlA es un factor transcripcional que está involucrada en el desarrollo inicial de conidióforo y la formación de la vesícula; BrlA activa la transcripción de múltiples genes involucrados en la conidiación, entre los cuales están los genes *abaA* y *wetA*. *AbaA* está involucrado en la fase media del desarrollo del conidióforo, mientras que *WetA* está involucrado en la maduración de los conidios y la síntesis de trehalosa. Es probable que los pulsos oxidantes disminuyan la expresión de *brlA*, por lo que no se forman nuevas hifas aéreas, tallos y vesículas, pero los niveles de *abaA* se mantienen constantes a lo largo del tiempo, por lo que podrían promover que la maduración de los conidióforos continúe de manera normal y por lo tanto la producción de conidios (de hecho, a las 96 horas la producción de conidios es la misma bajo atmósfera normal que bajo atmósfera enriquecida en oxígeno); cuando a las 144 horas de cultivo se incrementan nuevamente los niveles de *brlA*, la proteína resultante podría inducir la formación de nuevas vesículas (y nuevos conidióforos) que al continuar con el proceso de diferenciación producen el incremento en la producción de conidios observado.

La secuencia del gen *wetA* ha sido identificada en *B. bassiana* y *M. robertsii*. En el caso de *B. bassiana* se encontró que *wetA* se activa tan pronto como *brlA* pero se transcribe más abundantemente en los días 3 y 7 (Fang et al., 2015). En *M. robertsii* el ortólogo *wetA* permaneció constante durante la conidiación. Desafortunadamente, en nuestro caso no logramos seguir las variaciones en los niveles de expresión de *wetA* debido a que no obtuvimos amplificación de la secuencia correspondiente utilizando los cebadores diseñados a partir de los ADNcs aislados en ninguna de las condiciones experimentales y a ningún tiempo; sin embargo, los mismos cebadores producen un amplicón del tamaño esperado cuando se utiliza DNA genómico como molde. Existen varias posibles explicaciones para estos resultados, las cuales requieren ser analizadas y probadas en trabajos posteriores: podría ser que *I. javanica* tenga más de un ortólogo de *wetA*, y que el ortólogo a partir del cual se diseñaron los cebadores no sea el que está involucrado en la maduración de los conidio; podría ser también que durante la maduración del mRNA de *wetA*, la región en la que se diseñaron los cebadores haya sido editada y ya no esté presente en el transcrito maduro de *wetA*. Dada la importancia de la proteína WetA en la maduración de los conidios, es importante investigar estas dos alternativas en trabajos posteriores, para evaluar la variación en la expresión de este gen en respuesta a los pulsos oxidantes. Este trabajo proporciona una base para una comprensión más profunda de la biología de *I. javanica*, un HE con gran potencial para el control biológico de plagas.

## 10. Conclusiones

Los pulsos con 26% de O<sub>2</sub> aplicados en un cultivo sólido (cada 12 h) tuvieron un efecto positivo en la producción de conidios de *I. javanica*, *M. robertsii* y *B. bassiana* sin modificar los parámetros de calidad como la germinación y la viabilidad con respecto a los producidos en una atmósfera normal (21% de O<sub>2</sub>).

En *I. javanica*, el efecto de los pulsos enriquecidos con 26% de O<sub>2</sub> fue más notorio en los rendimientos de conidios, en comparación con *M. robertsii* y *B. bassiana*.

*I. javanica* tiene secuencias homólogas de los genes *brlA* y *abaA*, involucrados en la formación y maduración de conidios de *B. bassiana*. Los pulsos oxidantes (26% de O<sub>2</sub>) disminuyeron la expresión del gen *brlA*, mientras que la expresión de *abaA* se mantuvo sin cambios, además se desplazó el punto máximo de expresión en comparación con el control (21% de O<sub>2</sub>). Probablemente *brlA* tiene una regulación negativa en respuesta al posible estrés provocado por los pulsos oxidantes.

El perfil de la variación de expresión de *brlA* y *abaA* concuerda con algunas etapas de desarrollo de este HE y la producción de conidios, estableciendo una correlación entre los niveles de expresión de los genes involucrados en la conidiación y las observaciones del desarrollo de conidios que se han presentado previamente.

Este estudio aporta un sistema de producción de conidios de HE con la implementación de pulsos enriquecidos en oxígeno en cultivo sólido, que favorece los rendimientos de conidios a nivel laboratorio y que podría ser un modelo inicial para la producción a gran escala. Además contribuye al poco conocimiento de la vía de formación de conidios de HE siendo el único trabajo hasta el momento en *I. javanica* en el que se confirmó que los genes *brlA* y *abaA* están involucrados en el incremento de la producción de conidios, conocimiento que da pauta a nuevas investigaciones para mejorar la producción de conidios de HE.

## 11. Perspectivas

Estos hallazgos podrían utilizarse para la optimización del proceso de producción de conidios en cultivo sólido, usando pulsos oxidantes de *I. javanica*, pero con cepas donde se manipulen los genes *brlA* y *abaA* por mutaciones dirigidas. Además, para complementar esta investigación sería interesante:

- Realizar pruebas de infectividad de estos HE en invernaderos o en cultivos y corroborar su eficacia. Esto sería la primera etapa del diseño de escalamiento de este proceso de producción de conidios con pulsos oxidante en cultivo sólido.
- Completar el perfil de transcripción de los genes reguladores de la conidiación realizando el análisis de la variación de la expresión de estos genes a las 24 h, 120 h, 168 h y 216 h para determinar: si BrlA activa la transcripción del gen *abaA*, que a su vez activa la transcripción del gen *wetA* como sucede en *A. nidulans*. Además de aclarar si la expresión máxima de *brlA* y *abaA* en atmósfera modificada es a las 144 o entre 144 y 192 h, y poder observar el final del perfil de transcripción de *brlA* como se vio con atmósfera normal.
- Identificar los genes ortólogos en *I. fumosorosea*, involucrados en la regulación negativa de la vía central de la conidiación, para analizar cómo varía su expresión en atmósfera rica en oxígeno y determinar si alguno de estos se activa en respuesta al posible estrés provocado por los pulsos enriquecidos en oxígeno.
- Explorar la posibilidad de detectar los niveles de expresión de *wetA* utilizando otros cebadores, así como de que existan otros genes ortólogos al gen *wetA* en *I. javanica*.



