



**Casa abierta al tiempo**

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE DOS CEPAS DE *Isaria* EN DOS TIPOS DE  
ATMÓSFERA: RELACIÓN DE LA CALIDAD CON LA RESPUESTA  
ANTIOXIDANTE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

**IBI Gerardo Suárez Vergel**

DIRECTOR: Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESORES: Dr. PAUL MISAEL GARZA LÓPEZ

Dr. FRANCISCO FIGUEROA MARTÍNEZ

Agosto de 2017

---

“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 29 de agosto de 2017

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

**“Producción de conidios de dos cepas de *Isaria* en dos tipos de atmósfera: relación de la calidad con la respuesta antioxidante”**

que presentó:

**Gerardo Suárez Vergel**

**Comité Tutorial:**

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

**Asesor:** Dr. Paul Misael Garza López-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

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

**Jurado:**

**Presidente:** Dr. Armando Mejía Álvarez \_\_\_\_\_

**Secretario:** Dr. Misael Garza López \_\_\_\_\_

**Vocal:** Dr. Francisco Figueroa Martínez \_\_\_\_\_

**Vocal:** Dra. Nohemi García Ortiz \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana y al CONACyT por la beca otorgada (Número de Registro: 592571).

A Dios por la oportunidad de escribir estas palabras de lo grandioso que fue haber vivido esta inolvidable experiencia.

Al Dr. Octavio Loera por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo además de su disposición para dirigir esta tesis.

A mi madre, por sus consejos, sus enseñanzas, por tanto amor, por ser ejemplo de gran valor, determinación, humildad, nobleza y fortaleza.

A mi padre por sus consejos, su amistad y su amor.

A mis hermanos Aarón, Isabel y Marisol por brindarme cuatro razones más para seguir adelante, además de sus consejos tan acertados.

A Nohemí por todo el tiempo, confianza y paciencia en enseñarme, por sus consejos, su apoyo en mis decisiones, por estar en las malas rachas y por su inigualable amistad.

A Julio Montiel que sin su apoyo, confianza y paciencia no hubiera logrado entrar al posgrado.

A mis asesores el Dr. Francisco Figueroa, el Dr. Francisco Miranda y al Dr. Paul Misael por sus comentarios y recomendaciones durante todo este trabajo. Asimismo, a la Dra. Josefa Espitia, por sus consejos y valiosa amistad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Nohemí, Miguel, Jorge, José Luis, Sayuri, Daniel, Jazmín, Bris, Facundo, Vicky y Emmanuel, que han hecho de todo este tiempo una aventura

¡Gracias a todos por haber sido parte de mi vida!

## RESUMEN

Los procesos oxidantes a los que se enfrentan los hongos entomopatógenos limitan su uso como agentes de control biológico debido a que disminuyen su viabilidad, por lo que se han generado estrategias para mejorar su resistencia al daño oxidante. Entender estos mecanismos y como afectan a los hongos entomopatógenos ayudará a mejorar el sistema de producción que actualmente se usa.

Una de las estrategias que ha mejorado la calidad en cepas de *Isaria* ha sido cultivarlas bajo una atmósfera enriquecida que contiene 26% de O<sub>2</sub> (AE), por lo que la calidad de los conidios y la relación con la capacidad antioxidante en este trabajo se evaluó en dos cepas de *Isaria* cultivadas tanto en atmósfera normal (AN) como en una AE.

El efecto del tratamiento AE tuvo dos respuestas contrastantes en los conidios producidos sobre las cepas CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302 de *Isaria javanica* e *Isaria fumosorosea*, respectivamente. En primer lugar, la producción de conidios disminuyó en un 76% y 98% para la cepa CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302, respectivamente. En segundo lugar, la calidad de los conidios de la cepa ARSEF 3302 incrementó con el tratamiento AE, ya que la resistencia a dosis de radiación UV-B fue incluso 1.72 veces mayor, respecto a los cultivados bajo una AN. Este efecto no se encontró con la cepa CHE-CNRCB 303; sin embargo, esta fue capaz de mantener una sobrevivencia por encima del 50% en todas las dosis de radiación utilizadas.

El aumento en la tolerancia a la radiación UV-B en los conidios cultivados con el tratamiento AE se correlaciona, con el cambio en la expresión del gen *catA*, que aumentó 25 y 14 veces en conidios de las cepas CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302 respectivamente, obtenidos en atmósfera oxidante con respecto a los conidios obtenidos en AN. El incremento en la expresión de *catA* podría proporcionar a los conidios una mayor capacidad de sobrevivir a las condiciones bióticas o abióticas que propician la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y con ello una mayor probabilidad de éxito en la infección del hospedero. También observamos un incremento en la actividad enzimática de dos enzimas antioxidantes, la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa peroxidasa (CATPx), en los conidios de ambas cepas cultivadas bajo una AE respecto a los conidios obtenidos con AN, presentando un

---

incremento de 0.46 y 1.4 veces en la actividad de GPx y de 0.59 y 2.8 veces mayor en la actividad de CATPx de las cepas CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302 respectivamente.

Por otra parte, la actividad SOD en los conidios de CHE-CNRCB 303 cultivados bajo una AE aumentó 1.7 veces, mientras que el mismo tratamiento provocó una disminución de 38.2% en la actividad de SOD en la cepa ARSEF 3302 en ambos casos respecto a la actividad de SOD en conidios obtenidos con AN.

Los resultados de este trabajo nos acercan a entender el efecto de una AE sobre la capacidad antioxidante de los conidios de dos cepas de *Isaria*, así como su relación con el aumento de la calidad de los mismos.

## CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	Causas por las que una especie se convierte en plaga.....	1
1.2	Hongos entomopatógenos.....	1
1.3	Proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos.....	4
1.3.1	Adhesión al anfitrión.....	4
1.3.2	Germinación y el desarrollo de penetración .....	4
1.3.3	Degradación de la cutícula.....	4
1.3.4	Crecimiento de blastosporas.....	4
1.3.5	Colonización y muerte del huésped.....	5
1.4	Sistema inmunológico del insecto.....	6
1.5	<i>Isaria fumosorosea</i> .....	6
1.6	Factores que modifican la eficacia de los hongos entomopatógenos.....	8
1.7	Radiación UV.....	8
1.8	Protección cruzada.....	9
1.9	Sistema antioxidante de los hongos entomopatógenos.....	9
1.10	Especies Reactivas de Oxígeno y su relación con la infección en insectos.....	11
1.11	Catalasas.....	14
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>17</b>
5.1	Objetivos particulares	17
<b>6</b>	<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>18</b>
<b>7</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
7.1	Microorganismos.....	19
7.2	Reactivación de las cepas.....	19
7.2.1	Conservación de las cepas.....	20
7.2.2	Cultivo del inóculo inicial.....	20
7.2.3	Aplicación de la atmósfera normal y enriquecida .....	21
7.2.4	Obtención de muestras experimentales.....	21

7.3	Producción de conidios.....	21
7.4	Pruebas de calidad.....	22
7.4.1	Germinación.....	22
7.4.2	Crecimiento radial.....	22
7.4.3	Resistencia a radiación UV-B.....	22
7.5	Análisis de expresión diferencial del gen <i>CatA</i> .....	23
7.5.1	Purificación de RNA.....	23
7.5.2	Síntesis de ADN complementario (cDNA) .....	23
7.5.3	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	23
7.6	Cuantificación de actividad enzimática de enzimas antioxidantes.....	24
7.6.1	Extracción de proteína intracelular de conidios de <i>Isaria</i> .....	24
7.6.2	Cuantificación de actividad específica de CATPx, GPx y SOD. ....	25
7.6.3	Cuantificación de actividad específica de CATPx.....	25
7.6.4	Cuantificación de actividad específica de GPx.....	26
7.6.5	Cuantificación de actividad específica de SOD. ....	27
7.7	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	27
8	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	28
8.1	Producción de conidios.....	28
8.2	Germinación.....	30
8.3	Resistencia a radiación UVB.....	32
8.4	Velocidad radial.....	36
8.5	Análisis diferencial del gen <i>catA</i> .....	38
8.5.1	Extracción de ARN.....	38
8.5.2	Expresión relativa del gen <i>catA</i> .....	39
8.6	Actividad de otras enzimas antioxidantes .....	41
8.6.1	Actividad glutatión peroxidasa (GPx) .....	41
8.6.2	Actividad catalasa peroxidasa (CATPx) .....	42
8.6.3	Actividad superóxido dismutasa (SOD) .....	44
9	<b>CONCLUSIONES</b> .....	46
10	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	47
11	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	48

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 CAUSAS POR LAS QUE UNA ESPECIE SE CONVIERTE EN PLAGA

Las transformaciones en el ambiente tienen un impacto en las poblaciones que en él habitan, la explotación agrícola es un ejemplo de ello, donde los ecosistemas naturales son transformados, incluso destruidos, para generar agroecosistemas. Estos agroecosistemas presentan una fuente uniforme y garantizada de alimento que aumenta las poblaciones de cualquier especie capaz de alimentarse de esos cultivos; cuando el número de individuos de una misma especie crece tanto que causa un daño significativo a los cultivos, esta especie se convierte en una plaga (Clavijo., 1993). Los insectos pueden convertirse en plagas fácilmente, y desde hace cinco décadas se han utilizado insecticidas de síntesis química como primer opción para su manejo (Chandler et al., 2011); El uso intensivo de los insecticidas químicos y su toxicidad ha tenido repercusiones en la salud humana, en la contaminación ambiental en aire, suelo, agua y alimentos (CICOPLAFEST 1998; Bolognesi, 2003) y en la aparición cada vez más frecuente de insectos plaga resistentes a estos insecticidas. (Dawkar et al., 2013),

### 1.2 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Una alternativa para moderar el uso de insecticidas de síntesis química se basa en el control biológico, que consiste en la utilización de diferentes organismos (bacterias, virus, protozoarios, nematodos u hongos) que son introducidos en los agrosistemas con el objetivo de disminuir la población del organismo plaga a un nivel por debajo del umbral de daño económico (Clarkson y Charnley, 1996). De estos organismos destacan los hongos entomopatógenos (HE), micoinsecticidas que se utilizan como agentes de del control biológico ya que son microorganismos capaces de infectar y provocar enfermedades en insectos, matar al hospedero. Los micoinsecticidas son definidos como productos a base de propágulos fúngicos destinados a controlar las plagas (**Tabla1**), estos se elaboran utilizando diferentes propágulos como hifas (micelio), blastosporas o conidios (Faria y Wraight, 2007) siendo los conidios y blastosporas las principales unidades infectivas utilizadas en el control biológico con HE (Muñiz Paredes et al, 2017); sin ninguna ventaja entre ambas unidades infectivas (Behle et al, 2006; Wang et al, 2013). En el mundo hay más de 750 especies de HE, dentro los más usados se

encuentran: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Isaria* y *Lecanicillium* (García et al., 2015).

**Tabla 1.-** Especies de hongos y variedades desarrolladas en micoinsecticidas y su estado comercial, tomado y modificado de Faria y Wraight (2007)

	Especies/variedades <sup>a,b</sup>	Número de productos	Estado comercial <sup>c</sup>		
			Activo	Inactivo	ND
Hongos: Anamórficos Hypocreales	<i>Aschersonia aleyrodis</i> Webber	1 (0.6%)	0	1	0
	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.	58 (33,9%)	45	9	4
	<i>Beauveria brongniartii</i> (Sacc.) Petch	7 (4,1%)	5	0	2
	<i>Hirsutella thompsonii</i> FEFisher	3 (1,8%)	1	1	1
	<i>Isaria fumosorosea</i> Wize	10 (5,8%)	7	1	2
	<i>Isaria</i> sp.	1 (0.6%)	1	0	0
	<i>Lecanicillium longisporum</i> (Petch) R.Zare y W.Gams	2 (1,2%)	2	0	0
	<i>Lecanicillium muscarium</i> (Petch) R.Zare y W.Gams	3 (1,8%)	3	0	0
	<i>Lecanicillium</i> sp.	11 (6,4%)	10	0	1
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	58 (33,9%)	44	10	4
	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>Acridum</i> Driver y Milner	3 (1,8%)	3	0	0
	<i>Nomuraea rileyi</i> (Farl.) Samson	1 (0.6%)	0	0	1

Hongos: las especies identificadas como anamórficos	<i>Sporothrix insectorum</i> de Hoog y H.C. Evans <sup>d</sup>	3 (1,8%)	2	1	0
Hongos: Zygomycota: Zigomicetos: Entomophthorales	<i>Conidiobolus thromboides</i> Drechsler	2 (1,2%)	1	1	0
Chromista: Oomycota: oomycetes: Pythiales	<i>Lagenidium giganteum</i> Couch	1 (0.6%)	1 <sup>e</sup>	0	0
Mezcla de dos o más especies		7 (4,1%)	4	1	2
	<b>TOTAL</b>	<b>171 (100%)</b>	<b>129 (75,4%)</b>	<b>25 (14,6%)</b>	<b>17 (9.9%)</b>

- Clasificación fúngica basada en Kirk et al. (2001) .
- Nombres científicos según la base de datos Index Fungorum ( <http://www.indexfungorum.org/> ).
- La disponibilidad del producto se informa de la siguiente manera: Activo, producto actualmente registrado, en proceso de registro o disponible (comercialmente o bajo petición) en el período comprendido entre octubre de 2005 y mayo de 2006; Inactivo, producto que ya no está disponible en el mercado (o desarrollado pero nunca sometido a registro o comercializado); ND, no se pudo determinar el estado actual del producto.
- La identificación adicional de aislados comerciales requeridos como aislados no es verdadera *Sporothrix* .
- Registrado pero no comercializado actualmente.

### 1.3 PROCESO INFECTIVO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Para que el HE sea capaz de infectar y matar al insecto, el proceso debe comenzar con la adhesión de los conidios al anfitrión, para luego germinar y penetrar al interior del cuerpo del insecto huésped (Wang y Leger, 2007), seguido de la colonización y reproducción del hongo, además de la producción de toxinas que propician la muerte del insecto (Clarkson y Charnley, 1996). Finalmente, el micelio del hongo cubre la superficie del insecto y da paso a la formación de nuevos conidios, los que serán dispersados en el ambiente, para repetir el ciclo (**Imagen 1**). Este ciclo es descrito con mayor detalle y puede dividirse en los siguientes puntos:

#### 1.3.1 ADHESIÓN AL ANFITRIÓN

Los conidios tienen una cubierta hidrófoba que les permite adherirse a la cutícula del insecto a través de interacciones superficiales hidrófobas, proceso que puede ser favorecido por hidrofobinas (Holder y Keyhani, 2005).

#### 1.3.2 GERMINACIÓN Y EL DESARROLLO DE PENETRACIÓN

Una vez adheridos, los conidios pueden germinar cuando se cumplen las condiciones ambientales adecuadas que incluyen una temperatura y humedad favorable, así como la presencia de una fuente de carbono (Bidochka et al, 2000). Para hacer uso del insecto como fuente de nutrientes, los tubos germinales se pueden diferenciar en una clavija de penetración o en un apresorio que perfora la cutícula mediante presión mecánica con el objetivo de invadir al hospedero.

#### 1.3.3 DEGRADACIÓN DE LA CUTÍCULA

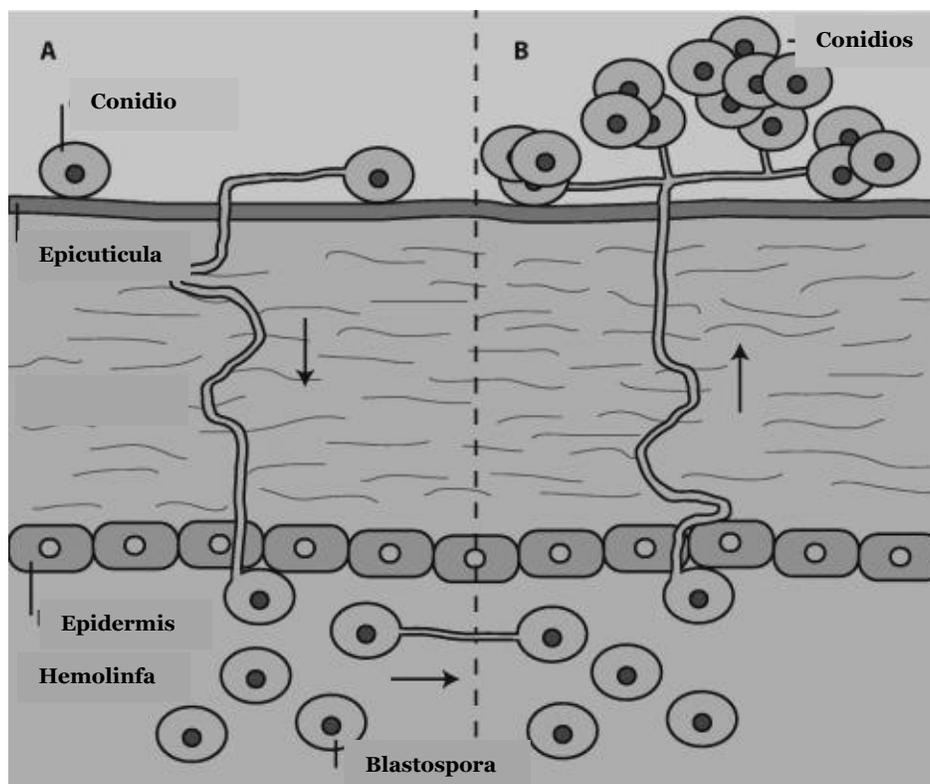
A su vez, la cutícula puede ser penetrada usando una combinación de presión mecánica y degradación enzimática. Los HE secretan diversas enzimas para degradar estos componentes de la cutícula, principalmente proteasas y quitinasas (Charnley y St. Leger, 1991). La cutícula es degradada para obtener nutrientes y para debilitar la barrera estructural, lo que permite la invasión del huésped.

### 1.3.4 CRECIMIENTO DE BLASTOSPORAS

La ruptura de la cutícula permite a las hifas en crecimiento invadir el hemocele del insecto, donde pueden cambiar a un modo de crecimiento similar a una levadura, llamado blastospora, que tienen una estructura con forma de cepillo (Wanchoo et al, 2009). Esta estructura se cree que ayuda a evitar la detección por el sistema inmune del huésped. Las blastosporas proliferan a través de gemación y utilizan la hemolinfa circulante como un vehículo para la colonización del huésped, así como una fuente de nutrientes (Lewis et al, 2009).

### 1.3.5 COLONIZACIÓN Y MUERTE DEL HUÉSPED

Durante la infección, el cuerpo del insecto es la fuente de toda la nutrición para el hongo, en especial el disacárido trehalosa, que es el carbohidrato más abundante en la hemolinfa del insecto (Xia et al, 2002), por lo que las blastosporas circulan libremente a través del hemocele, explotando la hemolinfa para su nutrición.



