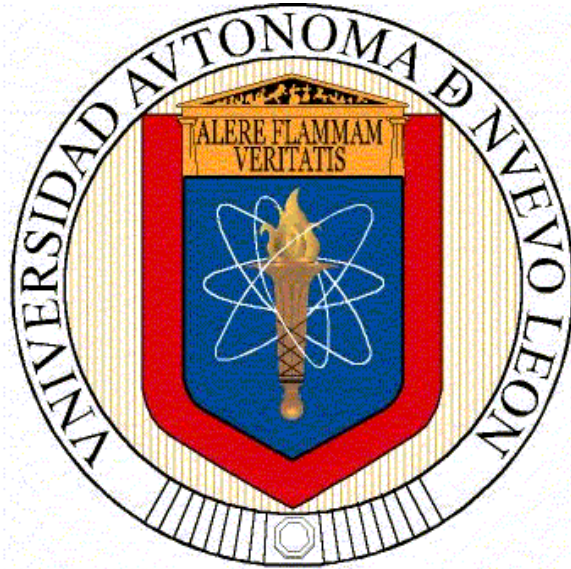


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**FACTORES NUTRICIONALES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA
DE *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN CONTRA *Periplaneta americana*
L. Y LA RESPUESTA INMUNE DEL INSECTO**

POR:

Q.B.P. JUAN MANUEL BALLESTEROS TORRES

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

Mayo 2013

**FACTORES NUTRICIONALES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA
DE *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN CONTRA *Periplaneta americana*
L. Y LA RESPUESTA INMUNE DEL INSECTO**

COMITÉ DE TESIS

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario

Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas
Vocal

Dr. Raúl Torres Zapata
Vocal

Dr. Ramiro Quintanilla Licea
Vocal

Dra. Gabriela Damas Buenrostro
Asesor Externo

Tabla de contenido

Resumen	5
Abstract	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
4. ANTECEDENTES	10
4.1 <i>Beauveria bassiana</i> como agente de control biológico	10
4.1.1 Adhesión:	12
4.1.2 Penetración:	13
4.1.3 Invasión:	14
4.2 Medios de cultivo y virulencia de <i>B. bassiana</i>	15
4.2.1. <i>Enzimas proteolíticas</i>	15
4.2.1.1 Medios de cultivo	15
4.2.1.2 Proteasas Pr1 y Pr 2	16
4.2.1.3 Quitinasas	18
4.3 Características Generales de <i>Periplaneta americana</i> L.	19
4.3.1 Ciclo de vida de <i>Periplaneta americana</i>	19
4.3.1.1 Etapa de huevo (Ooteca):	19
4.3.1.2 Estadíos ninfales:	20
4.3.1.2 Insecto adulto:	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS:	22
5.1 Colonia de <i>Periplaneta americana</i>	22
5.2 Fuentes de los aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> evaluados	22
5.3 Fermentación en medio líquido	23
5.3.1.1 Actividad de los aislamientos durante el crecimiento	24
5.3.1.2 Porcentaje de germinación de conidios al final de la fermentación	24
5.3.1.3 Viabilidad de los aislamientos al final de la fermentación	25
5.4. Producción de enzimas degradadoras de la cutícula de insectos	25
5.4.1 Producción de quitinasa	25
5.4.2 Producción de la proteasa Pr1	26
5.4.3 Producción de la proteasa Pr2	27

5.5 Actividad insecticida	27
5.6 Actividad de Fenoloxidasa (PO)	28
5.7 Análisis estadístico	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Actividad y viabilidad de aislamientos de <i>B. bassiana</i> en medio con ácido bórico	30
6.1.1 Ensayos de Actividad por MTT	30
6.1.2 Ensayos de viabilidad: Cuenta viable en placa y porcentaje de germinación.	33
6.2 Producción de enzimas degradadoras de la cutícula de insectos.....	34
6.2.1 Producción total de enzimas hidrolíticas	35
6.2.1.1 Producción de NAGasa (Quitinasa).....	35
6.2.1.2 Producción de la proteasa Pr1	38
6.2.3 Producción de la proteasa Pr2	40
6.3 Actividad insecticida contra <i>P. americana</i>	43
6.4 Actividad de fenoloxidasa (PO)	44
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	52
9. REFERENCIAS	53