## 12. Bibliografía

- Adams T. H., Wieser J. K. y Yu J-H., (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Molecular Biolgy*. 62: 35-54.
- Aguirre, J. (1993). Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brIA* developmental regulatory gene. *Molecular Microbiology*, 8(2), 211-218. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01565.x
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., y Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3), 111-118. doi:10.1016/j.tim.2005.01.007
- Alatorre-Rosas R., (2007). Hongos entomopatógenos. En: Teoría y aplicación del control biológico. L. A. Arredondo-Bernal, y H. C. Rodríguez-del-Bosque. México: *Sociedad Mexicana de Control Biológico*. (Capítulo 9. 127-143).
- Alkhayyat F, Kim SC y Yu JH (2015) Genetic control of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Adv Appl Microbiol* 90:93–107.
- Ángel-Cuapio A, Figueroa-Montero A, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Perraud-Gaime I, Loera O.(2015). Critical Values of Porosity in Rice Cultures of *Isaria fumosorosea* by Adding Water Hyacinth: Effect on Conidial Yields and Quality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*;177:446-457.
- Ángel-Cuapio, R. A. (2011). Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizaste. México. Maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Aranda Patrick S., LaJoie, Dollie M. y Jorcyk, Cheryl L.. (2012). "Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality". *Electrophoresis*, 33(2), 366-369.
- Arzumanov, T., Jenkins, N., & Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*, 40(3), 1037-1042. doi:10.1016/j.procbio.2004.03.013
- Barrera, J. F. (2007). Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: Teoría y aplicación del control biológico. L. A. Arredondo-Bernal, y H. C. Rodríguez-del-Bosque. México: *Sociedad Mexicana de Control Biológico* (Capítulo 1. 2-13).
- Bedard K y Krause KH. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245–313.
- Beltrán-García, M. J.; Ogura, T.; Manzo, G.; Arias, C. (2006). Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿factores de virulencia y resistencia a los fungicidas? *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(1): 50–58
- Bhargav S., Panda B. P.y Ali M, Javed S., (2008). Solid-state fermentation: an overview. *Chem Biochem Eng Q*. 22(1), 49–70. doi:10.1016/0265-3036(87)90030-3.

- Breyer, V. (2011). Intracellular glycation of nuclear DNA, mitochondrial DNA, and cytosolic proteins triggered by endogenous oxidative stress. Alemania: Tesis de doctorado. Naturalwissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Candas M. y Bulla L. A., (2003). Microbial Insecticides. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* Copyright 2002 by John Wiley y Sons.
- Carballo M. y Guharay F. (2004). Control biológico de plagas agrícolas. 1ª ed. *Managua: CATIE*. pag 224-229.
- Carneiro-Leao M., Andreote F., Araújo W. y Oliveira N., (2011). Differential expression of genes involved in entomopathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Clavicipitaceae). *Genetics and Molecular Research*. 10 (2): 769-77.
- Castillo-Minjarez José Miguel Ángel (2015). Determinación del momento de aplicación de pulsos con 26% de oxígeno para el mejoramiento de la calidad de los conidios de *Isaria fumosorosea*. Maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Clutterbuck, A.J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63, 317–327.
- Dalla-Santa, H. S., Sousa, N. J., Brand, D., Dalla Santa, O. R., Pandey, A. y Sobotka, M.,. Soccol, C. R. (2004). Conidia production of *Beauveria* sp. by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. *Folia Microbiologica*, 49(4), 418.
- Derveaux-Stefaan, Vandesompele-Jo y Hellemans Jan, (2009). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4), 227-230. doi:10.1016/j.ymeth.2009.11.001.
- Eilenberg, J., Hajek, A., y Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46(4):387-400. doi:10.1023/A:1014193329979
- Fang L., Han-Qiang S., Sheng-Hua Y. yMing-Guang F., (2015). WetA and VosA are distinct regulators of conidiation capacity, conidial quality, and biological control potential of a fungal insect pathogen. *Microbiol Biotechnol*. 99:10069–10081. doi 10.1007/s00253-015-6823-7.
- Fang, W., Pei, Y., y Bidochka, M. J. (2007). A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153(4), 1017-1025. doi:10.1099/mic.0.2006/002105-0
- Fang, W., Scully, L. R., Zhang, L., Pei, Y., y Bidochka, M. J. (2008). Implication of a regulator of G protein signalling (BbRGS1) in conidiation and conidial thermotolerance of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 279(2), 146-156. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00978.x
- Faria y Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.08.001

- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J. K., Rehner, S. A., y Wcislo, W. T. (2006). Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1594), 1689–1695. <http://doi.org/10.1098/rspb.2006.3492>
- Fischbein Deborah, (2013). Introducción a la teoría del control biológico de plagas. San Carlos de Bariloche, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ISSN 1851-4103.
- Gallou A., Serna-Domínguez M., Berlanga-Padilla A., Ayala-Zermeño M., Mellín-Rosas M., Montesinos-Matías R. y Arredondo-Bernal H. (2016). Species clarification of *Isaria* isolates used as bicontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biology*. 120(3), 414-423.
- García-García M. A., Cappello-García S., Leshner-Gordillo J. M., y Molina Martínez, R. F. (2008). Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. *KUXULKAB*, 25-28.
- García-Ortiz Nohemi, 2016. Calidad y proteoma de conidios de *Metarhizium anisopliae* producidos con atmósferas modificadas. Doctor en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- García-Ortiz, N., Tlecuitl-Beristain, S., Favela-Torres, E., y Loera, O. (2015). Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: Critical oxygen level and period of mycelium competence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2783-2791. doi:10.1007/s00253-014-6225-2
- Garza-López P. M., Königsberg M., Gómez-Quiroz L. y Loera O. (2012). Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to Different Oxygen Concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28, 353-359.
- Garza-Lopez, P., Suarez-Vergel, G., Hamdan-Partida, A., y Loera, O. (2015). Variations in oxygen concentration cause differential antioxidant response and expression of related genes in *Beauveria bassiana*. *Fungal Biology*, 119(4), 257-263. doi:10.1016/j.funbio.2014.12.012
- Goettel y Roberts (1992). Mass production, formulation, and field application of entomopathogenic fungi. pp. 230-238. In: *Biological Control of Locusts and Grasshoppers: State of the Art* (Lomer, C., and Prior, C., eds.), CAB International, Wallingford, UK.
- Gómez-Preciado David, (2014). Efecto del sistema de cultivo con pulsos oxidantes en la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*. Tesis de maestría. Posgrado en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Hansberg T. W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, 19-54.
- Hansberg W., De Groot H. y Sies H. (1993). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*. 14(3): 287-293.
- Hernández-Antonio A., Hansen-Anne M. 2011. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(2), 115-127.

- Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W., y Keyhani, N. O. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (cordyceps) bassiana*. *Microbiology*, 153(10), 3448-3457. doi:10.1099/mic.0.2007/008524-0
- Humber R. A., (2009). Entomogenous fungi. In M. Schaechter (Ed.) (3rd Ed.). San Diego: Academic Press. *Encyclopedia of Microbiology* 3:443-456.
- Ibrahim, L., Butt T. y Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 106(6): 705-715.
- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST, (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogenics for use in insect biocontrol. *BioControl*. 55,129-45.
- Jaronski y Jackson M.A. (2012) Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: Lacey LA (ed) *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2nd edn. Academic Press, New York, pp 255–284
- Jenkins N. E., Heviefo G. y Langewald J., (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol*. 19: 21–31.
- Jenkins y Grzywacz, D. (2000). Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 53–777. <http://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Jiménez-Edgardo M.,(2009). Métodos de Control de Plagas. Licenciatura en Ingeniería en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRICOLA. Pag. 50.
- Jongjangklang C.Y., Anh Nhung N. H., Kitsubun P. y Amnuaykanjanasin A., (2011). Scale-up production of *Beauveria bassiana* conidia for biocontrol by solid state fermentation culture. 4th International Conference on Fermentation. *Technology for Value Added Agricultural Products* (Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand).
- Kang, S. W., Lee, S. H., Yoon, C. S., y Kim, S. W. (2005). Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*, 27(2), 135-139. doi:10.1007/s10529-004-7871-8
- Kershaw y Talbot N.J. (1998). Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in the fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 23: 18-33, 83. doi:10.1006/fgbi.1997.1022
- Khan-Sehroon, Guo, L., Maimaiti, Y., Mijit, M., y Qiu, D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding*, 3(7) doi:10.5376/mpb.2012.03.0007
- Kim, K.H., Williger, S.D., Park, S.W., Puttikamonkul, S., Grahl, N., Cho, Y., Mukhopadhyay, B., Cramer, R.A. y Lawrence, C.B. (2009). TmpL, a transmembrane protein required for intracellular redox homeostasis and virulence in a plant and animal fungal pathogen. *PLoS Pathogens*. 5(11): e1000653. doi: 10.1371.

- Lee, M., Kwon, N., Choi, J. M., Lee, I., Jung, S., y Yu, J. (2014). NsdD is a key repressor of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 197(1), 159-173. doi:10.1534/genetics.114.161430
- Lee, M., Kwon, N., Lee, I., Jung, S., Kim, S., y Yu, J. (2016). Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Scientific Reports*, 6, 28874. doi:10.1038/srep28874
- Li, Q., Wang, L., Zhang, Z., Wang, Q., Ren, J., Wang, M., Xu, W., Wang, J. Lu, Y., Du, Q. y Sun, Z., (2012). Genome sequencing and analysis of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* D1-5. *Unpublished* 1,1-365.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., y Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 667-702. doi:10.1146/annurev.ento.46.1.667
- López F., Martínez M. D. y Barandica J. M. (1994). Four new species of the genus *Leptanilla* from Spain Relationships to other species and ecological issues. *Sociobiology*. 24 (2): 179-212.
- López-Lastra C., Hajek A. E. y Humber R. A., (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, 80(10), 1126-1130. doi:10.1139/b02-090
- López-Perez M., Rodríguez-Gomez D. y Loera O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*, 35(3), 334. ISSN: 0738-8551. doi: 10.3109/07388551.2013.857293
- Mah y Yu JH. (2006). Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*;5:1585–1595.
- Manley Donald G., Murdock Edward C., Thompson John, W. Romando James, King Donnie R. y Miller R. Walker, (2001). Biological Control of Pests 4-H IPM Project. *CLEMSON extencion*.
- Marshall y Timberlake ,W.E. (1991). *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression *Mol. Cell. Biol.* 11 (1), 55-62.
- Miranda-Hernández F., Ángel-Cuapio R.A. y Loera O. (2017). "Production of fungal spores for biological control". In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Ed: Pandey A., Negi S y Soccol C. ELSEVIER. (Capítulo 33. 757-779). ISBN: 978-0-444-63662-1. DOI:10.1016/B978-0-444-63662-1.00033-6.
- Miranda-Hernández J.F., Saucedo-Castañeda G., Alatorre-Rosas R. y 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. ISSN: 1526-498X doi: 10.1002/ps.3605.
- Miranda-Hernández José Francisco, 2014. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en estado oxidante y análisis de su respuesta a distintos tipos de estrés. Doctor en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

- Miranda-Hernández José Francisco. (2010). Influencia del incremento de O<sub>2</sub> en la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos. Maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Mitchell D. A., Berovic M. y Krieger N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 68, 61-138.
- Montesinos-Matías R., 2008. Relación entre las variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. México: Tesis de Maestría. Posgrado en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Montesinos-Matías R., Viniestra-González G., Alatorre-Rosas R., Loera O. (2011). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy Dglucose- resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(9): 2095-2102.
- Monzon A., (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. *CATIE*, Costa Rica. 63: 95- 103.
- Mullis KB. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*; 262: 56-61.
- Muñiz-Paredes Facundo Rafael. (2016). Comparación en la producción de conidios del genero *Isaria* en cultivos superficiales y sólidos sometidos a pulsos oxidantes. Doctor en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Muñiz-Paredes, F., Garza-López, P. M., Viniestra-González, G., y Loera, O. (2016). Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: Conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(7), 1-11. doi:10.1007/s11274-016-2072-x
- Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., y Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: From inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 1-9. doi:10.1007/s11274-017-2229-2
- Myoung-Hwan y Craven-Kelly (2013). Oxygen and an extracellular phase transition independently control central regulatory genes and conidiogenesis in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*, 8(9), e74805. doi:10.1371/journal.pone.0074805
- Ni M, Gao N, Kwon NJ, Shin KS y Yu JH.(2010). Regulation of *Aspergillus* conidiation. In: Borkovich KA, Ebbole DJ, editors. Cellular and molecular biology of filamentous fungi. Washington, DC: ASM Press. pp. 559–576.
- Ni y Yu, J. (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 2(10), e970. doi:10.1371/journal.pone.0000970
- Nuñez-Gaona, Oscar, Saucedo-Castañeda, Gerardo, Alatorre-Rosas, Raquel, y Loera, Octavio. (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(4), 771-777.