**Imagen 1.-** Proceso de infección de un HE sobre su hospedero. Tomado y modificado de Valero Jiménez et al (2016)

Además, el hongo puede secretar metabolitos tóxicos para acelerar la muerte del huésped, como por ejemplo beauvericina, producidos por *Isaria fumosorosea* (Asaff et al, 2005;.Jegorov et al., 1994)

#### 1.4 SISTEMA INMUNOLÓGICO DEL INSECTO

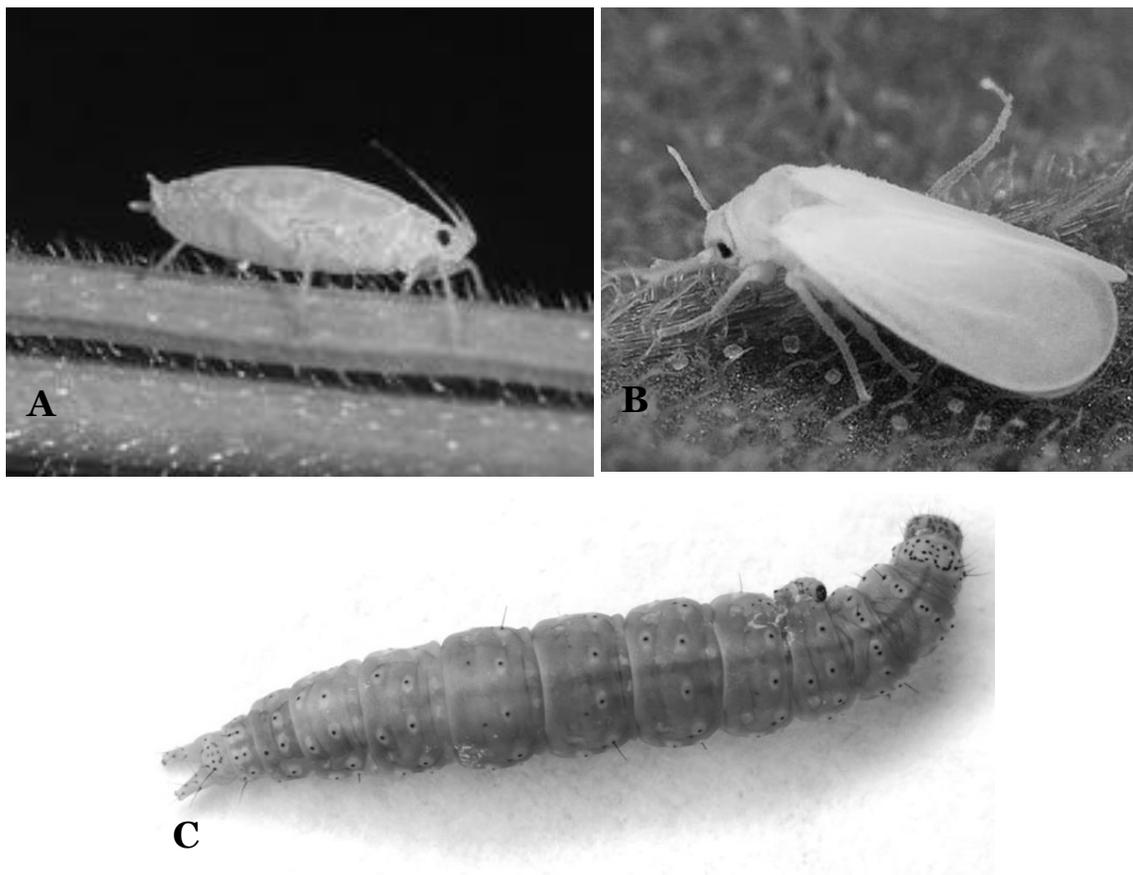
Una invasión exitosa requiere que los conidios de los HE sean capaces de evadir o superar las respuestas inmunitarias del insecto. Desde la adhesión de la cutícula en adelante, el hongo se enfrenta a las respuestas inmunes del insecto y que incluyen mecanismos de defensa tales como toxinas, inhibidores de proteasas u otros compuestos inhibidores de la infección que pueden estar presentes en la cutícula (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). El hongo debe eludir o superar la defensa del huésped, por ejemplo, mediante la secreción de compuestos que modulan la respuesta de insectos o por estructuras morfológicas como las blastosporas; sin embargo, los detalles moleculares y los cambios en la expresión genética del HE como respuesta a los mecanismos de defensa del huésped son escasos.

El sistema inmunológico de insectos se puede dividir en sistema inmune humoral y celular. La respuesta humoral incluye la liberación de una serie de péptidos antimicrobianos (PAM) en la hemolinfa (Tanji et al, 2007) la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y una cascada enzimática compleja que regulan la coagulación o la melanización (Jiravanichpaisal et al, 2006) .La activación de la respuesta de melanización conduce a la deposición de la melanina en la superficie del anfitrión o en la superficie de la herida causada por la penetración del hongo. Esto resulta en la liberación de ERO y la encapsulación de las células fúngica llevándolas a la muerte (Pham et al, 2007; Yassine et al, 2012). Cuando el anfitrión muere, y los nutrientes en el huésped se agotan, el hongo debe crecer fuera del insecto para producir y dispersar sus conidios por lo que la cutícula debe ser penetrada de nuevo desde el interior para permitir que el hongo escape del cuerpo del insecto y esporule sobre el cadáver.

#### 1.5 *Isaria fumosorosea*

Entre los HE más estudiados y utilizados se encuentran *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Faria y Wraight, 2007); sin embargo, durante los últimos años se ha incrementado el interés por el hongo *Isaria fumosorosea*, antes conocido como *Paecilomyces fumosoroseus* (Luangsa-ard et al., 2005), debido a que ha mostrado un gran potencial como agente microbiológico para el control de

insectos plaga de gran impacto, teniendo acción contra varias especies de insectos que son plagas a nivel mundial (**Imagen 2**), como el pulgón ruso del trigo (*Diuraphis noxia*), la polilla de la col (*Plutella xylostella*) y la mosca blanca del camote (*Bemisia argentifolii*) (Vandenberg y Cantone, 2004).



**Imagen 2.-** Principales especies de insectos hospederos de *Isaria* (A) Pulgón ruso del trigo (*Diuraphis noxia*), (B) la mosca blanca del camote (*Bemisia argentifolii*) y (C) larva de polilla de la col (*Plutella xylostella*).

Es importante señalar que el estudio del HE *Isaria* resulta pertinente debido a que es uno de los posibles candidatos para el control biológico de *P. xylostella*, insecto que se ha convertido en la plaga mundial más destructiva de los cultivos alimentarios económicamente importantes, incluyendo al brócoli, al rábano, la coliflor y la col entre otros (Talekar y Shelton, 1993), con una pérdida estimada anual de entre 4 y 5 mil millones de dólares por año (Furlong et al, 2013; Zalucki et al., 2012). La dificultad en el control de este insecto radica en que fue la primera especie que desarrolló resistencia para diclorodifeniltricloroetano (DDT) en la década de 1950 (Ankersmit, 1953) y para toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en la década de 1990 (Zalucki et al., 2012).

## 1.6 FACTORES QUE MODIFICAN LA EFICACIA DE LOS HE

La unidad infectiva de los HE son los conidios, por lo tanto, las formulaciones comerciales están basadas en estos, una vez que los conidios son asperjados en campo se enfrentan a diferentes condiciones bióticas y abióticas que pueden disminuir su viabilidad y con ello su eficacia para infectar al insecto hospedero. Dentro de las condiciones abióticas se encuentran temperaturas altas en campo, radiación UV y disponibilidad de agua. En el caso de los factores bióticos se encuentran las interacciones sociales entre los insectos como la repelencia y el acicalamiento (Rosengaus et al., 1998; Chouvenec et al., 2009) y el sistema inmune del insecto, al que se enfrenta una vez que el conidio ha penetrado la cutícula, incluyendo la fagocitosis, producción de péptidos antimicrobianos, coagulación, melanización y producción de especies reactivas del oxígeno (Schmid-Hempel, 2005).

Además, los HE se enfrentan a insectos capaces de adaptarse a hábitats nuevos e incluso son beneficiados por cambios ambientales, tal es el caso del calentamiento global que ha sido un estímulo para diferentes insectos, ya que, bajo condiciones climáticas cálidas, los insectos exhiben un metabolismo acelerado, que conduce a un mayor consumo de alimentos, crecimiento y desarrollo. Además de esto, la reducción del tiempo de reproducción da lugar a brotes de población (Jamieson et al., 2012; Mishra et al., 2015).

A partir de esto, crece la necesidad de producir HE con mayor calidad, es decir que tengan un menor tiempo de germinación, sean termotolerantes, osmotolerantes, que posean una mayor virulencia y resistencia a radiación UV.

## 1.7 RADIACIÓN UV

Uno de los factores abióticos que tienen que enfrentar los conidios de los HE una vez asperjados en campo es la radiación UV, que daña a los componentes celulares, provocando daños letales y mutaciones al ácido desoxirribonucleico (ADN) (Nicholson et al., 2000). En general la radiación se divide en tres tipos, el tipo C (100-280 nm), tipo B (280-315 nm) y tipo A (315-400). La radiación UV-C no alcanza la superficie terrestre debido a la capa de ozono; sin embargo, la radiación UV-A y UV-B sí lo hacen (Kintziou et al., 2002) además se ha comprobado una mayor sensibilidad de hongos y bacterias a la radiación UV-B comparado a plantas superiores. La peligrosidad de la radiación UV-B radica

en que induce la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano en el ADN que causan mutaciones o la interrupción de la transcripción (Griffiths et al., 1998), por lo que la dosis de radiación UVB se encuentra relacionado con reducción de la supervivencia de los conidios de HE en campo (Jacques Fargues et al., 1997).

En una investigación sobre la susceptibilidad de la radiación UV-B sobre *Metarhizium anisopliae*, *Isaria*, *Lecanicillium aphanocladii*, y *Beauveria bassiana*, se observaron diferencias en la susceptibilidad de los hongos a la radiación UV-B, por lo que la selección de HE con alta tolerancia a la radiación UVB puede ser importante en el desarrollo de agentes de control microbiano eficaces (Rodrigues et al, 2016). En general, con pocas horas de exposición directa, la luz del sol del mediodía en verano, en lugares templados y tropicales, es suficiente para inactivar completamente los conidios de casi todos los hongos entomopatógenos estudiados hasta la fecha (Fernandes et al., 2007), además, la germinación de los conidios sobrevivientes a la radiación UV se retrasa, lo que reduce la eficiencia de estos microorganismos como agentes de control biológico (Braga et al., 2001), por lo que es necesario producir conidios de HE con tolerancia alta a radiación UV o con alto porcentaje de germinación, es decir, conidios de alta calidad para asegurar un control biológico óptimo de la plaga de insecto a tratar.

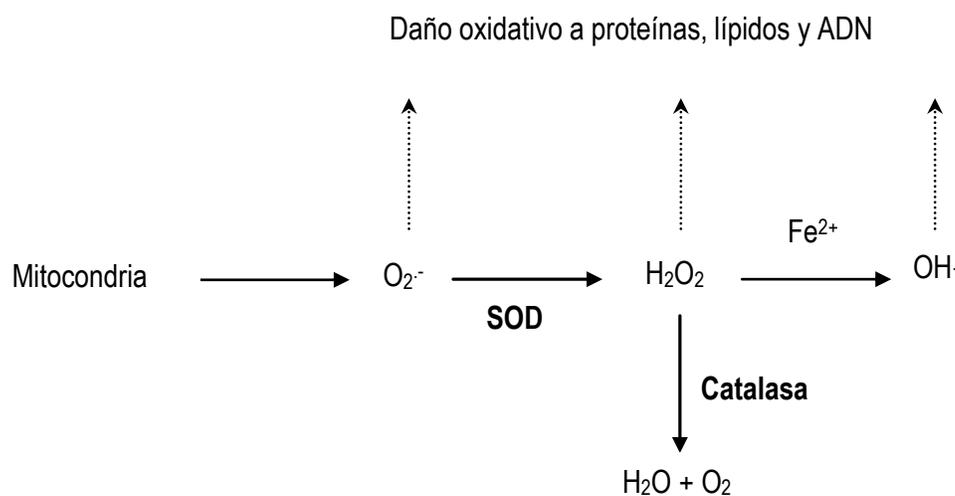
## 1.8 PROTECCIÓN CRUZADA

La exposición del micelio fúngico a un tipo de estrés subletal, puede mejorar la tolerancia de sus conidios a otros tipos de estrés, proceso denominado protección cruzada, este fenómeno ha sido utilizado para producir HE con mayor calidad (Miranda Hernández, et al., 2014; Muñiz Paredes, 2016; García Ortiz, 2016), debido a que el estrés subletal puede propiciar en las células la expresión de genes que codifiquen proteínas que pueden servir para proteger a la célula de dicho estrés o pueden participar en la reparación del daño celular (Rangel, 2011).

## 1.9 SISTEMA ANTIOXIDANTE DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos al ser microorganismos eucarióticos aerobios, producen especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden causar daño celular mediante la oxidación de componentes celulares, tales como ADN, proteínas y lípidos (Moradas-Ferreira et al, 1996), por lo tanto el hongo posee mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para poder lidiar con las ERO. En el caso del anión

superóxido ( $O_2^-$ ) se puede producir por la fuga de electrones en la cadena respiratoria, también se puede producir en la pared vascular por la NADPH oxidasa y por la xantina oxidasa (Yang y Förstermann, 2004). Este anión superóxido ( $O_2^-$ ) puede transformarse a peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), por la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). A su vez, el  $H_2O_2$  puede reaccionar con  $Fe^{+2}$  o  $Cu^{+2}$  por la reacción de Fenton y producir el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), una ERO aún más peligrosa debido a que puede reaccionar con cualquier compuesto orgánico, como el ADN y propiciar la muerte celular (Mahaseth y Kuzminov, 2016; Buxton et al, 1988) por lo que el hongo posee diferentes mecanismos enzimáticos que transforman el  $H_2O_2$  a productos no tóxicos como el agua y  $O_2$  (**Imagen 3**), estas enzimas pueden ser glutatión peroxidasa (GSH-Px), catalasa (CAT), catalasa peroxidasa (CAT-Px) o tiorredoxina peroxidasa (TRX-Px) (Birben et al, 2012).



**Figura 1.-** Enzimas implicadas en la generación y la inactivación de las especies reactivas de oxígeno (ERO).  
(modificado de Ceron Garcia et al (2012))

Las enzimas antioxidantes han sido relacionadas con el aumento de calidad para varios hongos filamentosos, por ejemplo, Morales Hernández et al (2007), sobreexpresó el gen *cat1* en *M. anisopliae*, encontrando incrementos en la tasa de germinación e infectividad hacia larvas de *P. xylostella*. Ali et al., (2012) encontraron que, al inducir un aumento en la actividad catalasa total en *B. bassiana*, se reducía el tiempo de germinación de los conidios y se incrementaba su infectividad hacia *P. xylostella*.

Xie et al (2010) reportó un aumento en la infectividad y en la resistencia a radiación UV-B al incrementar la expresión del gen *BbSod2* que codifica para un tipo de SOD en *B. bassiana*, estos mismos autores en 2012 encontraron que al interrumpir los genes *BbSod2* y *BbSod3* disminuyó la resistencia a UV-B y disminuyó la producción de conidios en *B. bassiana* (Xie, et al., 2012).

Es importante señalar que la concentración de moléculas oxidantes deben de mantenerse en una proporción adecuada con las moléculas antioxidantes para conservar un equilibrio constante en la célula (Boveris et al, 2008; Sies, 1997), de lo contrario en la célula puede ocurrir el fenómeno conocido como estrés oxidante, definido como un desequilibrio que favorece el estado oxidante debido al aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes y se ve reflejado en la oxidación de ADN, proteínas y lípidos. (Boveris et al, 2008).

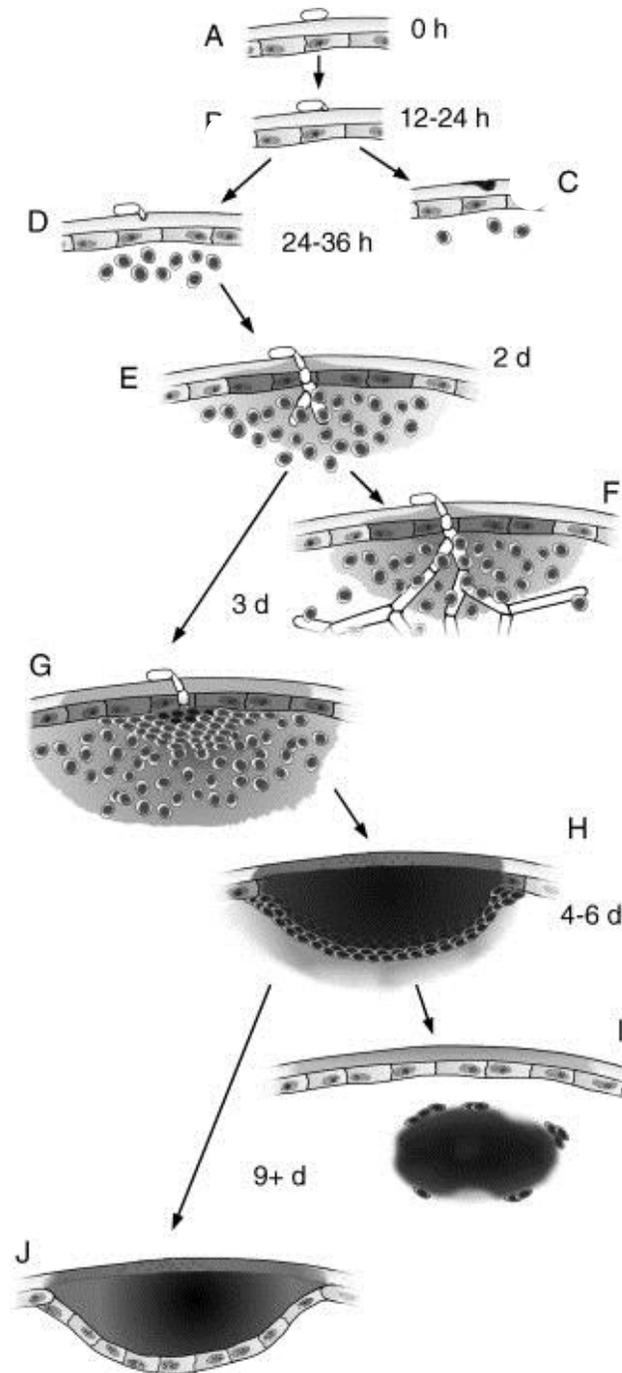
#### **1.10 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN EN INSECTO**

Como ya se ha mencionado, la infección fúngica depende de numerosos eventos biológicos que se inician por la adhesión de esporas de hongos a la cutícula del insecto, la germinación del conidio, crecimiento de las hifas, etc. y en cada una de estas etapas el hongo enfrenta desafíos ambientales, nutricionales así como al sistema inmune del hospedero (Roberts y Leger, 2004).