Resumen

La cucaracha urbana *P. americana* es considerada como una plaga importante debido a su importancia como índice de higiene, además de ser un importante vector de microorganismos causantes de enfermedades al hombre. Una alternativa para su control es por medio de microorganismos entomopatógenos. Entre estos, algunas cepas del hongo *Beauveria bassiana* han demostrado ser efectivas en el control de esta plaga, las cuales se pueden incrementar su virulencia al crecer en medios de cultivo específicos, aunque su efectividad se puede reducir al activarse la fenoloxidasa como respuesta inmune humoral innata del insecto. El objetivo del presente estudio fue estudiar la efectividad del hongo contra la respuesta inmune del insecto. Para lograrlo, se realizó una fermentación durante 13 días de los aislamientos C1, C4 y C6 de *B. bassiana*, en medio líquido Sabouraud (MLS), sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB) como variables; así mismo, se midió la actividad celular y la producción de enzimas degradadoras de la cutícula (NAGasa, Pr1 y Pr2) durante el proceso, y al final del mismo se determinó el número de conidios, su porcentaje de germinación y su actividad insecticida contra ninfas tardías, hembras y machos (tratamientos). Además se evaluó la activación de fenoloxidasa entre insectos expuestos y no expuestos al sobrenadante, donde están presentes NAGasa, Pr1 y Pr2. Los resultados de actividad celular mostraron valores significativamente menores en los aislamientos C1 y C4 creciendo en MLS/AB, con valores de A_{570nm} de 2.49 y 1.76 ($p = 0.001$) para C1 y de 2.13 y 1.53 ($p = 0.007$) para C4 en MLS y MLS/AB, respectivamente. Los resultados de conteo de conidios mostraron diferencias entre todos los aislamientos creciendo en ambos medios, donde C6 en MLS/AB fue menor y C4 fue mayor, con $7.6 \pm 1.2 \times 10^7$ UFC/mL vs $0.46 \pm 0.12 \times 10^7$ UFC/mL para C6, ambos en MLS/AB. Los valores extremos (más alto y bajo) de germinación de conidios se observaron en los aislamientos C6 (97.66 ± 2.08) y C1 (94.66 ± 0.58), respectivamente, ambos en MLS. Al evaluar la producción de enzimas degradadoras de cutícula NAGasa, Pr1 y Pr2, C4 produjo más NAGasa y Pr1 en MLS/AB comparado con MLS, con valores de 2.89 vs 2.37 ($p < 0.001$) y 8.14 vs 6.46 ($p = 0.030$), respectivamente. No se observaron diferencias en la producción de Pr2. Tal y como lo esperado, el aislamiento C1 mostró una baja mortalidad (máxima del 25%). Los insectos expuestos al sobrenadante tuvieron una significativamente mayor actividad fenoloxidasa comparados con los no expuestos, dando valores de significancia entre hembras de $p < 0.001$, entre ninfas de $p = 0.002$ y entre machos de $p = 0.004$. En base a los resultados concluimos que el medio de cultivo MLS induce la producción de NAGasa y Pr1 de *B. bassiana*, y que la adición de ácido bórico reduce la actividad celular del entomopatógeno, pero no incrementa la actividad insecticida del aislamiento C1 contra *P. americana*; además de que las diferencias en la actividad fenoloxidasa indican una respuesta inmune innata humoral. Nuestros resultados demuestran como las cucarachas se reponen y sobreviven a la exposición de enzimas degradadoras de cutícula producidas por el aislamiento C1 gracias a la activación de la respuesta inmune mediada por fenoloxidasa.