- Organización de las Naciones Unidas (ONU), (2015). Se pierden entre 20 y 40% de rendimientos en cultivos por plagas: FAO. Noticias MVS. <http://www.noticiasmvs.com/#!/noticias/se-pierden-entre-20-y-40-de-rendimientos-en-cultivos-por-plagas-fao-463>.
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., y Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1057-1068. doi:10.1007/s00253-014-6270-x
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 81-84. doi:10.1016/S1369-703X(02)00121-3
- Park y Yu, J. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), 669-677. doi:10.1016/j.mib.2012.09.006
- Park y Yu, J. (2016). Developmental regulators in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Microbiology*, 54(3), 223-231. doi:10.1007/s12275-016-5619-5
- Pucheta-Diaz (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.
- QIAGEN (2011). Rotor-Gene® Multiplex Handbook
- Reboucas-Emanuela de Lima, Costa-José J. do N., Passos-Maria J., Passos-José Renato de Sousa, Hurk-Robert van den y Silva-José R. V., (2013). Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Biology and Technology*, 56(1), 143-154. ISSN 1516-8913.
- Roció-Méndez Robles (2016). 37% de los alimentos del campo se pierden por insectos y plagas: expertos. Noticias MVS. <http://www.noticiasmvs.com/#!/noticias/37-de-los-alimentos-frescos-del-campo-se-pierden-por-insectos-y-plagas-alertan-expertos-56>.
- Rodríguez-Gómez D., Saucedo-Castañeda G., Loera, O., y Viniegra-González G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(3), 513-518.
- Ruis y Schüller C. (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssays* 17:959-965.
- Ruíz-Corral, Bravo Mosqueda, Ramírez Ojeda, Báez González, Álvarez Cilva, Ramos González, Camberos y Byerly Murphy, (2013). PLAGAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN MÉXICO: Aspectos de su biología y ecología. SAGARPA. ISBN: 978-607-37-0127-3.
- Ruíz-Leza, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J.C. y Aguilar, C.N. (2007). Diseño de reactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6: 33-40.
- Samuels K. D., Llewellyn M. (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53(1), 25-31
- Santoro, P., Zorzetti, J., Constanski, K., y Neves, P. (2014). Conidial production, virulence, and stress tolerance of *Beauveria bassiana* conidia after successive in vitro subculturing. *Revista Colombiana De Entomología*, 40(1), 85-90.

- Sewall, T.C., Mims, C.W., and Timberlake, W.E. (1990). Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (wetA) mutant strains. *Dev. Biol.* 138, 499–508.
- Suarez-Vergel Gerardo (2017). Producción de conidios de dos cepas de *Isaria* en dos tipos de atmósfera: Relación de la calidad con la respuesta antioxidante. Maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Summy y French J.V. (1988). Biological control of agricultural pests: concepts every producer should understand. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.* 41:119-133. ISSN: 0485-2044
- Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C., (2012). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud.* 2:70-78.
- Tanada y Kaya, H. (1993). *Insect Pathology*. Academy Press. New York: Mc-Graw Hill.
- Taylor, B., Edgington, S., Luke, B., y Moore, D. (2013). Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *Journal of Stored Products Research*, 53, 23 - 26. doi: 10.1016 / j.jspr; 02.004
- Thomas y Read, A., (2007). Can fungal biopesticides control malaria?. *Nature Reviews Microbiology*; 5(5): 377-382. doi: 10.1038 / nrmicro1638
- Tlecuítl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., y Loera, O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. lepidiotum conidial production and quality. *Mycopathologia*, 169(5), 387-394. doi:10.1007/s11046-009-9268-7
- Toledo, A. V., Alippi, A. M., y A.M.M. de Remes Lenicov. (2011). Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, dalbulus maidis and the planthopper, delphacodes kuscheli, two important vectors of maize pathogens. *Journal of Insect Science*, 11, 1-13. doi:10.1673/031.011.0129
- Tunga, R., Banerjee, R. y Bhattacharyya, B.C., (1998). Optimizing some factors affecting proteases production under solid state fermentation. *Biopr. Eng.* 19: 187.190.
- Ulrich, K. R., Feldlauer, M. F., Kramer, M., y St. Leger, R. J. (2015). Inhibition of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato in vitro by the bed bug defensive secretions (E)-2-hexenal and (E)-2-octenal. *Biocontrol*, 60(4), 517-526. doi:10.1007/s10526-015-9667-2
- Unlu-Levent, Ogyr Ekrem y Celik-Yusuf, (2012). The importance of integrated pest management for sustainable agricultura. *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*, Online ISSN: 2147-3781
- Wang y Leger R. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell.* 6(5):808-816.
- Wyss G.S., Charudattan R. y DeValerio J.T. (2001) Evaluation of agar and grain media for mass production of conidia of *Dactylaria higginsii*. *Plant Dis* 85:1165–1170. doi: 10.1094/PDIS.2001.85.11.1165



- Xiao,G., Ying,S.-H., Zheng,P., Wang,Z.-L., Zhang,S., Xie,X.-Q. Shang,Y., St Leger,R.J., Zhao,G.-P., Wang,C. y Feng,M.-G., 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep* 2, 483.
- Yu, J. (2010). Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 38(4), 229-237. doi:10.4489/MYCO.2010.38.4.229
- Zeng, G., Chen, X., Zhang, X., Zhang, Q., Xu, C., Mi, W. y Fang, W. (2017). Genome-wide identification of pathogenicity, conidiation and colony sectorization genes in *Metarhizium robertsii*. *Environmental Microbiology*, 19(10), 3896-3908. doi:10.1111/1462-2920.13777
- Zhao H, Lovett B y Fang W. (2016). Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi. *Adv Genet.*;94:137-63. doi: 10.1016/bs.adgen.2015.11.001.

## Anexo 1

### Búsqueda *in silico* de genes reguladores de la conidiación en hongos

En la Tabla A1.1 se muestra en número de acceso del Genebank de las secuencias de los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* de *Aspergillus nidulans*, así como el número de acceso del Genebank de las secuencias de estos genes reportadas en *Beauveria bassiana*, es decir las secuencias que fueron ortólogas a las secuencias de los genes reguladores de la conidiación en *A. nidulans*.

**Tabla A1.1.** Número de acceso del Genebank de los genes reguladores de la conidiación

Organismo	Gen	Numero de acceso del Genebank			Ref.
		<i>brlA</i>	<i>abaA</i>	<i>wetA</i>	
<i>Aspergillus nidulans</i>		AAA33300.1	AAA33330.1	AAA33330.1	Adams, T.H et al. 1998; Marshall y Timberlake, 1991
<i>Beauveria bassiana</i>		KGQ06299.1	KGQ12051.1	J5JPY5.1	Li Q. et al., 2012; Xiao et al., 2012

## Anexo 2

### Diseño *in silico* de oligonucleótidos y sondas para multiplex RT-qPCR

Como se mencionó el diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando la página Genscript, en la Tabla A2.1 se muestran los oligonucleótidos que se eligieron porque producen un amplicon no mayor a 200 pb, esto porque productos más largos no se amplifican tan eficientemente; el tamaño de los oligonucleótidos fue entre 18 y 25 pb por lo que tenían temperaturas de alineación similares, además de que su porcentaje de GC y AT no era mayor al 50%. Se cuidó también de que, las T<sub>m</sub> de los cebadores y sondas de los diferentes genes son similares lo que nos permitiría amplificar simultáneamente los diferentes genes, son muy específicos (Anexo 3, Figura A3.1) y por último no son complementario ni autocomplementarios aspecto importante dado que no se formaron dímeros de cebador o sondas (Anexo 3, Figura A3.2) (Tamay de Dios *et al.*, 2013; QIAGEN).