Debido a la propia estructura del insecto su sistema inmune es muy eficaz, ya que cuentan con un sistema circulatorio abierto donde la hemolinfa es encerrada en una cavidad corporal conocida como hemocele donde los órganos y tejidos son bañados con la hemolinfa. Esta disposición estructural permite a los hemocitos (células del sistema inmune del insecto) diseminarse rápidamente favoreciendo una eficiente localización y neutralización del invasor. De estos mecanismos destaca la nodulación y la encapsulación que son las respuestas inmunitarias innatas más eficaces frente a un gran número de patógenos o parásitos de los insectos, que en general lleva al secuestro del invasor por la producción de biopolímeros, melanina, esclerotina y proteínas. La encapsulación se refiere a la unión de hemocitos a invasores mayores como protozoos, nematodos y parasitoides (huevos y larvas), que no pueden ser fagocitadas. Mientras que la unión de múltiples hemocitos a agregaciones de bacterias, hongos y protozoos suele ser denominada también como nodulación (Im et al, 2016).

La nodulación (**Imagen 3**), inicia en los primeros minutos después de la penetración del conidio (Ratcliffe y Gagen, 1977; Lavine y Strand, 2002) momento en el que los hemocitos se unen a la superficie de la hifa de penetración para desempeñar el papel clave en el proceso de nodulación. (Lavine y Strand, 2002). Simultáneamente, se activan fenolóxidos que activan la melanogénesis, lo que da lugar a la formación de melanina. Durante la melanización de los nódulos y cápsulas, algunas especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), incluyendo la semiquinona (Slepneva et al, 2003), el  $H_2O_2$  (Nappi y Vass, 1998; Komarov et al., 2006; Dubovskii et al., 2010) anión superóxido (Nappi et al, 1995; Whitten y Ratcliffe, 1999; Whitten y Ratcliffe, 1999) y el óxido nítrico (Nappi et al, 2000). Estas moléculas reactivas pueden mejorar la melanización y participar en la destrucción del intruso. Una vez que se ha formado una cápsula, el parásito encapsulado comúnmente muere (Walters y Ratcliffe, 1983).

Por otro lado, la germinación fúngica está marcada por un aumento significativo en el consumo de oxígeno que comienza unas pocas horas antes de que el tubo de germinativo emerja y se puede encontrar el nivel más alto durante el crecimiento exponencial (Braga et al, 1999) por lo tanto, es posible que la cantidad de peróxido de hidrógeno aumente durante la germinación y el crecimiento, debido a que esta ERO formada durante el metabolismo aeróbico es capaz de producir otras ERO que pueden dañar muchos componentes celulares la reacción de Fenton celulares (Fiechter et al, 1981; Kawasaki y Aguirre, 2001).



**Imagen 3.-** Proceso de nodulación del hongo *Metarhizium anisopliae* al infectar *Reticulitermes flavipes*. A) Acoplamiento del conidio a la cutícula del insecto. (B) Germinación del conidio. (C) Melanización en la cutícula del insecto y eliminación del HE. (D) Penetración fúngica de la cutícula y agregación de los hemocitos. (E) Penetración fúngica a través de la epidermis en el hemocele y reclutamiento de hemocitos y melanización humoral. (F) Encapsulación fallida e invasión del hemocele por las hifas del HE. (G, H) Encapsulación exitosa e intensificación de la melanización. (I) Desprendimiento del nódulo melanizado en el hemocele. (J) Formación de una capa semejante a la epidermis alrededor del nódulo melanizado. Tomado y modificado de Chouvinc et al. (2009). d:días, h:horas.

## 1.11 CATALASAS

Las catalasas son uno de los sistemas enzimáticos más importantes utilizados para degradar el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, reduciendo así los niveles intracelulares de  $H_2O_2$  (Wang et al, 2006). De hecho, los hongos entomopatógenos muestran un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes durante la germinación y el crecimiento, esto puede ser necesario para contrarrestar el estado hiperoxidante producido por el metabolismo oxidativo (Miller et al., 2004). En *Beauveria bassiana* se han descrito cinco tipos de catalasas, y se encuentra compuesta de *catA* (específico de esporas), *CatB* (proteína de secreción), *CatP* (peroxisomal), *CatC* (citoplásmica) y *CatD* (catalasa/peroxidasa). De ellos, *catP*, *catA* y *catD* son factores de virulencia mientras *catA*, *catD* y *catB* son cruciales en la resistencia de los conidios a la radiación UV-B. Se cree que la catalasa exclusiva de conidios *catA* es una de las enzimas antioxidantes más importantes relacionadas con la calidad de los conidios, pues se ha propuesto que su función es proteger a las esporas del  $H_2O_2$  producido durante la germinación o por la respuesta inmune del hospedero. (Navarro et al, 1996), además de que actúa como regulador en la termotolerancia de los conidios en *B. bassiana* (Wang et al, 2013).

Los procesos oxidantes a los que se enfrentan los hongos entomopatógenos, incluyendo su metabolismo aerobio, el proceso de germinación y la respuesta inmune de los, limitan su uso como insecticidas biológicos debido a que disminuyen su eficacia (Roberts y. Leger, 2004) por lo tanto, entender estos procesos, cómo afectan a los hongos entomopatógenos y los mecanismos de defensa antioxidante que poseen los HE nos ayudaría a mejorar el sistema de producción que actualmente se usa para incrementar la calidad de los conidios y su probabilidad de éxito en el control de plagas.

## 2 ANTECEDENTES

Entre los hongos entomopatógenos (HE) con mayor aplicación comercial se encuentran *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* (Faria y Wraight, 2007). Dos de los factores a tener en cuenta en la selección de un HE son la virulencia y la capacidad de sobrevivir en la zona donde es aplicado, además de características de crecimiento, esporulación y estabilidad genética (Tarocco et al, 2005). Con el fin de obtener mayor calidad y producción de los conidios, que son las unidades infectivas de los HE, se ha estudiado la influencia de exponer el cultivo de HE a atmósferas ricas en oxígeno. Miranda Hernández et al. (2014) reportaron que la cepa ARSEF 3302 bajo una AE aumentó casi cinco veces la cantidad de conidios, mientras que para la cepa CHE-CNRCB 303 disminuyó en un 50% bajo las mismas condiciones, no obstante, encontró una mayor tasa de germinación, resistencia a estrés térmico y osmótico, además de una mejora en la infectividad contra larvas de *Galleria mellonella* (Miranda Hernández et al, 2014). El aumento en la calidad fueron relacionados con el incremento de las actividades de catalasa para ambas cepas.

Uno de los temas de mayor interés que se ha estudiado recientemente, es la participación de enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD), en importantes procesos celulares de los conidios de hongos entomopatógenos, como son la germinación, infectividad, resistencia a altas temperaturas, resistencia a radiación UV-A y UV-B. Miranda Hernández (2014) también reportó una alta concentración de ERO entre las que se encuentra el  $H_2O_2$ , sustrato utilizado por la GPx y CAT, en conidios expuestos a una atmosfera enriquecida con oxígeno al 26% (AE) comparados con los conidios obtenidos a atmosfera con 21% (AN) de oxígeno. Este  $H_2O_2$  es toxico para los hongos pero también es un mensajero secundario para la señalización celular (Hansberg et al, 2012)

Recientemente, Wang et al (2013) reportaron una disminución en la infectividad de *B bassiana* al inhibir la expresión de los genes *catA*, *catP* o *catD*; además, encontraron que estas enzimas estaban ligadas a la calidad de estas esporas. Siendo *catA* de gran importancia al ser específica de conidios (Navarro et al, 1996)

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los principales factores que influyen en la efectividad de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico incluyen la temperatura, el estrés osmótico, la radiación solar y una limitada cantidad de agua (Liu, 2012; Montiel González 2004). Además, en la última etapa del proceso infeccioso, los hongos se deben adaptar a las altas presiones osmóticas en la hemofilia del insecto y a su sistema inmune (Wang et al, 2008).

Miranda-Hernández et al. (2014) comprobó que una atmósfera enriquecida con 26% de oxígeno aumentó parámetros de calidad, como la tasa de germinación, la tolerancia al estrés osmótico, la termotolerancia, infectividad, asimismo se encontró un aumento en la actividad catalasa en conidios obtenidos de las dos cepas de *I. fumosorosea*.

Dilucidar la expresión de gen *catA* con la variación de actividad enzimática antioxidante permitirá relacionar el aumento de la calidad de los conidios en cepas de *Isaria*, esto ayudara a entender el fenómeno que ocurre en los conidios de *Isaria* al ser cultivados bajo una atmósfera oxidante (26%) además, hasta donde sabemos no existen reportes, dónde se muestre el efecto de una atmósfera enriquecida (26%) sobre la tolerancia de los conidios de cepas de *Isaria* a la radiación UV-B, sobre la producción de conidios y su relación con la capacidad antioxidante del hongo, por lo que analizar su posible aumento permitirá establecer un proceso de producción de conidios de alta calidad que garanticen su efectividad sobre plagas de insectos en agrosistemas.

## 4 HIPÓTESIS

Los conidios de cepas de *Isaria* producidos en una atmósfera rica en oxígeno (26%) mejorarán su calidad mediante el aumento de la expresión y la actividad de enzimas antioxidantes, esto con respecto a conidios producidos bajo una atmósfera normal (21%).

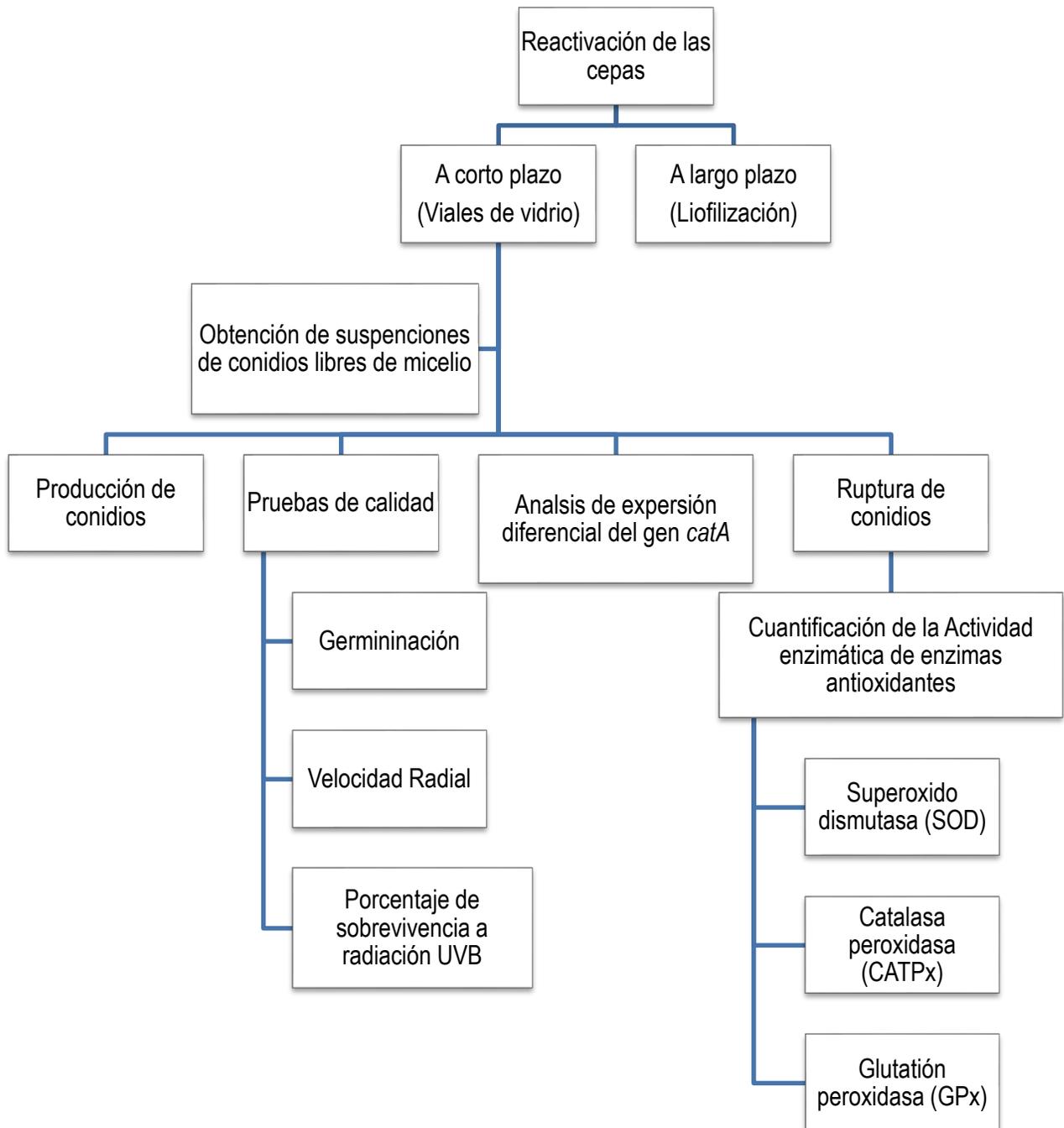
## 5 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre la calidad de conidios con la expresión del gen *catA* y la actividad de enzimas antioxidantes, en conidios de *Isaria* producidos en una atmósfera enriquecida y una atmósfera normal

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Conservación de dos cepas de *Isaria* a corto y largo plazo.
- II. Comparar la producción de conidios de dos cepas de *Isaria* obtenidos con una AN y una AE.
- III. Determinar la sobrevivencia a diferentes dosis de radiación UV-B en los conidios de dos cepas de *Isaria* obtenidos en las dos condiciones de cultivo.
- IV. Determinar la expresión diferencial del gen *catA* en los conidios de las cepas de *Isaria* obtenidos con una AN comparada con los obtenidos en una AE.
- V. Comparar las actividades de las enzimas antioxidantes Glutatión Peroxidasa (GPx), Catalasa Peroxidasa (CATPx) y Dismutasa (SOD) de los conidios de ambas cepas provenientes de las dos condiciones de cultivo

## 6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 MICROORGANISMOS

Se utilizó la cepa CHE-CNRCB 303 de *Isaria javanica*, perteneciente al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNCRB, Colima, México) (Gallou et al., 2016) e *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302, obtenida de la colección de cultivos de hongos entomopatógenos del Departamento de Investigación Agrícola (ARSEF, por sus siglas en inglés) perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA, por sus siglas en inglés), con número de catálogo 3302. Como aclaración, la cepa *I. javanica* CHE-CNRCB 303 se reasignó a esta clasificación después del análisis filogenético a la cepa CNRCB1, por lo que, para esta última cepa se modificó su nomenclatura a *I. javanica* CHE-CNRCB 303 (Gallou et al., 2016).

Las cepas fueron propagadas por estría en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de agar dextrosa Sabouraud (ADS) (agar 15 g/L, peptona de caseína 5 g/L, peptona de carne 5 g/L, dextrosa 40 g/L) previamente esterilizados en autoclave a 15 PSI durante 15 min. Posteriormente se incubaron a  $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 10 días con fotoperiodo 12:12 h luz/obscuridad (modificado de Miranda, 2010)

### 7.2 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Los hongos entomopatógenos al ser cultivados sucesivamente en medios artificiales pueden reducir la virulencia y la producción de conidios (Eivazian Kary y Alizadeh, 2017; Butt et al, 2006), por lo que es deseable mantener homogéneo el genoma de los HE tanto para su producción a gran escala como para los estudios a los que sean sometidos y para ello las cepas se reactivaron mediante “paso por insecto” seguido del aislamiento de colonias individuales para obtener cultivos monoclonia.

Una vez que los cultivos cumplieron diez días de incubación, los conidios se cosecharon y se estandarizó una suspensión de  $2 \times 10^7$  con/mL, con ella se infectaron larvas del insecto *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), sumergiéndolas durante 5 segundos en esta suspensión y se colocaron en cajas Petri de 90 mm. (Miranda, 2014). Las cajas se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con fotoperiodo 12:12 h durante tres días para propiciar la germinación de los conidios (Montesinos-Matías, 2008).

Ocurrida la muerte del insecto, este se apartó de la caja donde se encontraba, y se colocó dentro de una nueva caja estéril, la cual se puso en otro contenedor con papel filtro húmedo con el objetivo de favorecer el crecimiento del hongo (Tefera y Pringle, 2003) y confirmar que la muerte fue provocada por la infección de los conidios de las cepas de *Isaria fumosorosea* e *I. javanica*

De la superficie de los insectos micosados se tomaron conidios, los cuales fueron propagados por estría en cajas Petri que contenían 15 mL de medio ADS, estas se incubaron durante 3 días y se aislaron colonias del área de medio donde estas se encontraron, posteriormente fueron colocadas individualmente en nuevas cajas Petri con medio ADS e incubadas por diez días, con el objetivo de obtener un cultivo monoclonia.

### 7.2.1 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

A partir de los cultivos monoclonia se tomaron trozos del medio ADS esporulado y se colocaron en viales de vidrio de 10 mL que contenían 4 mL de agua desionizada, previamente esterilizados. Estos viales se sellaron con papel Parafilm y se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Se tomó uno de estos conservados de cada cepa y se propagaron en matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio ADS, posteriormente fueron incubados a  $28 \pm 1$  °C por 10 días con fotoperiodo 12:12 h. Cumplido ese tiempo, los conidios se cosecharon con solución Tween 80 (0.05%) y se estandarizó una suspensión a  $1 \times 10^8$  conidios/mL (con/mL) utilizando como fase dispersora y como agente crio-protector una solución de leche descremada (Svelty) al 10%. (Garcia, 2012; Hernández Rosas, 2006).

En un ambiente estéril se agregó 1 mL de la suspensión a ampollitas de vidrio, esta suspensión se congeló utilizando nitrógeno líquido. Las ampollitas tapadas con algodón se colocaron en una liofilizadora (TOPT-10B TOPTION) a -46°C, a 1 Pa por 12 h, al concluir, los viales fueron retirados y sellados con mechero, estos se mantuvieron a temperatura ambiente protegidos de la luz (Garcia, 2012; Toegel et al, 2010).

### 7.2.2 CULTIVO DEL INÓCULO INICIAL

Los conidios conservados en agua desionizada se propagaron en matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio ADS, posteriormente se incubaron a 28° C con fotoperiodo 12:12 h por 10 días. Los conidios obtenidos de este cultivo se utilizaron para iniciar todos los experimentos.

### 7.2.3 APLICACIÓN DE LA ATMÓSFERA NORMAL Y ENRIQUECIDA

Las atmósferas normal y enriquecida fueron aplicadas en las cepas de *I. fumosorosea* e *I. javanica* de acuerdo con la metodología descrita por Miranda-Hernández et al, (2014) y Tlecuil-Beristain, et al, (2010). A partir del inóculo inicial se estandarizó una suspensión a  $1 \times 10^8$  con/mL y a continuación se inocularon frascos serológicos que contenían 10 mL de medio ADS con  $1 \times 10^7$  conidios, los cuales fueron incubados a  $28 \pm 1$  °C con fotoperiodo 12:12 h. Las botellas serológicas que se cultivaron bajo una atmosfera al 21% de O<sub>2</sub> (AN) conservaron el tapón de algodón. A las 60 h de incubación, se tomó una fracción de las botellas serológicas, se les aplicó una atmosfera enriquecida al 26% de O<sub>2</sub> (AE), y se les cambió el tapón de algodón por un tapón hermético de hule, posteriormente se les inyectó una mezcla gaseosa, proveniente de un tanque (PRAXAIR), a un flujo de 20 cm<sup>3</sup>/s, por 1 min, además, se usó una aguja de salida (purga). A partir del inicio de la modificación atmosférica, estos recambios se efectuaron cada 24 h hasta las 156 de incubación.