Abstract

The urban cockroach *P. americana* is considered a major pest due to its importance as hygiene indicator and an important vector of disease-causing microorganisms to man. An alternative control is by entomopathogenic microorganisms. Among these, some strains of the fungus *Beauveria bassiana* have proven being effective in controlling this pest. *B. bassiana* could increase its virulence if grow in specific culture media. Nevertheless, its efficacy could be reduced by the insect innate immune response activation. The objective of the present study was to evaluate the fungus virulence versus the insect phenoloxidase activation as humoral immune response. Three *B. bassiana* isolates: C1, C4 and C6 (treatments) Isolated were grown during 13 days of fermentation in Sabouraud liquid medium (MLS) plain or with boric acid (MLS/AB) (variables). Out of these treatments and variables, cellular activity was measured and the production of cuticle degrading enzymes (NAGase, Pr1 and Pr2) during the process, and at the end of it, the number of conidia, germination percentage and their insecticidal activity against late nymphs, females and males was determined. We also evaluated the innate immune response (phenoloxidase activity) between exposed and unexposed to the supernatant, which NAGase, Pr1 and Pr2 were present. Cellular activity results showed significantly lower values in C1 and C4 isolates growing in MLS/AB, with A570nm values of 2.49 and 1.76 ($p = 0.001$) for C1 and 2.13 and 1.53 ($p = 0.007$) for C4 in MLS and MLS/AB, respectively. The conidia counting results showed differences between all isolates growing in both media, where C6 in MLS/AB showed lower and C4 showed the highest number, with $7.6 \pm 1.2 \times 10^7$ CFU/mL vs $0.46 \pm 0.12 \times 10^7$ CFU/mL for C6, both in MLS/AB. The opposite germination of conidia values (higher and lower) were observed within isolates C6 (97.66 ± 2.08) and C1 (94.66 ± 0.58), respectively, both in MLS. The production of cuticle degrading enzymes (NAGase, Pr1 and Pr2) results showed that C4 produced more NAGase and Pr1 while growing in MLS/AB compared with MLS, with values of 2.89 vs. 2.37 ($p < 0.001$) and 8.14 vs 6.46 ($p = 0.030$), respectively. No differences were observed in the production of Pr2. As expected, the isolation C1 showed a low mortality (25% maximum). Insects exposed to culture supernatant showed a significantly greater phenoloxidase activity compared to the unexposed insects, giving values of significance within females ($p < 0.001$), nymphs ($p = 0.002$) and males ($p = 0.004$). Based on the results we conclude that the MLS culture medium induces NAGase and Pr1 production by *B. bassiana*, and that the addition of boric acid reduces entomopathogenic cell activity, but does not increase insecticidal activity by the C1 isolate against *P. americana*. The differences in phenoloxidase activity indicate a humoral innate immune response. Our results demonstrate that cockroaches survive exposure to cuticle degrading enzymes produced by C1 isolate thanks to the activation of the immune response mediated by phenoloxidase.

1. INTRODUCCIÓN

La utilización del manejo integral de plagas es un conjunto de técnicas (físicas, químicas, biológicas, genéticas y/o culturales) que permiten el control en una población de insectos plaga. Donde el control biológico es la utilización de organismos y/o componentes de los mismos con capacidad para controlar a otros organismos. Dicha técnica se ha desarrollado con el propósito de reducir costos de producción de insecticidas, evitar daños al ambiente y al ser humano; siendo organismos como bacterias, hongos, nematodos y virus los más utilizados en la mayoría de los casos (Shapiro-Ilan *et al.*, 2011).