**Tabla A2.1** Oligonucleótidos y sondas para multiplex RT-qPCR.

Gen	Tamaño del amplicon	Oligo	Secuencia (5´-3´)	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño (b)
<i>brlA</i>	103 pb	Sendido	GAGACACAAGCAGACGTTCC	56	20
		Antisentido	GCGGTGGTTGTTGAGATTGT	56	20
		Sonda	CCGCAGAACTCACACGAGAAACGGT	64	25
<i>abaA</i>	187 pb	Sendido	AAGATGCCTTCGTCGACTCT	56	20
		Antisentido	CCCATCTGCTCAATGCTGTC	56	20
		Sonda	CCTCACATGGGCCCGCCGCAA	65	20
<i>wetA</i>	104 pb	Sendido	AGTTTGACGACCCATTTGGC	56	20
		Antisentido	TTGGCTGTAGTACCGCATCT	56	20
		Sonda	TCCAACACACGCGCCGCCAC	66	20

## Anexo 3

### Especificidad y Complementariedad de oligonucleótidos y sondas

Con ayuda del programa BLAST se corroboró que los cebadores y sondas fueran muy específicos de los diferentes genes, en todos los caso se obtuvieron porcentajes de identidad del 100% (Figura A3.1) y para corroborar la complementariedad se utilizó el programa DNAMAN (Figura A3.2)

**Fig. A3.1** Especificidad de cebadores y sondas de los genes *brlA* Fig I (Sentido a, Antisentido b y Sonda c), *abaA* II (Sentido a, Antisentido b y Sonda c) y *wetA* III (Sentido a, Antisentido b y Sonda c).

**l)**

**a**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding protein partial mRNA</a>	50.1	50.1	100%	1e-07	100%
<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 ubiquitin conjugation factor E4 partial mRNA</a>	26.3	26.3	52%	2.1	100%
<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 myosin-5 partial mRNA</a>	26.3	44.6	52%	2.1	100%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding protein partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018852840.1](#) Length: 1113 Number of Matches: 1

Range 1: 864 to 883 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.24	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

Query 1 GAGACACAAGCAGACGTTCC 20  
Sbjct 864 GAGACACAAGCAGACGTTCC 883

**b**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding protein partial mRNA</a>	40.1	40.1	100%	0.24	100%
<a href="#">Trichoderma reesei QM6a chromosome VII, complete sequence</a>	36.2	64.4	100%	3.8	100%
<a href="#">PREDICTED: Paralichthys olivaceus rho GTPase-activating protein 32-like (LOC109630294), transcript variant X2, mRNA</a>	36.2	36.2	90%	3.8	100%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding protein partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018852840.1](#) Length: 1113 Number of Matches: 1

Range 1: 947 to 966 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	9e-05	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus

Query 1 GCGGTGGTTGTTGAGATTGT 20  
Sbjct 966 GCGGTGGTTGTTGAGATTGT 947

**c**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding protein partial mRNA</a>	50.1	50.1	100%	1e-07	100%
<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 ubiquitin conjugation factor E4 partial mRNA</a>	26.3	26.3	52%	2.1	100%
<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 myosin-5 partial mRNA</a>	26.3	44.6	52%	2.1	100%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding protein partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018852840.1](#) Length: 1113 Number of Matches: 1

Range 1: 899 to 923 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
50.1 bits(25)	1e-07	25/25(100%)	0/25(0%)	Plus/Minus

Query 1 CCGCAGAACTCACACGAGAAACGGT 25  
Sbjct 923 CCGCAGAACTCACACGAGAAACGGT 899

## II)

a	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 transcription factor AbaA (ISF_09412), partial mRNA</a>	40.1	58.5	100%	9e-05	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Xaa-Pro dipeptidase (ISF_03018), partial mRNA</a>	30.2	30.2	75%	0.085	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Zinc finger, C2H2-like protein (ISF_09748), partial mRNA</a>	28.2	46.6	70%	0.34	100%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 transcription factor AbaA (ISF\_09412), partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018853014.1](#) Length: 2736 Number of Matches: 2

Range 1: 467 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	9e-05	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AAGATGCCCTTCGTGACTCT 20
          |||
Sbjct 467 AAGATGCCCTTCGTGACTCT 486
  
```

b	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 transcription factor AbaA (ISF_09412), partial mRNA</a>	40.1	40.1	100%	9e-05	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 Ras guanine nucleotide exchange factor (ISF_07510), partial mRNA</a>	30.2	30.2	75%	0.085	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 abc transporter (ISF_07190), partial mRNA</a>	28.2	66.9	100%	0.34	94%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 transcription factor AbaA (ISF\_09412), partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018853014.1](#) Length: 2736 Number of Matches: 1

Range 1: 634 to 653 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	9e-05	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  CCCATCTGCTCAATGCTGC 20
          |||
Sbjct 653 CCCATCTGCTCAATGCTGC 634
  
```

c	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 transcription factor AbaA (ISF_09412), partial mRNA</a>	40.1	40.1	100%	9e-05	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein (ISF_05875), partial mRNA</a>	32.2	32.2	80%	0.021	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein (ISF_00884), partial mRNA</a>	28.2	28.2	70%	0.34	100%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 transcription factor AbaA (ISF\_09412), partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018853014.1](#) Length: 2736 Number of Matches: 1

Range 1: 499 to 518 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	9e-05	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CCTCACATGGGCGCCGCAA 20
          |||
Sbjct 499 CCTCACATGGGCGCCGCAA 518
  
```

## III)

a	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA</a>	40.1	40.1	100%	9e-05	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA</a>	30.2	30.2	75%	0.085	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA</a>	28.2	46.6	75%	0.34	100%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018850497.1](#) Length: 1842 Number of Matches: 1

Range 1: 836 to 855 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	9e-05	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AGTTTGACGACCCATTTGGC 20
          |||
Sbjct 836 AGTTTGACGACCCATTTGGC 855
  
```

b	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA</a>	40.1	40.1	100%	9e-05	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA</a>	26.3	26.3	65%	1.3	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 abc transporter partial mRNA</a>	26.3	26.3	65%	1.3	100%

Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein partial mRNA  
Sequence ID: [XM\\_018850497.1](#) Length: 1842 Number of Matches: 1