### 7.2.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS EXPERIMENTALES

Los conidios se cosecharon a las 156 h de incubación, para ello se adicionaron 20 mL de solución Tween 80 al 0.05% a las botellas serológicas con sus respectivos triplicados por tratamiento, y se agitaron durante 10 minutos con un agitador magnético. Transcurrido ese tiempo se depositó la solución final en tubos Falcón de 50 mL, y a partir de estas suspensiones se realizaron todos los experimentos, con excepción de la cuantificación de la producción de conidios.

## 7.3 PRODUCCIÓN DE CONIDIOS

La cuantificación de los conidios se realizó a partir de los cultivos en las botellas serológicas. Para cada tratamiento, se tomaron triplicados, a los cuales se les adicionaron 20 ml de Tween 80 al 0.05% a cada una de las botellas y se agitó con agitador magnético por 10 min. El conteo de los conidios se realizó en cámara de Neubauer con un microscopio óptico (BOECO). La producción se reportó como conidios por centímetro cuadrado (con/cm<sup>2</sup>).

## 7.4 PRUEBAS DE CALIDAD

### 7.4.1 GERMINACIÓN

Una vez obtenidas las muestras experimentales se estandarizaron suspensiones a una concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL. Se tomaron 30  $\mu$ L de éstas suspensiones y se inocularon en cajas Petri que contenían medio Agar-Agua (García, 2012; Samuels et al, 1989). El inóculo se distribuyó uniformemente con ayuda de una varilla de vidrio. Las cajas se sellaron con Parafilm y se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 h (Miranda, 2014), posteriormente se observó al microscopio (40 X) y se registró la germinación de al menos 100 conidios. Se consideró a un conidio germinado cuando su tubo germinal fue igual o mayor a la anchura del conidio sin germinar (Safavi et al., 2007).

### 7.4.2 CRECIMIENTO RADIAL

Tras obtener las muestras se prepararon suspensiones de  $1 \times 10^8$  con/mL, a partir de éstas se inocularon por punción el centro de cajas Petri que contenían medio ADS. Posteriormente, fueron incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  con fotoperiodo 12:12 h luz/oscuridad, y a partir de las 48 h que fueron visibles las colonias se tomaron fotografías de las colonias. Esto se realizó en campana de flujo laminar y a 10 cm de distancia sobre la superficie de las cajas Petri. Las fotografías se tomaron cada 24 h por 7 días. Para obtener la velocidad de crecimiento se utilizó el programa ImageJ, y se reportó como milímetros por día (mm/día).

### 7.4.3 RESISTENCIA A RADIACIÓN UV-B

Después de conseguir las muestras experimentales se obtuvieron suspensiones a una concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL, con la que se inocularon 300 conidios en cajas Petri con medio ADS, y se expusieron a diferentes dosis de radiación UV-B (0, 3.5, 7.0, 10 y 14)  $\text{kJ/m}^2$  (modificado de Rangel et al., 2005) con una lámpara UV-B (Narrowband PL-L/PL-S) con una emisión máxima de 311 nm, la intensidad luminosa se midió con un luxómetro de UV (Twilight LT-YK35UV). Después de la exposición, las placas se incubaron durante 48 h en fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , posteriormente se cuantificó la sobrevivencia (%) con base en las unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas en cada unidad experimental.

## 7.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *catA*

### 7.5.1 PURIFICACIÓN DE ARN

Una vez que se obtuvieron las muestras experimentales, estas suspensiones se filtraron al vacío con tela de propileno, después se concentraron los conidios por centrifugación a 8000 rpm por 10 min a 4 °C. A partir de esta biomasa se realizó la ruptura celular con 3 maceraciones con nitrógeno líquido. La purificación del ácido ribonucleico (ARN) se realizó con base en las instrucciones del fabricante (RNeasy Plant mini kit cat. # 74904, QIAGEN).

Para corroborar la integridad de ARN se realizó electroforesis en un gel de agarosa 1% utilizando 1 µL de Midori Green Direct como fluoroforo y 1 µL de azul de bromofenol por cada 3 µL de ARN, al cargar en el gel de agarosa. Una vez corroborada la integridad del ARN, este se almacenó a -70 °C.

### 7.5.2 SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (cDNA)

El ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA, por sus siglas en inglés) se sintetizó utilizando un kit comercial (QuantiTect™ Reverse Transcription Kit cat. # 205311, Qiagen) el cual se basa en utilizar, como primer paso, una DNasa para eliminar el ADN contaminante en la muestra, seguido de una segunda incubación junto a primers oligo-dT, cebadores al azar y una transcriptasa reversa para la síntesis del cDNA. Se utilizó 0.8 mg/mL del ARN mensajero (ARNm) aislado previamente como molde y se siguió el protocolo especificado por el fabricante. Una vez sintetizado el cDNA, se cuantificó su concentración y pureza en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) y se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración final de 20 ng/mL. Posteriormente el cDNA fue almacenado a -20°C.

### 7.5.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Una vez sintetizado el cDNA se cuantificó la expresión diferencial del gen *catA* mediante la técnica qPCR, y se utilizó como gen de referencia o “*housekeeping*” el gen que codifica para la proteína  $\beta$  tubulina ( $\beta$  *tub*). Para desarrollar la técnica qPCR se empleó el kit comercial (Rotor-Gene Probe PCR Kit, Qiagen). Por otro lado, los cebadores (primers) y sondas específicos para los genes *catA* y  $\beta$  *tub* fueron diseñados por Miranda (2014) cuya secuencia se muestra en el **ANEXO II**. Los volúmenes de los componentes de la reacción se enlistan en la Tabla 1. Por otra parte, se agregaron controles

negativos que contenían todos los componentes excepto cDNA y así como los controles positivos que contenían ADN aislado de las cepas de *I. javanica* e *I. fumosorosea* para comprobar la presencia de productos de amplificación.

**Tabla 1.-** Composición de cada reacción de PCR en tiempo real en el análisis del gen *catA*.

Componentes	Volumen/reacción (μL)	Concentración final
Buffer 2x Rotor-Gene	12.5	1x
Mezcla de primers/sonda	0.4	0.4 μM
cDNA	5	100 ng/reacción
Agua	7.1	
Volumen total	25	

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso de activación a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 3 s a 95°C y 10 s a 58°C con detección de fluorescencia en el canal verde al final de cada ciclo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett™). Los datos obtenidos de ciclo umbral o “cycle threshold” (CT) fueron normalizados por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## 7.6 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### 7.6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA INTRACELULAR DE CONIDIOS DE *Isaria*

Con el fin de cuantificar las posibles diferencias en las actividades enzimáticas se obtuvieron las muestras iniciales de ambas cepas como se describió previamente, a las 156 h para catalasa peroxidasa (CATPx), glutatión peroxidasa (GPx) y a las 180 h para superóxido dismutasa (SOD), con la diferencia que cada unidad experimental (UE) fue equivalente a los conidios concentrados de 9 botellas serológicas y sus respectivos triplicados por tratamiento. La suspensión de conidios se filtró la suspensión al vacío con tela de propileno y se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con agua desionizada, seguido de un lavado con 20 mL de solución amortiguadora de fosfato salino (0.9 % p/v NaCl en 0.1 M de solución amortiguadora de fosfato de potasio, pH 7.0), y se centrifugó nuevamente, el pellet formado se resuspendió con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos, esto se realizó por triplicado y por tratamiento.

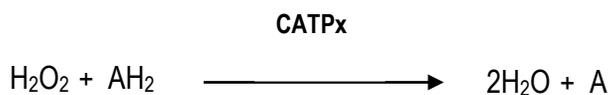
La suspensión de conidios se añadieron a tubos para mini-bedbeater que contenía 500 mg de perlas de vidrio (5 mm de diámetro, Cole palmer) previamente esterilizadas, y se rompieron los conidios en un disruptor celular (Mini-bedbeater 16, Biospec Products), durante 10 min, equivalente a 20 ciclos de ruptura. Cada ciclo fue equivalente a 30 s de ruptura y 30 s en hielo (Garcia-Ortiz 2016). Con el fin de garantizar que más del 95% de los conidios fueran lisados se realizó una prueba experimental en la que se evaluó la viabilidad de los conidios a diferentes ciclos de ruptura (**ANEXO I**). El lisado obtenido se centrifugó a 9000 rpm por 14 min a 4 °C para separar los restos celulares de la proteína soluble, el precipitado se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 9000 rpm, 4 ° C por 10 min para asegurar que todos los restos celulares fueran removidos. El sobrenadante se transfirió a tubos de 1.5 mL Eppendorf (Nandakumar y Marten, 2002), los cuales fueron liofilizados en un equipo (Freeze Dryer, Scientz-N Series) a -46°C, a 1 Pa por 12 h. Posteriormente los tubos se sellaron y se almacenaron a -20 °C.

#### 7.6.2 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CATPx, GPx y SOD.

A partir de los productos liofilizados se determinó la actividad enzimática de catalasa peroxidasa (CATPx), Glutación peroxidasa (GPx) y Superóxido dismutasa (SOD) de acuerdo al protocolo Catalase Assay Kit (Cayman Chemical), Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical) y Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical), respectivamente, cuyos fundamentos se describen más adelante. Los valores de actividad obtenidos en cada muestra, se ajustaron con la cantidad de proteína presente, la cual se cuantificó con el método de Bradford (1976), siguiendo las indicaciones del protocolo.

#### 7.6.3 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CATPx

La catalasa peroxidasa (CATPx) es una enzima antioxidante ubicua presente en la mayoría de las células aeróbicas y está implicada en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), producto tóxico del metabolismo aeróbico.

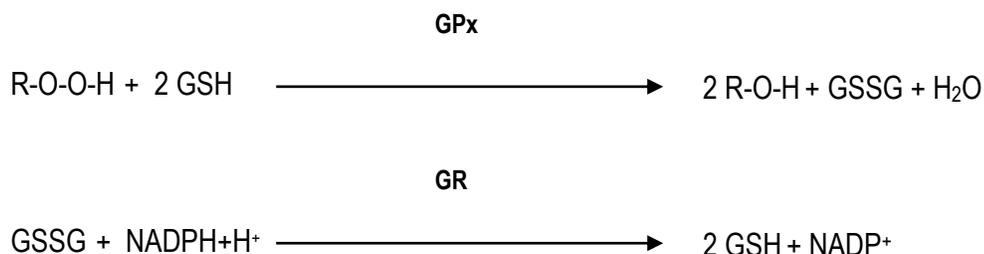


**Figura 2.-** Reacción catalizada por catalasa peroxidasa

Esta enzima demuestra actividad peroxidasa (**Figura 2**), en la que los alcoholes de bajo peso molecular pueden servir como donadores de electrones. El kit de Catalasa (Cayman Chemical) se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El formaldehído producido se mide espectrofotométricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno, ya que este compuesto al unirse de manera específica con el aldehído formado genera, de manera específicamente, un heterociclo bicíclico que, debido a los cambios de oxidación pasa de ser incoloro a tener un color púrpura. (Johansson y Borg, 1988., Wheeler et al, 1990).

#### 7.6.4 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE GPx

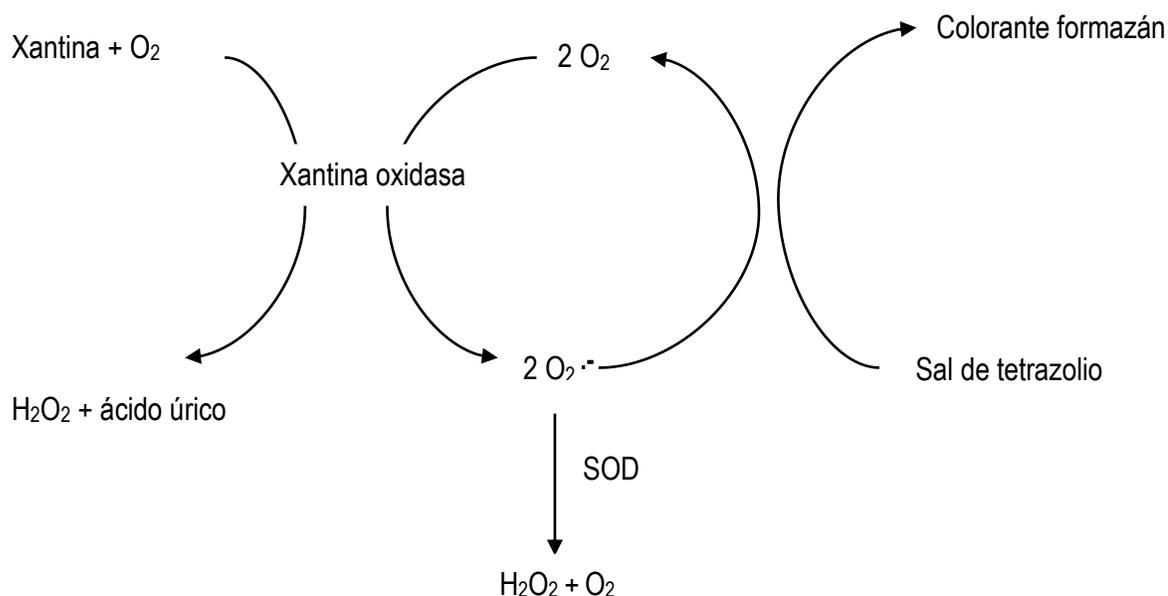
La enzima glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de hidroperóxidos, incluyendo peróxidos de hidrógeno, por el glutatión reducido y funciona para proteger a la célula del daño oxidativo. Las GPx son tetrámeros de cuatro subunidades idénticas. (Ceballos-Picot et al, 1992., Forstrom et al, 1978) y cada subunidad contiene un selenocisteína en el sitio activo que participa directamente en la reducción del sustrato de peróxido. (Ceballos-Picot et al, 1992., Forstrom et al, 1978). La enzima utiliza glutatión como el donador de electrones para regenerar la forma reducida de la selenocisteína (Ceballos-Picot et al, 1992., Forstrom et al, 1978). El kit para medir actividad de Glutathion peroxidasa (Cayman Chemical) mide la actividad GPx indirectamente por una reacción acoplada (**Figura 3**) con la glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), producido después de la reducción de un hidroperóxido orgánico por GPx, se recicla a su estado reducido por GR y NADPH. La oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> se acompaña de una disminución de la absorbancia a 340 nm. La tasa de disminución en la Absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad GPx en la muestra (Paglia y Valentine, 1967).



**Figura 3.-** Reacciones acopladas de entre la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

### 7.6.5 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE SOD.

La actividad de la SOD se evaluó midiendo la dismutación de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina detectados por una sal de tetrazolio (**Figura 4**). La curva estándar generada usando esta enzima proporciona un medio para cuantificar con precisión la actividad de los tres tipos de SOD (Cu / Zn, Mn, y Fe).



**Figura 4.-** Esquema del ensayo de superóxido dismutasa

Una unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para exhibir 50% de dismutación del radical superóxido.

## 7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

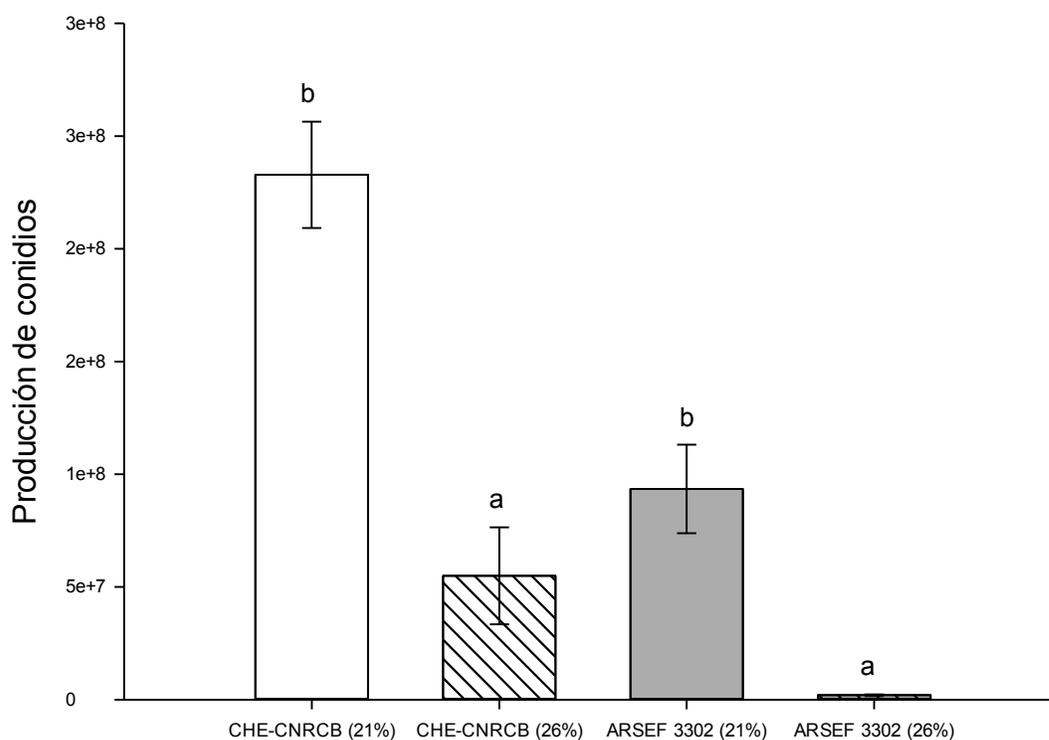
Para la prueba de sobrevivencia a 4 dosis de radiación UV-B se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) así como la prueba de t de Student para comparación de medias; esta última prueba se utilizó para el resto de los análisis. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS para Windows versión 13 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 PRODUCCIÓN DE CONIDIOS

Como se puede observar en la **Gráfica 1**, en ambas cepas se obtuvo una disminución de la producción de conidios, en el caso de la cepa CHE-CNRCB 303 cultivada bajo una AN obtuvo una producción de  $2.33 \times 10^8$  con/cm<sup>2</sup>, mientras que la obtenida bajo una AE fue de  $5.49 \times 10^7$  con/cm<sup>2</sup>, es decir, hubo una disminución de la producción de un 76% con el tratamiento oxidante.

En el caso de la cepa ARSEF 3302, esta fue más sensible a las condiciones oxidantes puesto que la producción de conidios obtenida bajo una AN fue de  $9.35 \times 10^7$  con/cm<sup>2</sup> mientras que la obtenida bajo una AE fue de  $1.96 \times 10^6$  con/cm<sup>2</sup>, esto representa una disminución de aproximadamente el 98 % en la producción de conidios cuando son cultivados bajo una AE en medio ADS.