Range 1: 920 to 939 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	9e-05	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  TTGGCTGTAGTACCGCATCT 20
          |||
Sbjct 939 TTGGCTGTAGTACCGCATCT 920
  
```

C	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein (ISF_06893), partial mRNA</a>	40.1	97.1	100%	9e-05	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein (ISF_06919), partial mRNA</a>	30.2	123	85%	0.085	100%
	<a href="#">Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hcd (ISF_02440), partial mRNA</a>	30.2	30.2	75%	0.085	100%

**Isaria fumosorosea ARSEF 2679 hypothetical protein (ISF\_06893), partial mRNA**

Sequence ID: [XM\\_018850497.1](#) Length: 1842 Number of Matches: 4

Range 1: 867 to 886 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previo](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	9e-05	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

Query 1 TCCAACACACGGCCGCCAC 28  
Sbjct 867 TCCAACACACGGCCGCCAC 886

**Fig. A3.2** Complementariedad de oligonucleótidos y sondas de los diferentes genes.



<p>Primer_Primer</p> <p>R brlA con F Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.60 Kcal/mol</p> <p>5'--CGCGTGGTGTGGAGATTGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CAATGCTCCAGCTTTCG-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'--CGCGTGGTGTGGAGATTGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CAATGCTCCAGCTTTCG-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>R brlA con R Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 6 bp, free energy=-3.30 Kcal/mol</p> <p>5'--GCGGTGGTGTGGAGATTGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--GTACTTCTCCAACTCTCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 9 bp</p> <p>5'--GCGGTGGTGTGGAGATTGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--GTACTTCTCCAACTCTCT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>R brlA con P Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.60 Kcal/mol</p> <p>5'--GCGGTGGTGTGGAGATTGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'--GCGGTGGTGTGGAGATTGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con F abaA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-1.50 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TCTCAGCTCTTCGTAGAA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TCTCAGCTCTTCGTAGAA-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con R abaA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 5 bp, free energy=-3.20 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CTGTGTAACCTGTGTACCC-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 9 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CTGTGTAACCTGTGTACCC-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con P abaA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.80 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--AACCGCCCGGGTACACTCC-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--AACCGCCCGGGTACACTCC-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con F wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy= 0.20 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CGGTTACCCAGCACTTGA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 9 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CGGTTACCCAGCACTTGA-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con R wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-3.00 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TCTAGCCATGATCGGTT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TCTAGCCATGATCGGTT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con P wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy=-1.70 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CACCGCCCGGCACACAACCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CACCGCCCGGCACACAACCT-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con F Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 5 bp, free energy=-2.00 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CAATGCTCCAGCTTTCG-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CAATGCTCCAGCTTTCG-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con R Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.50 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--GTACTTCTCCAACTCTCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--GTACTTCTCCAACTCTCT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P brlA con P Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 5 bp, free energy=-3.20 Kcal/mol</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 9 bp</p> <p>5'--CCGCAAGACTCACAGAGAAACGGT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>F abaA con F wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 5 bp, free energy=-3.10 Kcal/mol</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CGGTTACCCAGCACTTGA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CGGTTACCCAGCACTTGA-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>F abaA con R wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 6 bp, free energy=-4.70 Kcal/mol</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TCTAGCCATGATCGGTT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 10 bp</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TCTAGCCATGATCGGTT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>F abaA con P wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.10 Kcal/mol</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CACCGCCCGGCACACAACCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CACCGCCCGGCACACAACCT-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>F abaA con F Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.50 Kcal/mol</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CAATGCTCCAGCTTTCG-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--CAATGCTCCAGCTTTCG-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>F abaA con R Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.50 Kcal/mol</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--GTACTTCTCCAACTCTCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--GTACTTCTCCAACTCTCT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>F abaA con P Btub</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 2.10 Kcal/mol</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TTACCGTCTCG/NEZ/TCCAGTCCA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <p>5'--AAGATGCTTGTGCACTCT-3'</p> <p>     </p> <p>3'--TTACCGTCTCG/NEZ/TCCAGTCCA-5'</p>

<p>Primer_Primer</p> <p>P abaA con F wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 5 bp, free energy=-4.60 Kcal/mol</p> <pre> 5'-CCTCAGATGGGCGCCGCAA-3'             3'-CGGTTACCCAGCACTTGA-5'  Max complementarity in discontinuous: 11 bp 5'-CCTCAGATGGGCGCCGCAA-3'                       3'-CGGTTACCCAGCACTTGA-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>P abaA con R wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.80 Kcal/mol</p> <pre> 5'-CCTCAGATGGGCGCCGCAA-3'           3'-TCTACGCCATGATCGGTT-5'  Max complementarity in discontinuous: 8 bp 5'-CCTCAGATGGGCGCCGCAA-3'                    3'-TCTACGCCATGATCGGTT-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>P abaA con P wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.00 Kcal/mol</p> <pre> 5'-CCTCAGATGGGCGCCGCAA-3'           3'-CACCGCGCGCCACACACT-5'  Max complementarity in discontinuous: 7 bp 5'-CCTCAGATGGGCGCCGCAA-3'                   3'-CACCGCGCGCCACACACT-5' </pre>
<p>Primer_Primer</p> <p>R abaA con F wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.80 Kcal/mol</p> <pre> 5'-CCCATCTGCTCAATGCTGC-3'           3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5'  Max complementarity in discontinuous: 6 bp 5'-CCCATCTGCTCAATGCTGC-3'                   3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>R abaA con R wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.60 Kcal/mol</p> <pre> 5'-CCCATCTGCTCAATGCTGC-3'           3'-GTACTTCTCCAACTCT-5'  Max complementarity in discontinuous: 6 bp 5'-CCCATCTGCTCAATGCTGC-3'                   3'-GTACTTCTCCAACTCT-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>R abaA con P wetA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-0.30 Kcal/mol</p> <pre> 5'-CCCATCTGCTCAATGCTGC-3'            3'-TTACCGTCTGCTCACTCCA-5'  Max complementarity in discontinuous: 7 bp 5'-CCCATCTGCTCAATGCTGC-3'                   3'-TTACCGTCTGCTCACTCCA-5' </pre>
<p>Primer_Primer</p> <p>F wetA con F Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.80 Kcal/mol</p> <pre> 5'-AGTTTGACGACCCATTGGC-3'           3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5'  Max complementarity in discontinuous: 6 bp 5'-AGTTTGACGACCCATTGGC-3'                  3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>F wetA con R Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-0.40 Kcal/mol</p> <pre> 5'-AGTTTGACGACCCATTGGC-3'            3'-GTACTTCTCCAACTCT-5'  Max complementarity in discontinuous: 8 bp 5'-AGTTTGACGACCCATTGGC-3'                   3'-GTACTTCTCCAACTCT-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>F wetA con P Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-3.10 Kcal/mol</p> <pre> 5'-AGTTTGACGACCCATTGGC-3'            3'-TTACCGTCTGCTCACTCCA-5'  Max complementarity in discontinuous: 7 bp 5'-AGTTTGACGACCCATTGGC-3'                     3'-TTACCGTCTGCTCACTCCA-5' </pre>
<p>Primer_Primer</p> <p>R wetA con F Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 2.80 Kcal/mol</p> <pre> 5'-TTGGCTGTAGTACCCATCT-3'           3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5'  Max complementarity in discontinuous: 7 bp 5'-TTGGCTGTAGTACCCATCT-3'                     3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>R wetA con R Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.20 Kcal/mol</p> <pre> 5'-TTGGCTGTAGTACCCATCT-3'           3'-GTACTTCTCCAACTCT-5'  Max complementarity in discontinuous: 7 bp 5'-TTGGCTGTAGTACCCATCT-3'                    3'-GTACTTCTCCAACTCT-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>R wetA con P Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-3.10 Kcal/mol</p> <pre> 5'-TTGGCTGTAGTACCCATCT-3'            3'-TTACCGTCTGCTCACTCCA-5'  Max complementarity in discontinuous: 7 bp 5'-TTGGCTGTAGTACCCATCT-3'                     3'-TTACCGTCTGCTCACTCCA-5' </pre>
<p>Primer_Primer</p> <p>P wetA con F Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.10 Kcal/mol</p> <pre> 5'-TCCACACAGCGCCGCCAC-3'           3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5'  Max complementarity in discontinuous: 5 bp 5'-TCCACACAGCGCCGCCAC-3'                3'-CAATGCTCCAGTCTTCG-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>P wetA con R Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous is less than 3 bp</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 5 bp</p> <pre> 5'-TCCACACAGCGCCGCCAC-3'                  3'-GTACTTCTCCAACTCT-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>P wetA con P Stuh</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous is less than 3 bp</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <pre> 5'-TCCACACAGCGCCGCCAC-3'                  3'-TTACCGTCTGCTCACTCCA-5' </pre>
<p>Primer_Primer</p> <p>F brlA con R brlA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-0.10 Kcal/mol</p> <pre> 5'-GAGACACAGCAGCACTTCC-3'            3'-TGTTAGAGTTGTTGTTGCC-5'  Max complementarity in discontinuous: 8 bp 5'-GAGACACAGCAGCACTTCC-3'                    3'-TGTTAGAGTTGTTGTTGCC-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>F brlA con P brlA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy= 0.20 Kcal/mol</p> <pre> 5'-GAGACACAGCAGCACTTCC-3'            3'-TGGCAAGAGCACACTCAAGACCC-5'  Max complementarity in discontinuous: 7 bp 5'-GAGACACAGCAGCACTTCC-3'                     3'-TGGCAAGAGCACACTCAAGACCC-5' </pre>	<p>Primer_Primer</p> <p>R brlA con P brlA</p> <p>Two primers complementarity.</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-4.80 Kcal/mol</p> <pre> 5'-GGGTGTTGTTGAGATTGT-3'            3'-TGGCAAGAGCACACTCAAGACCC-5'  Max complementarity in discontinuous: 9 bp 5'-GGGTGTTGTTGAGATTGT-3'                        3'-TGGCAAGAGCACACTCAAGACCC-5' </pre>



<p>Primer_Primer</p> <p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-1.20 Kcal/mol</p> <p>5'-GAGACACAGCAGACCTCC-3'                  3'-CCTTGCAGACGACAGAG-5'</p> <p>F brlA con F brlA</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'-GAGACACAGCAGACCTCC-3'                             3'-CCTTGCAGACGACAGAG-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous is less than 3 bp</p> <p>R brlA con R brlA</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 4 bp</p> <p>5'-GCGGTGGTGTGAGATTGT-3'                             3'-TGTAGAGTGTGTGGTGGC-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy=-1.70 Kcal/mol</p> <p>5'-CCGACAGCTCACAGAAAGGT-3'                 3'-TGGCAAGACACACTCAAGACCC-5'</p> <p>P brlA con P brlA</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'-CCGACAGCTCACAGAAAGGT-3'                               3'-TGGCAAGACACACTCAAGACCC-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.00 Kcal/mol</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                 3'-TCTACGCCATGATGCGGT-5'</p> <p>R wetA con P wetA</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                             3'-TCTACGCCATGATGCGGT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-1.90 Kcal/mol</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                  3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p> <p>R wetA con P wetA</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 9 bp</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                             3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-1.90 Kcal/mol</p> <p>5'-TTGGCTGTAGTACCGCATCT-3'                 3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p> <p>R wetA con P wetA</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'-TTGGCTGTAGTACCGCATCT-3'                             3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>F de abaA con R de abaA</p> <p>Max complementarity in continuous: 5 bp, free energy=-1.60 Kcal/mol</p> <p>5'-AAGATGCCCTTCGTGACTCT-3'                   3'-CTGTCTAACTGCTACCC-5'</p> <p>R de abaA con P de abaA</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.60 Kcal/mol</p> <p>5'-AAGATGCCCTTCGTGACTCT-3'                 3'-AACGCCCGGGGTACACTCC-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <p>5'-AAGATGCCCTTCGTGACTCT-3'                             3'-CTGTCTAACTGCTACCC-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>R de abaA con R de abaA</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.60 Kcal/mol</p> <p>5'-CCATCTGCTCAATGCTGTC-3'                 3'-CTGTCTAACTGCTACCC-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <p>5'-CCATCTGCTCAATGCTGTC-3'                             3'-CTGTCTAACTGCTACCC-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>R de abaA con P de abaA</p> <p>Max complementarity in continuous: 5 bp, free energy=-4.60 Kcal/mol</p> <p>5'-CCATCTGCTCAATGCTGTC-3'                   3'-AACGCCCGGGGTACACTCC-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'-CCATCTGCTCAATGCTGTC-3'                             3'-AACGCCCGGGGTACACTCC-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>F de abaA con F de abaA</p> <p>Max complementarity in continuous: 6 bp, free energy=-4.40 Kcal/mol</p> <p>5'-AAGATGCCCTTCGTGACTCT-3'                   3'-TCTACGCTTCCTCCAGAA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'-AAGATGCCCTTCGTGACTCT-3'                             3'-TCTACGCTTCCTCCAGAA-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>R de abaA con R de abaA</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.60 Kcal/mol</p> <p>5'-CCATCTGCTCAATGCTGTC-3'                 