**Gráfica 1.** Producción de conidios de CHE-CNRCB 303 (21% □ 26% ▨ ) y ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▩) de *I.javanica* e *I. fumosorosea* respectivamente, obtenidos con dos distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (AN y AE). Las letras distinguen los diferentes grupos obtenidos en la prueba de t-Student ( $p < 0.05$ )

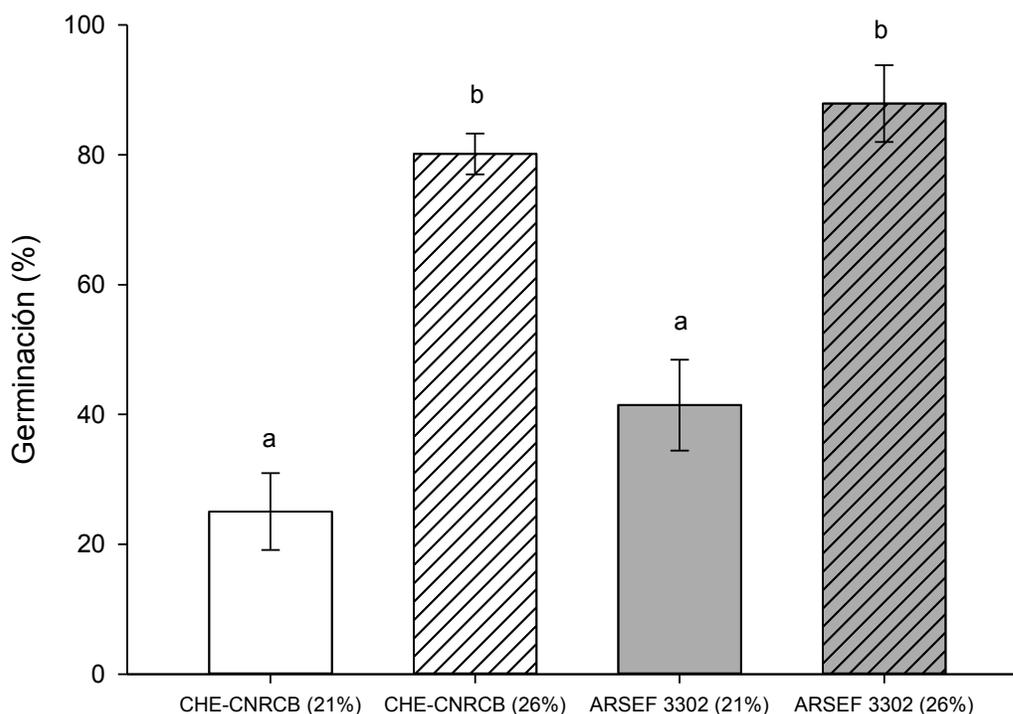
También Miranda (2010) reportó un efecto negativo en la producción de conidios para la cepa CHE-CNRCB 303 de *Isaria javanica*, cuando se cultivó en medio harina de avena (HA) y bajo una AE, mientras que un efecto contrario se reportó para la cepa ARSEF 3302 de *Isaria fumosorosea*. Estas diferencias observadas entre lo reportado por Miranda (2010) y lo encontrado en este estudio puede deberse a diferencias nutricionales entre el medio HA y el medio ADS, ya que este último carece de minerales que pudieran afectar la producción de conidios, además su relación C/N es de 14.05 es mayor a la relación C/N del medio HA que es de 9.32 (Tlecuitl Beristain, 2010). Las variaciones en la composición del medio tienen un efecto en los rendimientos y en la infectividad de los hongos (Rodríguez Gómez, et al, 2009); además, la conidiación es una respuesta compleja y está determinada por las condiciones ambientales (disponibilidad de nutrientes, pH, humedad, etc.), así como el estado metabólico presente en las células (Steyaert *et al.*, 2010).

Por otro lado, Minjarez Castillo (2015) reportó una alta variación en la producción de conidios en las mismas cepas utilizadas en este trabajo. Esta variabilidad en la producción de conidios que puede presentar una misma cepa es un fenómeno conocido, de hecho ha sido observado en la cepa IMI 330189 de *Metarhizium anisopliae* que es utilizada a nivel industrial (Cherry, et al, 1999). A pesar de la variación reportada por Minjarez Castillo (2015), se reportó una producción de conidios utilizando el medio agar papa dextrosa (APD) de  $2.52 \times 10^8$  y  $1.18 \times 10^8$  con/cm<sup>2</sup> para la cepa CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302 respectivamente, producción que se aproxima a la obtenida en este trabajo.

## 8.2 GERMINACIÓN

La germinación es una de las primeras pruebas que determina la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos (Jenkins y Grzywacz, 2000; Lopes et al, 2013) ya que es clave en el inicio del proceso de infección. En los conidios de la cepa CHE-CNRCB 303 cultivados con el tratamiento AE se encontró un aumento del 2.2 veces en la germinación, respecto a aquella encontrada en los conidios obtenidos con el tratamiento AN, con valores de 80.1% y 25%, respectivamente.

En el caso de la cepa ARSEF 3302 de *I. fumosorosea* observamos también un efecto positivo en la germinación. En los conidios cultivados con el tratamiento AE se encontró un aumento en la germinación de 1.12 veces respecto a los conidios producidos con el tratamiento AN, siendo los valores obtenidos de 87.9% y 41.4%, respectivamente (Gráfica 2).



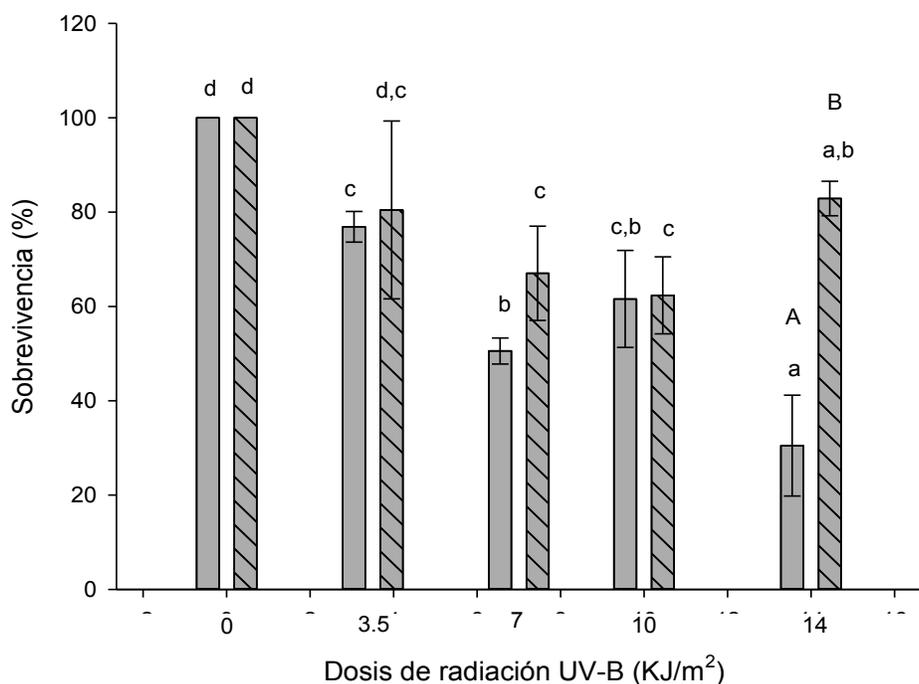
**Gráfica 2.** Porcentaje de germinación conidios de CHE-CNRCB 303 (21% □ 26% ▨) y ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▩) de *I. javanica* *I. fumosorosea* respectivamente, obtenidos con dos distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (AN y AE). Las letras distinguen los diferentes grupos obtenidos en la prueba de t-Student ( $p < 0.05$ )

---

A pesar de que la composición del medio de cultivo es un factor que influye en la germinación (James, 2001; Ypsilos y Magan, 2005), el aumento de la germinación de los conidios con el tratamiento AE en ambas cepas coincide con el mismo efecto reportado por Miranda Hernández et al (2014) con medio harina de avena (HA), por lo tanto, se comprobó con esta prueba de calidad que el efecto positivo en la germinación observado por Miranda et al (2014) y reproducido en este trabajo con medio ADS es debida al tratamiento AE y no al medio de cultivo utilizado.

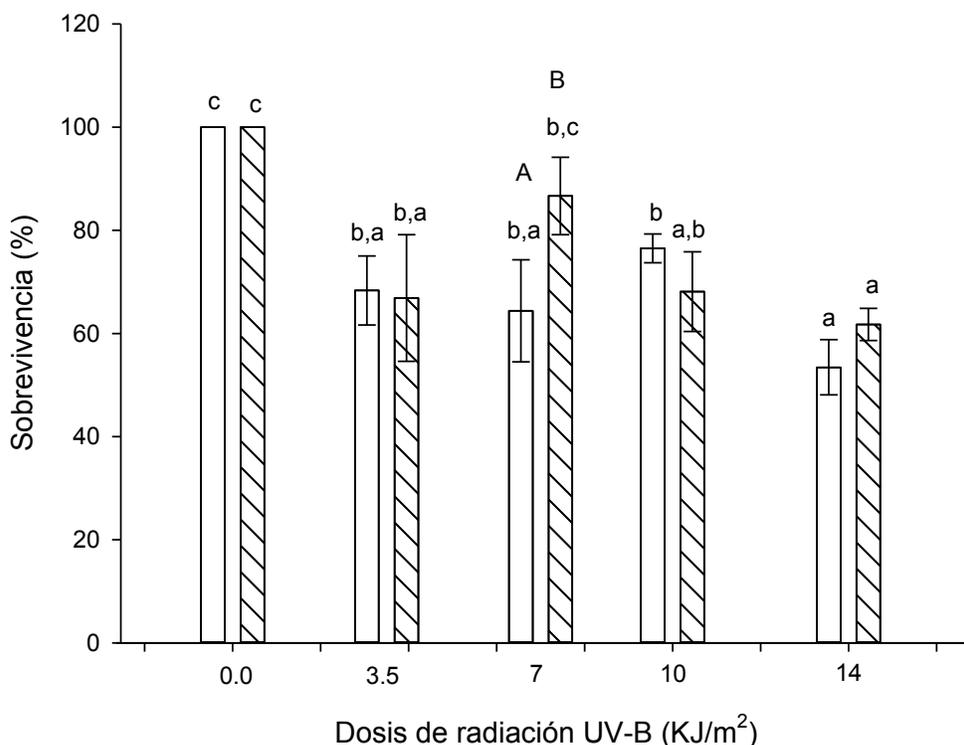
### 8.3 RESISTENCIA A RADIACIÓN UV-B

La dosis de radiación UV-B generalmente se relaciona con la disminución de la sobrevivencia de los conidios de HE en campo (Jacques Fargues et al., 1997), es por esta razón, que en este ensayo se esperaba que los conidios disminuyeran gradualmente su sobrevivencia a mayor dosis de radiación UV-B aplicada. Como se puede observar en la **Gráfica 3**, los conidios de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 cultivados bajo AN presentan el comportamiento descrito anteriormente, ya que su sobrevivencia disminuyó de 77% a 30% cuando la dosis de radiación UV-B se incrementó de 3.5 KJ/m<sup>2</sup> a 14 KJ/m<sup>2</sup>, mientras que los conidios cultivados bajo una AE presentan una sobrevivencia entre 80% y 83% cuando la dosis fue 3.5 KJ/m<sup>2</sup> o 14 KJ/m<sup>2</sup>. Un hecho interesante ocurrió cuando la radiación evaluada fue 14 KJ/m<sup>2</sup>, la sobrevivencia de los conidios fue de 30 y 83% para los conidios cultivados con el tratamiento AN y AE respectivamente; es decir, el tratamiento oxidante durante el cultivo propició un efecto positivo en la resistencia a la radiación UV-B de los conidios de la cepa ARSEF 3302; aunque a dosis menores (3.5, 7 y 10 KJ/m<sup>2</sup>) no se observó diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ).



**Gráfica 3.** Sobrevivencia (%) de los conidios de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▨) a diferentes dosis de radiación UVB (3.5, 7, 10 y 14) kJ/m<sup>2</sup>. Las barras con diferente letra minúscula, muestran diferencia significativa de un tratamiento con respecto a la dosis; barras con diferente letra mayúscula muestran diferencias significativas entre tratamientos, las barras que no tienen letra mayúscula no mostraron diferencia significativa (prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

En estados del territorio mexicano la radiación UV-B, alcanza una intensidad de 50 mW/m<sup>2</sup> en la parte norte de Chihuahua en enero y en Michoacán la intensidad máxima de radiación alcanza los 400 mW/m<sup>2</sup> en agosto (Valdés-Barrón et al., 2013), con base en estos datos es posible estimar que los conidios cultivados bajo una AE serían capaces de estar expuestos por alrededor de 10 h en el estado de Michoacán o hasta 78 h en el estado de Chihuahua, para recibir una dosis de radiación UV-B de 14 kJ/m<sup>2</sup> y mantener el 80 % de la sobrevivencia. Los conidios obtenidos bajo una AE presentan una elevada resistencia a la radiación UVB y que fueron 1.72 veces más resistentes comparados con los conidios obtenidos con la AN, estos dos factores podrían ser determinantes para la efectividad de los HE aplicados en campo para controlar plagas.



**Gráfica 4.** Sobrevivencia (%) de los conidios de *I. javanica* CHE-CNRCB 303 (21% □ 26%) a diferentes dosis de radiación UVB (3.5, 7, 10 y 14) kJ/m<sup>2</sup>. Las barras con diferente letra minúscula, muestran diferencia significativa de un tratamiento con respecto a la dosis; barras con diferente letra mayúscula muestran diferencias significativas entre tratamientos, las barras que no tienen letra mayúscula no mostraron diferencia significativa (prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

Los conidios de la cepa *I. javanica* CHE-CNRCB 303 presentaron un comportamiento contrario al que se esperaba al incrementar la dosis de radiación. Aunque en la primera dosis de radiación aplicada (3.5 KJ/m<sup>2</sup>) hubo un decremento del 32 y 33 % en la sobrevivencia de los conidios cultivados bajo una AN y AE, respectivamente. En el resto de las dosis de radiación aplicadas (7, 10 y 14 KJ/m<sup>2</sup>) no disminuyó la

sobrevivencia de los conidios de *I. javanica* CHE-CNRCB 303, además de que siempre mantuvieron su sobrevivencia por encima del 60 %, ya sea aquellos obtenidos bajo AN o AE, y sólo se observó diferencia estadística significativa en la sobrevivencia ( $p < 0.05$ ) a una dosis de 7 KJ/m<sup>2</sup>, lo que sugiere que esta cepa tiene una capacidad natural de resistencia a la radiación UV-B.

A una dosis de radiación UV-B de 14 kJ/m<sup>2</sup> la sobrevivencia encontrada fue de 53 y 62 % para los conidios cultivados con el tratamiento AN y AE, respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas ( $p > 0.05$ ). Una implicación práctica de esta elevada resistencia natural a la radiación UV-B podría observarse en estados como Durango, Sinaloa o Puebla en los cuales la máxima radiación alcanza es 400 mW/m<sup>2</sup> en agosto (Valdés-Barrón et al., 2013), donde los conidios podrían estar expuestos hasta 10 h o en estados como Baja California o Sonora donde la intensidad de radiación en enero es 50 mW/m<sup>2</sup>, donde los conidios podrían estar expuestos hasta 78 h.

La resistencia natural a la radiación UV podría deberse a él origen de las cepas, debido a que la tolerancia a la radiación UV ha mostrado una relación positiva para algunas especies de HE. Por ejemplo, algunos aislados de *I. fumosorosea* de regiones cálidas fueron más tolerantes a la radiación UV que aislados de regiones templadas (Fargues et al., 1996). Una correlación similar se observó para cepas de *B. bassiana*, donde se detectó una adaptación latitudinal de la radiación UV-B, es decir, los aislados de origen cercanos al ecuador tenían las tolerancias más altas a la radiación UV-B (Fernandes et al, 2007, 2009).

La variación en la susceptibilidad de hongos entomopatógenos a la radiación UV puede estar relacionado con la pigmentación de conidios, ya que es un sistema de los conidios parece y suele ser muy eficaz en la protección contra la radiación UV (Braga et al, 2006; Rangel et al., 2006; Nascimento, et al, 2010).

Un estudio llevado a cabo con radiación UV sobre conidios, mostró que el color de estos puede influir en su inactivación propiciada por la radiación UV, y esta puede ser bloqueada en conidios con pigmentación negra, variando en función del color para otros conidios con pigmentación diferente (Ignoffo y Garcia, 1992). En consecuencia, los conidios negros de *Aspergillus niger* presentan una vida media superior (14.8 h) cuando se expone a la luz solar simulada, en comparación con las demás especies investigadas, que incluían conidios menos pigmentada de *Beauveria*, *Nomuraea*,

---

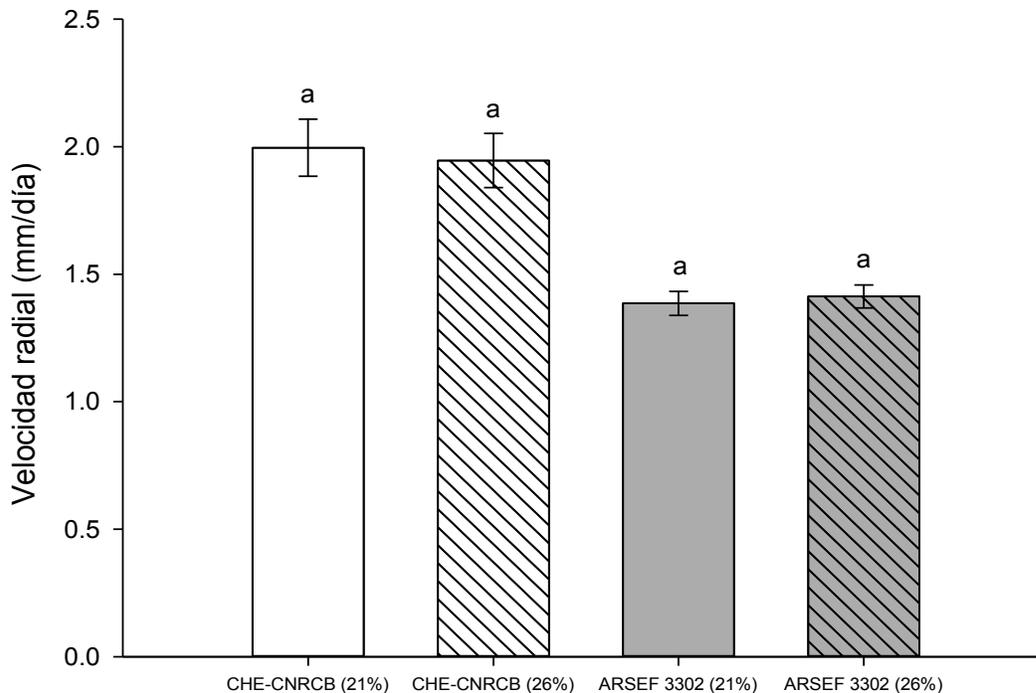
*Metarhizium*, y una de color canela mutante de *A. niger*, con una vida media que varía de 1.1 h para *Nomuraea rileyi* y de 2 h para el mutante de color canela de *A. niger* (Ignoffo y Garcia, 1992).