3'-CTGTCTAACTGCTACCC-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <p>5'-CCATCTGCTCAATGCTGTC-3'                             3'-CTGTCTAACTGCTACCC-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P de abaA con P de abaA</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-0.30 Kcal/mol</p> <p>5'-CCTCACATGGCCGCGCAA-3'                 3'-AACGCCCGGGGTACACTCC-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'-CCTCACATGGCCGCGCAA-3'                             3'-AACGCCCGGGGTACACTCC-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>F de wetA con P de wetA</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-1.90 Kcal/mol</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                  3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 9 bp</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                             3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>F de wetA con R de wetA</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.00 Kcal/mol</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                 3'-TCTACGCCATGATGCGGT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                             3'-TCTACGCCATGATGCGGT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>R de wetA con P de wetA</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-1.90 Kcal/mol</p> <p>5'-TTGGCTGTAGTACCGCATCT-3'                 3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'-TTGGCTGTAGTACCGCATCT-3'                             3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p>
<p>Primer_Primer</p> <p>F de wetA con F de wetA</p> <p>Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 0.00 Kcal/mol</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                 3'-CGGTTTACCAGCAGTTGA-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p> <p>5'-AGTTGACGACCCATTGGC-3'                             3'-CGGTTTACCAGCAGTTGA-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>R de wetA con R de wetA</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy= 1.50 Kcal/mol</p> <p>5'-TTGGCTGTAGTACCGCATCT-3'                 3'-TCTACGCCATGATGCGGT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 10 bp</p> <p>5'-TTGGCTGTAGTACCGCATCT-3'                             3'-TCTACGCCATGATGCGGT-5'</p>	<p>Primer_Primer</p> <p>P de wetA con P de wetA</p> <p>Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-5.30 Kcal/mol</p> <p>5'-TCCACACACCGCCGCGCAC-3'                 3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p> <p>Max complementarity in discontinuous: 6 bp</p> <p>5'-TCCACACACCGCCGCGCAC-3'                             3'-CACCGCCGCGCACACAACCT-5'</p>

<pre> Primer_Primer F de BTub con R de BTub Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.50 Kcal/m 5'-GCTTCGACCTCCGTAAC-3'           3'-GTACTTCCTCCAACCTCCT-5'  Max complementarity in discontinuous: 5 bp 5'-GCTTCGACCTCCGTAAC-3'               3'-GTACTTCCTCCAACCTCCT-5' </pre>	<pre> Primer_Primer F de BTub con P de BTub Max complementarity in continuous is less than 3 bp  Max complementarity in discontinuous: 6 bp 5'-GCTTCGACCTCCGTAAC-3'                  3'-TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5' </pre>	<pre> Primer_Primer R de BTub con P de BTub Max complementarity in continuous: 3 bp, free energy= 1.50 Kcal/mo: 5'-TCCTCAACCTCCTTCATG-3'           3'-TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5'  Max complementarity in discontinuous: 6 bp 5'-TCCTCAACCTCCTTCATG-3'                  3'-TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5' </pre>
<pre> Primer_Primer F de BTub con F de BTub Max complementarity in continuous is less than 3 bp  Max complementarity in discontinuous: 10 bp 5'-GCTTCGACCTCCGTAAC-3'                          3'-CAATGCCCTCAGCTTCG-5' </pre>	<pre> Primer_Primer R de BTub con R de BTub Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-0.30 Kcal/mol 5'-TCCTCAACCTCCTTCATG-3'            3'-GTACTTCCTCCAACCTCCT-5'  Max complementarity in discontinuous: 8 bp 5'-TCCTCAACCTCCTTCATG-3'                     3'-GTACTTCCTCCAACCTCCT-5' </pre>	<pre> Primer_Primer P de BTub con P de BTub Max complementarity in continuous is less than 3 bp  Max complementarity in discontinuous: 8 bp 5'-ACCTGACCTGCTCGCAAT-3'                     3'-TTACCGTCTCGTCCAGTCCA-5' </pre>

## Anexo 4

### Diseño de sondas

Para el diseño de sondas para la multiplex RT-qPCR, se eligieron colorantes que tuvieran espectros de fluorescencia diferentes, esto para poder detectar en una única reacción de PCR los diferentes productos amplificados. Se decidió trabajar con el fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceina) para el caso de *brlA* que su excitación y emisión está en 495 y 520 nm respectivamente, para la sonda de *abaA* se utilizó el fluoróforo HEX (5-hexachloro-fluoresceina fosforamidita) que se detecta entre 535 y 556 nm, para *wetA* se utilizó Cy3 (Cianina-3) su espectro de excitación y emisión es 550 y 570 nm respectivamente. Como gen de referencia (gen constitutivo o housekeeping) se utilizó  $\beta$ *Tub* (Miranda-Hernández et al., 2014; Suarez-Vergel, 2017), cuya sonda tiene un colorante Cy5 (Cianina-5) emisión y excitación en 649 y 670 nm), el inhibidor de fluorescencia que se utilizó porque es compatible con estos fluoróforos es el IABkFQ (Iowa Black™ FQ) como se muestra en la Tabla A4.1.

**Tabla A4.1.** Sondas para RT-qPCR.

Gen	Sonda (5'-3')	Emisión (nm)
<i>*brlA</i>	/56-FAM/CCGCAGAAC/ZEN/TCACACGAGAAACGGT/3IABkFQ/	520
<i>*abaA</i>	/5HEX/CCTCACATG/ZEN/GGCCGCCGCAA/3IABkFQ/	556
<i>wetA</i>	/5Cy3/TCCAACACACGCGCCGCCAC /3IAbRQSp/	570
$\beta$ <i>Tub</i>	/5Cy5/ACCTGACCTGCTCTGCCATT/3IAbRQSp/	670

\*ZEN™ es un quencher interno, acorta la distancia entre el colorante y el apagador (quencher) del extremo 3', y en combinación con este, proporciona un mayor grado de inactivación y reduce el fondo inicial.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00250

Matrícula: 2153804214

Expresión diferencial de genes asociados a la conidiación en hongos entomopatógenos en cultivo sólido bajo estado oxidante

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 20 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ  
DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ  
DRA. MARIA GABRIELA MEDINA CANALES  
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

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

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: SAYURI ATZIN LOZANO VERDEL

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

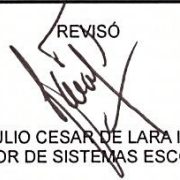
Aprobar

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



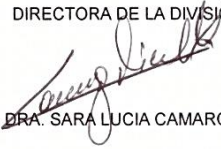
SAYURI ATZIN LOZANO VERDEL  
ALUMNA

REVISÓ




LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA




DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

VOCAL



DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ

VOCAL



DRA. MARIA GABRIELA MEDINA CANALES

SECRETARIO



DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

Ciudad de México a 20 de julio de 2018

### Acta de aprobación de tesis

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

**"Expresión diferencial de genes asociados a la conidiación en hongos entomopatógenos en cultivo sólido bajo estado oxidante"**

que presentó:

**I.B.I Sayuri Atzin Lozano Verdel**

#### Comité Tutorial:

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

**Asesor:** Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez-Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Asesor:** Dra. María Gabriela Medina Canales-Instituto Politécnico Nacional-ESCA Santo Tomás

#### Jurado:

**Presidente:** Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

**Secretario:** Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

**Vocal:** Dra. María Gabriela Medina Canales

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