Otro ejemplo fue el reportado en mutantes cromáticas de conidios de *M. robertsii* ARSEF 23, donde los de tipo silvestre poseían una pigmentación oscura, siendo significativamente más tolerantes a la radiación UV, comparado con las cepas mutantes que poseían una disminución en su tolerancia a la radiación UV (Braga et al, 2006; Rangel et al., 2006; Nascimento, et al, 2010). Por lo que, sería importante cuantificar los pigmentos que le proveen de protección directa a la radiación, por ejemplo la melanina, como un posible factor que contribuye a la resistencia a la radiación UV-B en el caso de los conidios producidos bajo una AE de la cepa ARSEF 3302.

## 8.4 VELOCIDAD RADIAL

La velocidad de crecimiento radial ( $V_r$ ) es una medida de la capacidad de los hongos para invadir el sustrato donde crece, pero también puede relacionarse con la capacidad de crecer en la cutícula como estrategia competitiva contra otros microorganismos, acelerando así la infección de un huésped (Varela y Morales, 1996). Esta variable es dependiente de factores como el tipo de cepa fúngica, características genéticas (Hajek y St. Leger, 1994), la naturaleza del sustrato sobre el que se cultiva el hongo, y la relación C/N del sustrato (Shah et al., 2005; Safavi et al., 2007).

La velocidad radial encontrada en este estudio en los conidios de la cepa CHE-CNRCB 303 de *I. javanica*, que fueron obtenidos bajo una AN y AE para su posterior evaluación en condiciones normales obtuvo valores de 2 y 1.95 milímetros por día (mm/d) respectivamente, sin que hubiera diferencia estadística significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ), el mismo efecto se observó en los conidios de la cepa ARSEF 3302 cultivada con los tratamientos AN y AE con valores de 1.39 y 1.41 (mm/d) respectivamente, sin que hubiera diferencia estadística significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ) (**Gráfica 5**).



**Gráfica 5.** Velocidad radial de conidios de CHE-CNRCB 303 (21% □ 26% ▨) y ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▩) de *I. javanica* *I. fumosorosea* respectivamente, obtenidos con dos distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (AN y AE). Las letras distinguen los diferentes grupos obtenidos en la prueba de t-Student ( $p < 0.05$ )-

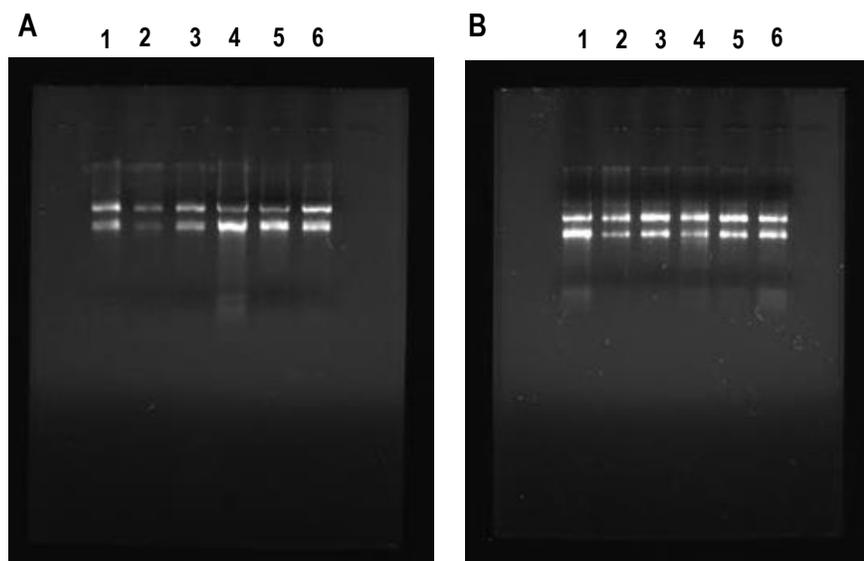
---

En el estudio realizado por Meyer et al (2007) se reportó para seis cepas de *Hirsutella citriformis*, una tasa de crecimiento de 0.83 mm/día cultivadas en medio de ADS con extracto de levadura 1%, mientras que la velocidad radial, reportado por Pérez-González et al (2015) para cepas de *H. citriformis* originarias de México fue de 1.117 mm/día y 0.856 mm/día para las cepas INIFAP-Hir-6 y INIFAP-Hir-1 respectivamente. Por lo que las cepas de *Isaria* evaluadas en este experimento muestran una mayor capacidad de invadir el sustrato en que son cultivadas que otros hongos (Pérez-González et al 2015) y por tanto, podrían tener una mayor eficacia en la invasión del hospedero.

## 8.5 ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL GEN *catA*

### 8.5.1 EXTRACCIÓN DE ARN

El proceso de extracción del ARN de muestras biológicas es una de las etapas más importantes para la cuantificación de la expresión de genes, pues de la calidad de ARN aislado depende el éxito en la síntesis de cDNA y su posterior uso en qPCR. Algunos residuos como las melaninas, representan un reto para la extracción de ARN de alta calidad (Islas-Flores et al, 2006) y los hongos entomopatógenos producen melanina como parte de su sistema de protección contra radiación UV, y en específico los conidios de *Isaria* producen una melanina que les da una coloración marrón (Asaff et al, 2009). Las melaninas por lo general precipitan con el ADN y el ARN, absorben la luz sobre una amplia longitud de onda, dando lugar a una posible interpretación errónea en la cuantificación espectrofotométrica de los ácidos nucleicos (Satyamoorthy et al, 2002), provoca una migración anormal del ADN o ARN al que se unen en geles de agarosa e interfiere con la síntesis de cDNA y las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) al unirse con la ADN-polimerasa (Eckhart et al, 2000) y la transcriptasa inversa (Giambenardi et al, 1998). Por lo que utilizar una técnica de extracción de ARN que permita obtener ARN altamente puro fue un punto crítico para proseguir con el análisis de la expresión del gen *catA*.



**Imagen 1.** Geles de agarosa con donde se muestra la integridad del ARN purificado de la cepa a) CHE CNRB 303 y b) ARSEF 3302 extraídas con RNeasy Plant mini kit.

En la **Imagen 1** se muestra el gel de agarosa donde se corrieron las muestras de ARN de los conidios de las cepas CHE-CNRCB 303 de *I. javanica* y ARSEF 3302 de *I. fumosorosea* cultivados bajo una

AN y una AE con sus respectivos triplicados extraídos con el kit RNeasy Plant mini. En los carriles 1, 2 y 3 (Imagen 1 A y B) se observa las bandas correspondientes al ARN obtenido de ambas cepas de *Isaria* cultivadas bajo una AN y en los carriles 4, 5 y 6 se encuentra el ARN purificado de ambas cepas de *Isaria* sometidas al tratamiento AE. En todos los casos podemos verificar la integridad del ARN purificado, este resultado permitió continuar con el análisis de expresión relativa del gen *catA*

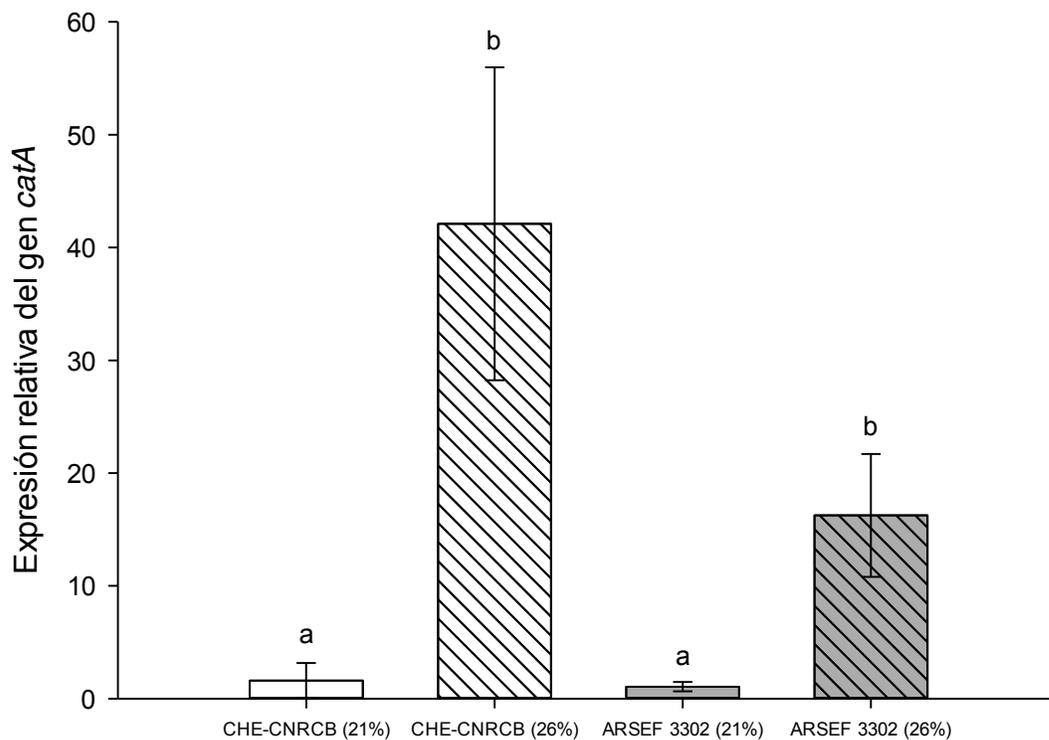
### 8.5.2 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *catA*

El gen *catA* codifica para un tipo de catalasa que se acumula en los conidios y que tiene como función el proteger a las esporas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido durante la germinación o por la respuesta inmune del insecto una vez que el hongo lo ha invadido, aumentando la posibilidad de éxito en la infección. (Navarro et al, 1996).

La expresión relativa del gen *catA* (**Gráfica 6**) en ambas cepas se incrementó cuando los cultivos se sometieron a los pulsos oxidantes, para la cepa CHE-CNRCB fue 25 veces mayor cuando los conidios se cultivaron bajo una AE respecto a la observada en los conidios cultivados bajo una AN y 14 veces mayor en conidios cultivados bajo una AE de la cepa ARSEF 3302, respecto a los conidios cultivados con el tratamiento AN. Este incremento en ambas cepas, a su vez justifica parte del incremento en la actividad enzimática de catalasa reportado por Miranda Hernández et al (2014) en las mismas concentraciones de oxígeno evaluadas en este estudio.

El aumento en la expresión relativa del gen *catA* en los conidios de ambas cepas, cultivadas bajo el tratamiento AE, podría explicar el considerable aumento de la germinación de estos, ya que al traducirse rápidamente durante la germinación podría contrarrestar el estado hiperoxidante producido por el metabolismo oxidativo, por lo que *catA* podría proteger a las esporas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido durante la germinación o por la respuesta inmune del hospedero (Navarro et al, 1996), lo que se traduciría en una mayor infectividad, efecto reportado por Miranda et al (2014) para las dos cepas evaluadas en este trabajo contra larvas de *Galleria mellonella*, lo cual es consistente con nuestros resultados.

En un estudio realizado por Wang et al (2013), analizaron la función de 5 tipos de catalasa en una cepa de *Beauveria bassiana*, y se comprobó que el gen *catA* es específico de conidios y que al generar mutantes por *knockout* de este gen, los conidios fueron más sensibles a la oxidación, menos termotolerantes, menos tolerantes a la radiación UV-B y menos virulentos hacia larvas de *S. litura* comparados con la cepa silvestre.



**Gráfica 6.** Expresión relativa del gen *catA* de CHE-CNRCB 303 (21% □ 26% ▨) y ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▩) de *I.javanica* *I. fumosorosea* respectivamente, obtenidos con dos distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (AN y AE). Las letras distinguen los diferentes grupos obtenidos en la prueba de t-Student ( $p < 0.05$ ).

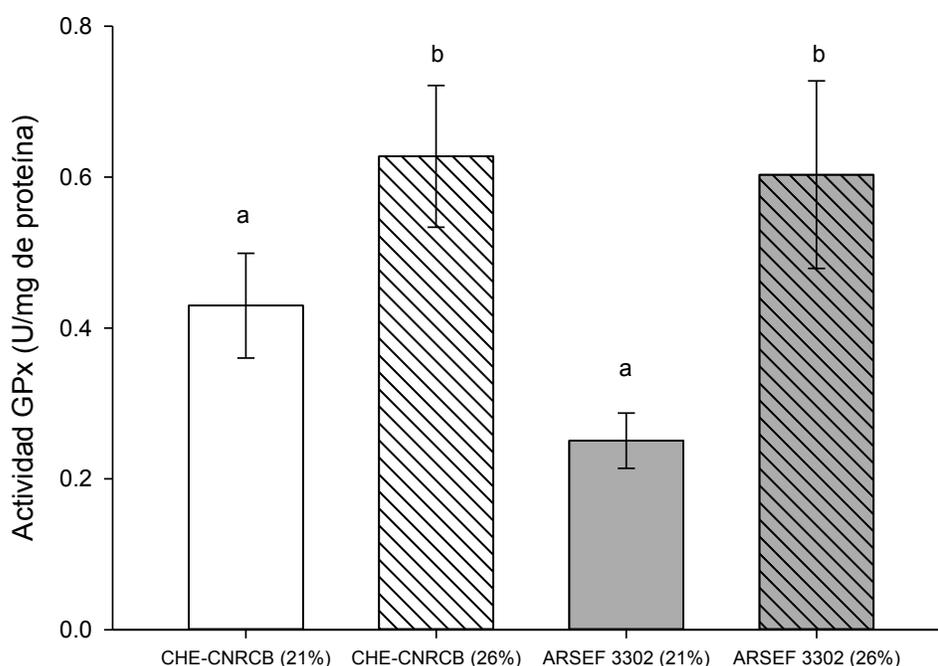
Estos resultados reportados por Wang et al (2013) en *Beauveria bassiana*, concuerdan con el aumento en la germinación y la virulencia; encontrado por Miranda Hernández et al (2014), además, el incremento en *catA* coincide con el aumento en la germinación y la virulencia que reportó Miranda et al (2014), pero no para la resistencia a UV, porque aunque en las dos cepas aumenta la expresión del gen *catA*, sólo una de ellas mejora respecto a protección contra UV-B por lo que se planteó cuantificar otras enzimas antioxidantes implicadas en la calidad como la glutatión peroxidasa.

Además, para confirmar que el gen *catA* en las cepas de *Isaria* usadas en este estudio estuvo directamente relacionado con la mejora en los parámetros de calidad antes mencionados se debe corroborar con la inhibición de este gen en los conidios.

## 8.6 ACTIVIDAD DE OTRAS ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES

### 8.6.1 GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

Debido a que no hubo correlación entre la actividad de *catA* con la protección UV-B, y en vista de que se ha reportado que algunas enzimas antioxidantes están relacionadas también con la resistencia a radiación UV, decidimos evaluar la actividad de otras enzimas antioxidantes: GPx y CATPx. La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima que participa en la detoxificación de los hidroperóxidos de lípidos utilizando el glutatión (GSH) como poder reductor. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que puede causar la oxidación de 1 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> en un minuto a 25 ° C, la cual es totalmente dependiente de la cantidad de GSSG generado por la GPx. En ambas cepas hubo diferencia significativa entre la actividad enzimática de la GPx (A.GPx) obtenidos a AN comparados con la obtenida con el tratamiento AE. En el caso de la cepa CHE-CNRCB 303 fue 46 % mayo mientras que para la cepa ARSEF 3302 aumentó 1.4 comparado con la A.GPx obtenida de los conidios cultivados con AN.

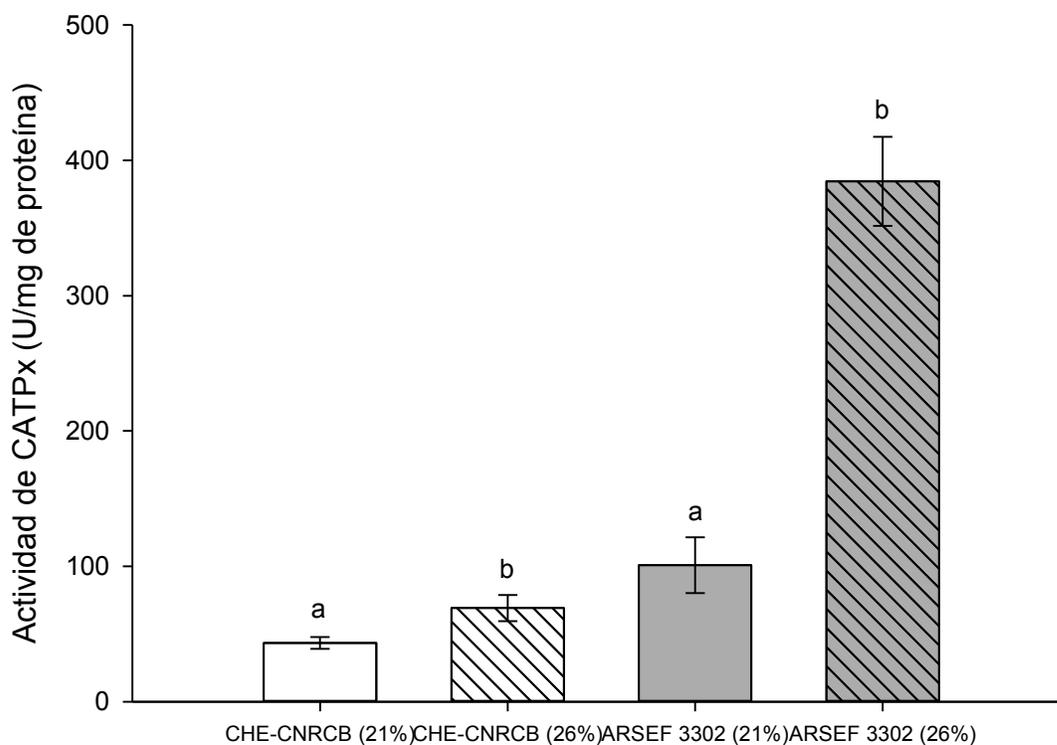


**Gráfica 7.** A.GPx de conidios de CHE-CNRCB 303 (21% □ 26% ▨) y ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▩) de *I.javanica* *I. fumosorosea* respectivamente, obtenidos con dos distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (AN y AE). Las letras distinguen los diferentes grupos obtenidos en la prueba de t-Student ( $p < 0.05$ )

### 8.6.2 ACTIVIDAD CATALASA PEROXIDASA (CATP<sub>x</sub>)

Las catalasas de especies de hongos son diversas en estructura y función, además de que su actividad enzimática se diferencia en respuesta al estrés oxidativo durante el crecimiento y el desarrollo (Bussink y Oliver, 2001; Scherer et al, 2002; Chelikani et al, 2004; Moreira et al., 2004; Chagas et al., 2008).

Una unidad se definió como la cantidad de enzima que causa la formación de 1.0 nmol de formaldehído por minuto a 25 °C. En la **Gráfica 8** podemos observar para la cepa CHE-CNRCB 303 un aumento del 59% en la actividad de CATP<sub>x</sub> para los conidios obtenidos con una AE, respecto a los conidios obtenidos bajo una AN, con valores promedio de 69 y 43 U/mg de proteína respectivamente.



**Gráfica 8.** A. CATP<sub>x</sub> de conidios de CHE-CNRCB 303 (21% □ 26% ▨) y ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▩) de *I. javanica I. fumosorosea* respectivamente, obtenidos con dos distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (AN y AE). Las letras distinguen los diferentes grupos obtenidos en la prueba de t-Student ( $p < 0.05$ )

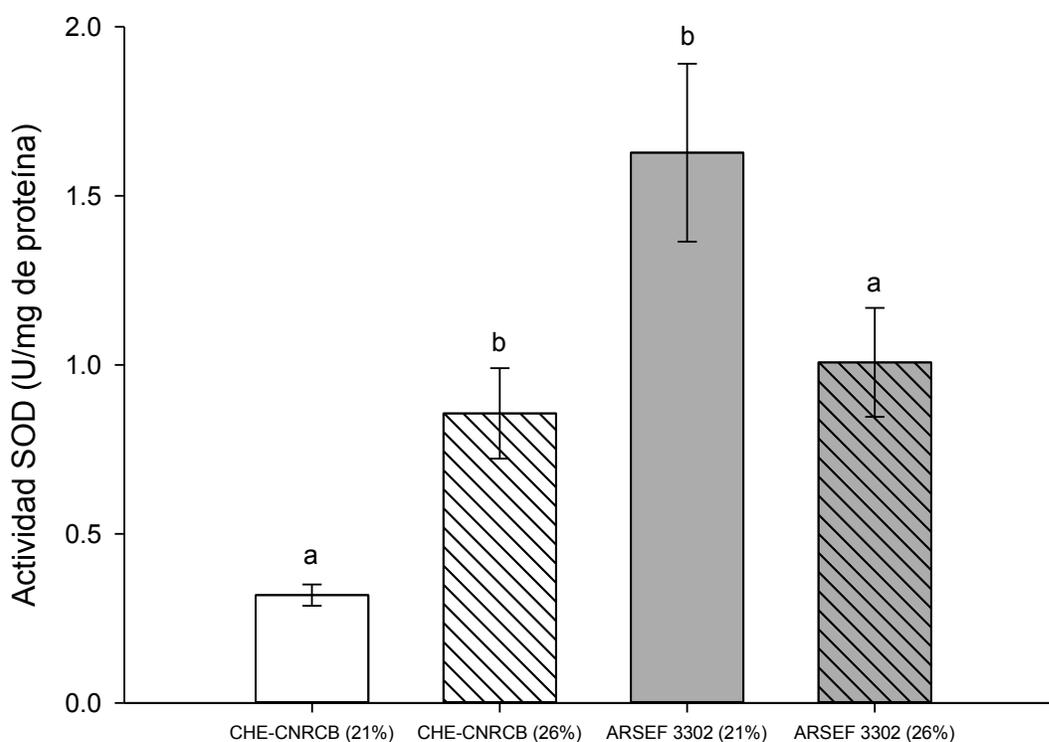
---

Mientras que para los conidios obtenidos con una AE de la cepa ARSEF 3302 se observa que la actividad específica de esta enzima casi se triplicó respecto a los conidios obtenidos con una AN, presentando valores de 384 y 101U/mg de proteína respectivamente.

Estos datos se relacionan con el aumento a la resistencia a radiación UVB, ya que, con base en los resultados, sólo para la cepa ARSEF 3302 se encontró un aumento en la sobrevivencia en los conidios obtenidos bajo una AE, respecto a los conidios cultivados en una AN expuestos a una dosis de 14 kJ/m<sup>2</sup> de radiación UVB, mientras que con CNRCB1 a pesar de que hay diferencia de la A.CatPx entre los tratamientos, esta diferencia no es tan grande como en el caso de ARSEF 3302.

### 8.6.3 ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

En estudios anteriores, Miranda Hernández (2014) cuantificó la A.SOD en conidios de las cepas CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302 de *I. javanica* e *I. fumosorosea*, respectivamente, obtenidos en cultivos con una AE y AN, a las 156 h de cultivo (con 4 pulsos oxidantes), sin encontrar diferencia en la actividad entre los tratamientos con la cepa ARSEF 3302, incluso una disminución en el tratamiento con AE de la cepa CHE-CNRCB 303 comparada con los conidios obtenidos bajo una AN. Por lo que el aumento en la calidad de estas cepas con la AE se atribuyó al aumento en la actividad de catalasa. Pero, debido a que la SOD también ha sido un factor en el aumento de la calidad de otros HE (Xie, et al, 2010, 2012), nuestra pregunta fue si con un pulso oxidante más, además de los 4 ya asignados, sería posible aumentar la A.SOD y hacer visible un aumento en la calidad de los conidios cosechados bajo una AE. Por lo que se evaluó la A.SOD a las 180 h de cultivo, es decir, 24 h después de las 156 h reportadas por Miranda Hernández (2014), con 5 pulsos oxidantes en total. Además, que se procuró la eliminación de micelio al filtrar en tela de propileno.



**Gráfica 9.** A.SOD de conidios de CHE-CNRCB 303 (21% □ 26% ▨) y ARSEF 3302 (21% ■ 26% ▩) *I. javanica* e *I. fumosorosea* respectivamente, obtenidos con dos distintas concentraciones de oxígeno en la atmósfera (AN y AE). Las letras distinguen los diferentes grupos obtenidos en la prueba de t-Student ( $p < 0.05$ )

Los resultados encontrados para la cepa CHE-CNRCB 303 (Gráfica 9) muestran que la actividad específica de SOD en los conidios obtenidos bajo AE aumentó 1.7 veces comparados con la A.SOD de los conidios obtenidos con AN. Por otro lado, la A.SOD de los conidios obtenidos bajo una AE de ARSEF 3302 disminuyó 38.2% respecto a los conidios cosechados con una AN, teniendo valores promedio de 1.01 y 1.63 U/mg de proteína respectivamente.

Debido al aumento de la A.SOD en los conidios de la cepa CHE-CNRCB 303, estos probablemente muestren una mayor calidad con este nuevo tratamiento (5 pulsos oxidantes), por lo que se podría evaluar diferentes parámetros de calidad bajo este tratamiento y valorar los efectos en la calidad para los tratamientos AE con 4 pulsos y AE con 5 pulsos. Para el caso de ARSEF 3302 donde la A.SOD disminuyó con el tratamiento AE (5 pulsos oxidantes), es posible que haya llegado a un punto de regulación donde se está generando mayor concentración de peróxido de hidrogeno, regulando la actividad de SOD impidiendo la generación de más  $H_2O_2$  que propiciaría la producción de otras ERO por medio de la reacción de Fenton como el radical hidroxilo que es potencialmente peligroso por oxidar componentes celulares como lípidos proteínas y ADN (Fiechter et al, 1981; Kawasaki y Aguirre, 2001).

## 9 CONCLUSIONES

El tratamiento AE mostró tener un efecto negativo sobre la producción de conidios de las cepas *Isaria javanica* CHE-CNRCB 303 e *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302. Por otro lado, la capacidad antioxidante de los conidios se modificó al encontrar un incremento considerable de la expresión del gen *catA* en ambas cepas, así como de la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y catalasa peroxidasa cuando se obtuvieron conidios con una AE.

El aumento en la germinación en los conidios obtenidos bajo condiciones oxidantes, se explica parcialmente con el aumento en la capacidad antioxidante mediada por enzimas, que permite hacer frente a este estado, dado que en la germinación aumenta la generación de ERO. Esta capacidad antioxidante se correlaciona con el aumento en la tolerancia a la radiación UV-B, que podría mejorar la probabilidad de éxito en campo de estos conidios, ya que serían capaces de sobrevivir más del 50% de los conidios incluso en épocas de altas dosis de radiación en México. Esto representa una ventaja en la metodología de aplicación de los conidios.

## 10 PERSPECTIVAS

Con el fin de aumentar el entendimiento del efecto positivo en la calidad de los conidios de las cepas de *Isaria* evaluadas en este estudio bajo una AE, se propone realizar los siguientes estudios:

- I. Cuantificar la concentración de melanina presente en los conidios producidos bajo una AE, debido a que puede ser un factor que se modifica debido a la atmosfera oxidante, permitiendo a los conidios una mayor tolerancia a la radiación UV-B, comparada con los conidios obtenidos bajo una AN.
- II. Determinar el estado redox de los conidios producidos bajo una AE y una AN, con el objetivo de correlacionar su modificación con el aumento de la calidad de CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302.
- III. Comparar la actividad enzimática de glutatión reductasa, Tiorredoxina peroxidasa y Tiorredoxina reductasa, con el fin de conocer la aportación de estas enzimas en la capacidad antioxidante de los conidios cultivados bajo una AE comparadas con los obtenidos bajo una AN.
- IV. Inhibir la expresión del gen *catA* en los conidios cultivados bajo una AE y evaluar la calidad de estos con el fin de corroborar la relación de este gen con el aumento de la calidad de los conidios.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Ankersmit, G. W. (1953). DDT-resistance in *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lep.) in Java. *Bulletin of Entomological Research*, 44(03), 421. <http://doi.org/10.1017/S0007485300025530>
- Asaff, A., Cerda-García-Rojas, C., & de la Torre, M. (2005). Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 542–547. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-1909-2>
- Asaff, A., Escobar, F., & de la Torre, M. (2009). Culture medium improvement for *Isaria fumosorosea* submerged conidia production. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 87–92. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.007>
- Behle RW, Garcia-Gutierrez C, Tamez-Guerra P, McGuire MR, J. M. (2006). Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwest Entomol*, 40, 1037–1041.
- Bidochka, M. J., Kamp, A. M., & de Croos, J. N. A. (2000). Insect Pathogenic Fungi: From Genes to Populations. In *Fungal Pathology* (pp. 171–193). Dordrecht: Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-94-015-9546-9\\_7](http://doi.org/10.1007/978-94-015-9546-9_7)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <http://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251–272. [http://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](http://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Braga, G. U. ., Destéfano, R. H. ., & Messias, C. L. (1999). Oxygen Consumption by *Metarhizium anisopliae* during Germination and Growth on Different Carbon Sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(2), 112–119. <http://doi.org/10.1006/jipa.1999.4872>
- Braga, G. U. ., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2001). Variability in Response to UV-B among Species and Strains of *Metarhizium* Isolated from Sites at Latitudes

- from 61°N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 98–108.  
<http://doi.org/10.1006/jipa.2001.5048>
- Braga, G. U. L., Rangel, D. E. N., Flint, S. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2006). Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 82(2), 418. <http://doi.org/10.1562/2005-05-08-RA-52>
- Bussink, H. J., & Oliver, R. (2001). Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. *European Journal of Biochemistry*, 268(1), 15–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121097>
- Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1988). Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$  in Aqueous Solution). *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(2), 513–886. <http://doi.org/10.1063/1.555805>
- Ceballos-Picot, I., Trivier, J. M., Nicole, A., Sinet, P. M., & Thevenin, M. (1992). Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*, 38(1). Retrieved from <http://clinchem.aaccjnls.org/content/38/1/66.long>
- Ceron-Garcia, A., Vargas-Arispuro, I., Aispuro-Hernandez, E., & Angel, M. (2012). Oligoglucan Elicitor Effects During Plant Oxidative Stress. In *Cell Metabolism - Cell Homeostasis and Stress Response*. InTech. <http://doi.org/10.5772/26057>
- Chagas, R. F., Bailão, A. M., Pereira, M., Winters, M. S., Smullian, A. G., Deepe, G. S., & de Almeida Soares, C. M. (2008). The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: Protein activity and transcript analysis. *Fungal Genetics and Biology*, 45(11), 1470–1478. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.08.007>
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1573). Retrieved from

<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/366/1573/1987.long>

- Charnley, A. K., & St. Leger, R. J. (1991). The Role of Cuticle-Degrading Enzymes in Fungal Pathogenesis in Insects. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* (pp. 267–286). Boston, MA: Springer US. [http://doi.org/10.1007/978-1-4899-2635-7\\_12](http://doi.org/10.1007/978-1-4899-2635-7_12)
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61(2), 192–208. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- CHERRY, A. J., JENKINS, N. E., HEVIEFO, G., BATEMAN, R., & LOMER, C. J. (1999). Operational and Economic Analysis of a West African Pilotscale Production Plant for Aerial Conidia of *Metarhizium* spp. for Use as a Mycoinsecticide Against Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), 35–51. <http://doi.org/10.1080/09583159929893>
- Chouvenc, T., Su, N.-Y., & Robert, A. (2009). Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3), 234–241. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.008>
- Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4(5), 197–203. [http://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10022-6](http://doi.org/10.1016/0966-842X(96)10022-6)
- Clavijo A., S. (1993). *Fundamentos de manejo de plagas*. (Caracas, Ed.).
- Dawkar, V. V., Chikate, Y. R., Lomate, P. R., Dholakia, B. B., Gupta, V. S., & Giri, A. P. (2013). Molecular Insights into Resistance Mechanisms of Lepidopteran Insect Pests against Toxicants. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 4727–4737. <http://doi.org/10.1021/pr400642p>
- Dubovskii, I. M., Grizanov, E. V., Chertkova, E. A., Slepneva, I. A., Komarov, D. A., Vorontsova, I. L., & Glupov, V. V. (2010). [Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in larva hemolymph of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of process of encapsulation]. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii I Fiziologii*, 46(1), 30–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20297667>

- Eckhart, L., Bach, J., Ban, J., & Tschachler, E. (2000). Melanin Binds Reversibly to Thermostable DNA Polymerase and Inhibits Its Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(3), 726–730. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2716>
- Eivazian Kary, N., & Alizadeh, Z. (2017). Effects of sub-culturing on genetic and physiological parameters in different *Beauveria bassiana* isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 145, 62–67. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2017.03.008>
- Evans, M. V., Turton, H. E., Grant, C. M., & Dawes, I. W. (1998). Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 483–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457848>
- Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L. A., ... Rougier, M. (1996). Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*, 135(3), 171–181. <http://doi.org/10.1007/BF00632339>
- Fargues, J., Rougier, M., Goujet, R., Smits, N., Coustere, C., & Itier, B. (1997). Inactivation of Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by Near-Ultraviolet (UVB and UVA) and Visible Radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69(1), 70–78. <http://doi.org/10.1006/jipa.1996.4637>
- Faria, M. R. de, & Wraight, S. P. (2007a). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Faria, M. R. de, & Wraight, S. P. (2007b). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Fernandes, É. K. K., Moraes, Á. M. L., Pacheco, R. S., Rangel, D. E. N., Miller, M. P., Bittencourt, V. R. E. P., & Roberts, D. W. (2009). Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 760–774. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04258.x>
- Fernandes, É. K. K., Rangel, D. E. N., Moraes, Á. M. L., Bittencourt, V. R. E. P., & Roberts, D. W.

- (2007a). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3), 237–243. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2007.05.007>
- Fernandes, É. K. K., Rangel, D. E. N., Moraes, Á. M. L., Bittencourt, V. R. E. P., & Roberts, D. W. (2007b). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3), 237–243. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2007.05.007>
- Fiechter, A., Fuhrmann, G. F., & Käppeli, O. (1981). Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells (pp. 123–183). [http://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60327-6](http://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60327-6)
- Forstrom, J. W., Zakowski, J. J., & Tappel, A. L. (1978). Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, 17(13), 2639–2644. <http://doi.org/10.1021/bi00606a028>
- Furlong, M. J., Wright, D. J., & Dosdall, L. M. (2013). Diamondback Moth Ecology and Management: Problems, Progress, and Prospects. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 517–541. <http://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153605>
- Gallou, A., Serna-Domínguez, M. G., Berlanga-Padilla, A. M., Ayala-Zermeño, M. A., Mellín-Rosas, M. A., Montesinos-Matías, R., & Arredondo-Bernal, H. C. (2016). Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biology*, 120(3), 414–423. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.009>
- García Ortis, N. (2016). *ANÁLISIS DE LA CALIDAD Y PROTEÓMICA DE CONIDIOS DE Metarhizium anisopliae OBTENIDOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXÍGENO*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., & Martínez, R. F. M. (2015). HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO UNA ALTERNATIVA EN EL CONTROL BIOLÓGICO. *Kuxulkab'*, 15(27). Retrieved from <http://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/846>
- García, O. (2012). *Producción de conidios de Metarhizium anisopliae var lepidiotum en atmósferas oxidantes*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Giambernardi, T. A., Ulrich, R., and Klebe, R. J. (1998). Bovine serum albumin reverses inhibition of

- RT-PCR by melanin. *Biotechniques*, (25), 564–566.
- Griffiths, H. R., Mistry, P., Herbert, K. E., & Lunec, J. (1998). Molecular and Cellular Effects of Ultraviolet Light-Induced Genotoxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 35(3), 189–237. <http://doi.org/10.1080/10408369891234192>
- Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 293–322. <http://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 170–180. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.014>
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260–6. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005>
- Ignoffo, C. M., & Garcia, C. (1992). Influence of Conidial Color on Inactivation of Several Entomogenous Fungi (Hyphomycetes) by Simulated Sunlight. *Environmental Entomology*, 21(4), 913–917. <http://doi.org/10.1093/ee/21.4.913>
- Im, D., Na, K., Vv, G., & Na, R. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *ISJ*, 13, 229–246. Retrieved from <http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ428.pdf>
- Islas-Flores, I., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché, B., & Rodríguez-García, C. M. (2006). Extraction of High-Quality, Melanin-Free RNA From *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA Preparation. *Molecular Biotechnology*, 34(1), 45–50. <http://doi.org/10.1385/MB:34:1:45>
- James, R. . (2001). Effects of Exogenous Nutrients on Conidial Germination and Virulence against the Silverleaf Whitefly for Two Hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(2), 99–107. <http://doi.org/10.1006/jipa.2000.5001>
- Jamieson, M. A., Trowbridge, A. M., Raffa, K. F., & Lindroth, R. L. (2012). Consequences of climate warming and altered precipitation patterns for plant-insect and multitrophic interactions. *Plant*

- Physiology*, 160(4), 1719–27. <http://doi.org/10.1104/pp.112.206524>
- Jegorov, A., Sedmera, P., Mařha, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Landa, Z., & Eyal, J. (1994). Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, 37(5), 1301–1303. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90402-3](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90402-3)
- Jenkins, N. E., & Grzywacz, D. (2000). Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753–777. <http://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4), 213–236. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>
- Johansson, L. H., & Borg, L. A. (1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, 174(1), 331–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3064653>
- Kawasaki, L., & Aguirre, J. (2001). Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1434–40. <http://doi.org/10.1128/JB.183.4.1434-1440.2001>
- Kintziou, H., Protopapa, E., Tsachageas, C.P., Stavrianeas, N., Plessa, H. (2002). Sunlight, DNA damage and skin cancer: A short view. *Epitheorese Klinikes Farmakologias Kai Farmakokinetikes*, 20(1), 45–52.
- Komarov, D. A., Slepneva, I. A., Dubovskii, I. M., Grizanova, E. V., Khramtsov, V. V., & Glupov, V. V. (2006). Generation of superoxide radical and hydrogen peroxide in insect hemolymph in the course of immune response. *Doklady Biological Sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections*, 411, 482–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425046>
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295–1309. [http://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](http://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)

- Lewis, M. W., Robalino, I. V., & Keyhani, N. O. (2009). Uptake of the fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived in vivo hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, *155*(9), 3110–3120. <http://doi.org/10.1099/mic.0.029165-0>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopes, R. B., Martins, I., Souza, D. A., & Faria, M. (2013). Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, *112*(3), 236–242. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.010>
- Luangsa-ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Manoch, L., & Samson, R. A. (2005). On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research*, *109*(Pt 5), 581–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16018312>
- Mahaseth, T., & Kuzminov, A. (2016). Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.006>
- Meyer, J. M., Hoy, M. A., & Boucias, D. G. (2007). Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, *95*(2), 101–109. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2007.01.005>
- Miller, C. D., Rangel, D., Braga, G. U., Flint, S., Kwon, S.-I., Messias, C. L., ... Anderson, A. J. (2004). Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. *Canadian Journal of Microbiology*, *50*(1), 41–49. <http://doi.org/10.1139/w03-097>
- Minjarez Castillo, J. M. A. (Universidad A. M. (2015). *Determinación del momento de aplicación de pulsos con 26% de oxígeno para el mejoramiento de la calidad de los conidios de *Isaria fumosorosea**. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Miranda, H. (2010). *Influencia del incremento de O<sub>2</sub> en la producción y calidad de conidios de hongos*

*entomopatógenos*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Miranda, H. (2014). *Producción de conidios de hongos entomopatógenos en estado oxidante y análisis de su respuesta a distintos tipos de estrés*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Miranda-Hernández, F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2014). Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Science*, 70(4), 661–666. <http://doi.org/10.1002/ps.3605>

Mishra, M., Lomate, P. R., Joshi, R. S., Punekar, S. A., Gupta, V. S., & Giri, A. P. (2015). Ecological turmoil in evolutionary dynamics of plant–insect interactions: defense to offence. *Planta*, 242(4), 761–771. <http://doi.org/10.1007/s00425-015-2364-7>

Montesinos-Matías, R. (2008). *Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de Beauveria bassiana*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., & Mager, W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19(4), 651–658. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.403940.x>

Moreira, S. F. I., Bailão, A. M., Barbosa, M. S., Jesuino, R. S. A., Felipe, M. S. S., Pereira, M., & Soares, C. M. de A. (2004). Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast*, 21(2), 173–182. <http://doi.org/10.1002/yea.1077>

Muñiz-Paredes, F. (2016). *Comparación en la producción de conidios del género Isaria en cultivos superficiales y sólidos sometidos a pulsos oxidantes*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 57. <http://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>

Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2002). Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins.

*Electrophoresis*, 23(14), 2216–22. [http://doi.org/10.1002/1522-2683\(200207\)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y](http://doi.org/10.1002/1522-2683(200207)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y)

Nappi, A. J., & Vass, E. (1998). Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Parasitology*, 84(6), 1150–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920305>

Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., & Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology*, 68(4), 450–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690025>

Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., & Carton, Y. (2000). Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. *Nitric Oxide*, 4(4), 423–430. <http://doi.org/10.1006/niox.2000.0294>

Nascimento, É., Da Silva, S. H., Dos Reis Marques, E., Roberts, D. W., & Braga, G. U. L. (2010). Quantification of Cyclobutane Pyrimidine Dimers Induced by UVB Radiation in Conidia of the Fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. *Photochemistry and Photobiology*, 86(6), 1259–1266. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00793.x>

Navarro, R. E., Stringer, M. A., Hansberg, W., Timberlake, W. E., & Aguirre, J. (1996a). *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Current Genetics*, 29(4), 352–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598056>

Navarro, R. E., Stringer, M. A., Hansberg, W., Timberlake, W. E., & Aguirre, J. (1996b). *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Current Genetics*, 29(4), 352–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598056>

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 64(3), 548–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974126>

Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. (2013). Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects*, 4(3), 357–374. <http://doi.org/10.3390/insects4030357>

- Osharov, N., & May, G. (2000). Conidial Germination in *Aspergillus nidulans* Requires RAS Signaling and Protein Synthesis. *Genetics*, 155(2). Retrieved from <http://www.genetics.org/content/155/2/647.long>
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6066618>
- Pérez-González, O., Rodríguez-Guerra, R., López-Arroyo, J. I., Sandoval-Coronado, C. F., & Maldonado-Blanco, M. G. (2015). Radial Growth, Sporulation, and Virulence of Mexican Isolates of *Hirsutella citriformis*<sup>1</sup> against *Diaphorina citri*<sup>2</sup>. *Southwestern Entomologist*, 40(1), 111–120. <http://doi.org/10.3958/059.040.0109>
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens*, 3(3), e26. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>
- Rangel, D. E. N. (2011). Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1281–1296. <http://doi.org/10.1007/s11274-010-0584-3>
- Rangel, D. E. N., Butler, M. J., Torabinejad, J., Anderson, A. J., Braga, G. U. L., Day, A. W., & Roberts, D. W. (2006). Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(3), 170–182. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2006.06.008>
- Ratcliffe, N. A., & Gagen, S. J. (1977). Studies on the in vivo cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell*, 9(1), 73–85. [http://doi.org/10.1016/0040-8166\(77\)90050-7](http://doi.org/10.1016/0040-8166(77)90050-7)
- Roberts, D. W., & St. Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1–70. [http://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54001-7](http://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54001-7)
- Rodrigues, I. M. W., Forim, M. R., Silva, M. F. G. F. da, Fernandes, J. B., & Filho, A. B. (2016). Effect

- of Ultraviolet Radiation on Fungi &lt;i>Beauveria bassiana&lt;/i> and &lt;i>Metarhizium anisopliae&lt;/i>, Pure and Encapsulated, and Bio-Insecticide Action on &lt;i>Diatraea saccharalis&lt;/i>. *Advances in Entomology*, 04(03), 151–162. <http://doi.org/10.4236/ae.2016.43016>
- Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 513–518. <http://doi.org/10.1007/s11274-008-9917-x>
- Rosengaus, R. B., Maxmen, A. B., Coates, L. E., & Traniello, J. F. A. (1998). Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44(2), 125–134. <http://doi.org/10.1007/s002650050523>
- Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasoulia, G., Bandani, A. R., & Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116–123. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x>
- Samuels, K. D. Z., Heale, J. B., & Llewellyn, M. (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53(1), 25–31. [http://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90070-0](http://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90070-0)
- Satyamoorthy, K., Li, G., Van Belle, P. A., Elder, D. E., & Herlyn, M. (2002). A versatile method for the removal of melanin from ribonucleic acids in melanocytic cells. *Melanoma Research*, 12(5), 449–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12394186>
- Scherer, M., Wei, H., Liese, R., & Fischer, R. (2002). *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryotic Cell*, 1(5), 725–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12455692>
- Schmid-Hempel, P. (2005). EVOLUTIONARY ECOLOGY OF INSECT IMMUNE DEFENSES. *Annual Review of Entomology*, 50(1), 529–551. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>
- Shah, F. A., Wang, C. S., Butt, T. M., T.M., B., C., J., & N., M. (2005). Nutrition influences growth and

- virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 259–266. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. <http://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Slepneva, I. A., Komarov, D. A., Glupov, V. V., Serebrov, V. V., & Khramtsov, V. V. (2003). Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleriamellonella* larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(1), 188–191. [http://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02766-3](http://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02766-3)
- Talekar, N. S., & Shelton, A. M. (1993). Biology, Ecology, and Management of the Diamondback Moth. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 275–301. <http://doi.org/10.1146/annurev.en.38.010193.001423>
- Tanji, T., Hu, X., Weber, A. N. R., & Ip, Y. T. (2007). Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 27(12), 4578–88. <http://doi.org/10.1128/MCB.01814-06>
- Tarocco, F., Lecuona, R. E., Couto, A. S., & Arcas, J. A. (2005). Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 481–488. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-1901-x>
- Tefera, T., & Pringle, K. . (2003). Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2), 90–95. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2003.08.001>
- Tlecuítl Beristain, S. (2010). *Producción de conidios de Metarhizium anisopliae en cultivados con concentraciones modificadas de O2 y CO2*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Tlecuítl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., & Loera, O. (2010). Medium Selection and Effect of Higher Oxygen Concentration Pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* Conidial Production and Quality. *Mycopathologia*, 169(5), 387–394.

<http://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>

- TM Butt, C. Wang, FA Shah, R. H. (2006). Degeneration of entomogenous fungi. *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*, 2, 213–226.
- Toegel, S., Salar-Behzadi, S., Horaczek-Clausen, A., & Viernstein, H. (2010). Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 16–23. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.004>
- Valdés-Barrón, M., Bonifaz-Alfonzo, R., Riveros-Rosas, D., Velasco-Herreora, V., Estévez-Pérez, H., & Peláez-Chávez, J. C. (2013). UVB solar radiation climatology for Mexico. *Geofísica Internacional*, 52(1), 31–42. [http://doi.org/10.1016/S0016-7169\(13\)71460-0](http://doi.org/10.1016/S0016-7169(13)71460-0)
- Valero-Jiménez, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J. M., & van Kan, J. A. L. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 41–49. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>
- Vandenberg, J. D., & Cantone, F. A. (2004). Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(1), 40–45. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.004>
- Varela, A., & Morales, E. (1996). Characterization of Some *Beauveria bassiana* isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(2), 147–152. <http://doi.org/10.1006/jipa.1996.0022>
- Walters, J. B., & Ratcliffe, N. A. (1983). Studies on the in vivo cellular reactions of insects: Fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules. *Journal of Insect Physiology*, 29(5), 417–424. [http://doi.org/10.1016/0022-1910\(83\)90069-0](http://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90069-0)
- Wanchoo, A., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2009). Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155(9), 3121–3133. <http://doi.org/10.1099/mic.0.029157-0>
- Wang, C., & St Leger, R. J. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with

- blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*, 6(5), 808–16. <http://doi.org/10.1128/EC.00409-06>
- Wang, N., Yoshida, Y., & Hasunuma, K. (2006). Loss of Catalase-1 (Cat-1) results in decreased conidial viability enhanced by exposure to light in *Neurospora crassa*. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(1), 13–22. <http://doi.org/10.1007/s00438-006-0170-4>
- Wang, Y.-B., Yang, Z.-H., Yu, J.-J., Zhang, Y.-A., Xue, J.-J., Li, Z., ... Sung, C.-K. (2013). Comparison between conidia and blastospores of *Esteya vermicola*, an endoparasitic fungus of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2429–2436. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1433-y>
- Wang, Z.-L., Zhang, L.-B., Ying, S.-H., & Feng, M.-G. (2013). Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environmental Microbiology*, 15(2), 409–418. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02848.x>
- Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., & Korte, D. W. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, 184(2), 193–199. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90668-Y](http://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90668-Y)
- Whitten, M. M. ., & Ratcliffe, N. A. (1999). In vitro superoxide activity in the haemolymph of the West Indian leaf cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Journal of Insect Physiology*, 45(7), 667–675. [http://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00039-6](http://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00039-6)
- Xia, Y., Clarkson, J. ., & Charnley, A. . (2002). Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(3), 139–147. [http://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00105-2](http://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00105-2)
- Xie, X.-Q., Li, F., Ying, S.-H., Feng, M.-G., & Nithipatikom, K. (2012). Additive Contributions of Two Manganese-Cored Superoxide Dismutases (MnSODs) to Antioxidation, UV Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE*, 7(1), e30298. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030298>
- Xie, X.-Q., Wang, J., Huang, B.-F., Ying, S.-H., & Feng, M.-G. (2010). A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when

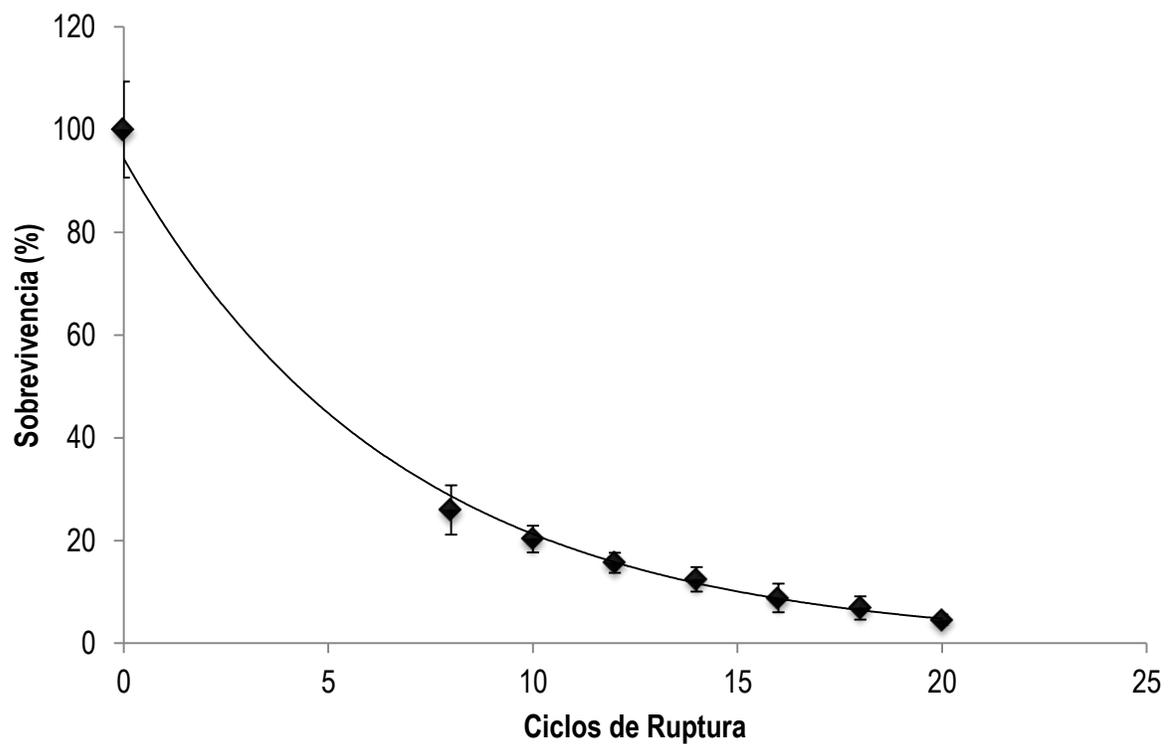
- overexpressed in the fungal pathogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1543–1553. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2437-2>
- Yang, H., al., et, & Förstermann, U. (2004). Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res.*, 95(6), 1075–1081. <http://doi.org/doi:10.1016/j.tips.2013.03.007>
- Yassine, H., Kamareddine, L., Osta, M. A., Muller, H., & Richman, A. (2012). The Mosquito Melanization Response Is Implicated in Defense against the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1003029. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003029>
- Ypsilos, I. K., & Magan, N. (2005). Characterisation of optimum cultural environmental conditions for the production of high numbers of *Metarhizium anisopliae* blastospores with enhanced ecological fitness. *Biocontrol Science and Technology*, 15(7), 683–699. <http://doi.org/10.1080/09583150500136774>
- Zalucki, M. P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L., Furlong, M. J., ... M., R. P. (2012). Estimating the Economic Cost of One of the World's Major Insect Pests, &l&gt;Plutella xylostella&l&gt; (Lepidoptera: Plutellidae): Just How Long Is a Piece of String? *Journal of Economic Entomology*, 105(4), 1115–1129. <http://doi.org/10.1603/EC12107>

## ANEXO I

### DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RUPTURA DE CÉLULAS

Esta prueba se realizó para determinar el número de ciclos necesarios para garantizar el 95 % de ruptura celular.

Se cosecharon conidios de la cepa *Isaria fumosorosea* 3302 cultivados bajo una AN, la suspensión de conidios se estandarizó a  $1 \times 10^9$  con/mL, de esta suspensión se agregó 1 mL a tubos Mini-bead de 2 mL con 500 mg de perlas de vidrio, y se sometieron a diferentes ciclos de ruptura por triplicado (8, 10, 12, 14, 18 y 20) en el disruptor de células (Mini-bedbeater 16, Biospec Products); posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para sembrar 300 conidios en una caja Petri con medio ADS y se determinó la sobrevivencia de estos conidios.



## ANEXO II

## PRIMERS Y SONDAS UTILIZADAS PARA qPCR

Las secuencias de los primers y sondas utilizadas en este estudio se muestran a continuación:

Gen	Oligo	Secuencia
<b>catA</b>	Primer Forward	5'-CGAGGAGGACAGATTTGAGTTT-3'
	Primer Reverse	5'-GCTCCGTCTCGGTGAAATAC-3'
	Sonda	5'-/56-FAM/CTACATTGG/ZEN/CGAGCTGGAGCTGAA/3IABkFQ/-3
<b><i>βTub</i></b>	Primer Forward	5'-GCTTCTGACCTCCGTAAC-3'
	Primer Reverse	5'-TCCTCAACCTCCTTCATG-3'
	Sonda	5'-/56-FAM/ACCTGACCT/ZEN/GCTCTGCCATT/3IABkFQ/-3

**Tabla 3.-** Secuencias de los primers y sondas para *catA* y *Btub*

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



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00242

Matrícula: 2153804232

PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE  
DOS CEPAS DE *Isaria* EN DOS  
TIPOS DE ATMÓSFERA RELACIÓN  
DE LA CALIDAD CON LA  
RESPUESTA ANTIOXIDANTE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD

31 AGO 2017

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 29 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ  
DR. PAUL MISAEAL GARZA LOPEZ  
DR. NOHEMI GARCIA ORTIZ  
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

Bajo la Presidencia del primero 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:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA  
DE: GERARDO SUAREZ VERGEL

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

  
DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ

VOCAL

  
DR. PAUL MISAEAL GARZA LOPEZ

VOCAL

  
DR. NOHEMI GARCIA ORTIZ

SECRETARIO

  
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA  
MARTINEZ

Ciudad de México a 29 de agosto de 2017

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

**“Producción de conidios de dos cepas de *Isaria* en dos tipos de atmósfera: relación de la calidad con la respuesta antioxidante”**

que presentó:

**Gerardo Suárez Vergel**

**Comité Tutorial:**

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

Asesor: Dr. Paul Misael Garza López-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

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

Jurado:

Presidente: Dr. Armando Mejía Álvarez  \_\_\_\_\_

Secretario: Dr. Misael Garza López  \_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Francisco Figueroa Martínez  \_\_\_\_\_

Vocal: Dra. Nohemi García Ortiz  \_\_\_\_\_