Beauveria bassiana (Hypocreales, Ascomycotina), conocido como muscardina blanca, es uno de los entomopatógenos más ampliamente utilizados en el control de plagas agrícolas, urbanas, forestales y de ambientes acuáticos. Se encuentra presente en el suelo, y posee la capacidad de infectar a un amplio rango de hospederos (Bidochka *et al.*, 1987; Safavi, 2012). Existen pocos estudios enfocados a la relación entre el crecimiento y la virulencia del hongo, así como los componentes de medios de cultivo diseñados para la obtención de un alto crecimiento, virulencia (producción de enzimas y metabolitos secundarios) y rendimiento de propágulos, donde incluyan la combinación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, para potenciar el efecto insecticida (Safavi *et al.*, 2007). El uso de cultivos líquidos provee ventajas para el proceso de crecimiento. Una de éstas es que los parámetros como oxígeno, pH y nivel de nutrientes son sencillos de monitorear, los cuales son factores cruciales para el desarrollo de estructuras como blastosporas, agregación y fragmentación micelial, así como para la obtención de altos rendimientos en la producción de propágulos (Pham *et al.*, 2009). La cantidad óptima de fuentes de carbono y nitrógeno, se ha observado que además de definir las estructuras producidas, influyen en la producción de enzimas participantes en el proceso infeccioso (proteasas, lipasas, quitinasas), las cuales son de gran importancia para la efectividad y éxito del control biológico (Ali *et al.*, 2010).

Los principales componentes de la cutícula del insecto son: quitina, proteínas y lípidos. Bajo este contexto, las quitinasas (NAGasa), enzimas ligadas a quimioelastasas (Pr1) y tripsina (Pr2) se consideran enzimas determinantes en la virulencia de hongos entomopatógenos, como *B. bassiana* y *Metarhizum anisoplie* (Metsch.). Estas enzimas están implicadas en la germinación y formación del apresorio de los conidios. Se ha

demostrado que añadiendo fuentes de carbono y nitrógeno al Agar Dextrosa Sabouroud (SDA) se observa una mayor producción de Pr1 y Pr2 que la producción de NAGasa o esterasas (Qazi y Khachatourians, 2008; Castrejón-Antonio *et al.*, 2012).

Periplaneta americana L. es un organismo cosmopolita perteneciente al orden *Blattodea*, familia *Blattidae*, importante por su habilidad para habitar una amplia gama de ambientes, así como de ser un agente contaminante y transmisor mecánico de enfermedades infecciosas (Ponce *et al.*, 2005). Se le considera un animal cosmopolita, que se encuentra presente en edificaciones urbanas; situación que ha llevado a la búsqueda de alternativas que cumplan con el objetivo de disminuir y controlar la población del insecto, sin dañar al medio ambiente y la salud (Mariño–Pedraza, 2011). Uno de los compuestos químicos inorgánicos que se ha empleado en cebos y demás productos para el control de esta plaga lo representa el ácido bórico (Experimentos previos, demostraron la efectividad de diferentes aislamientos de *B. bassiana* contra diferentes fases del ciclo de vida de *P. americana* [Damas, 2012]).

Por otro lado, se ha observado que algunas diferencias en la actividad insecticida de microorganismos entomopatógenos puede estar relacionada con la respuesta inmune innata del insecto, en donde, el sistema de fenoloxidasas (PO) juega un papel muy importante en la defensa y resistencia del entomopatógeno (Valadez-Lira *et al.*, 2011). A este respecto, en un trabajo previo donde se evaluaron diferentes aislamientos de *B. bassiana* contra diferentes fases del ciclo de vida de *P. americana* se encontraron diferencias significativas en la respuesta inmune humoral mediada por la actividad PO (Damas, 2012), pero no se tienen datos de como pudieran influir la actividad enzimática del hongo en la respuesta inmune del insecto. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue el de evaluar la actividad insecticida de tres aislamientos de *B. bassiana* producidos en medio líquido, con y sin ácido bórico, y analizar la producción de enzimas relacionadas a la virulencia a insectos contra diferentes estadios de crecimiento de *P. americana*; así como la respuesta inmune innata del insecto mediada por la actividad PO después de la infección por el hongo.

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad insecticida de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra la cucaracha urbana *Periplaneta americana* L., cultivado en medio líquido Sabourad con y sin ácido bórico, y su relación con la producción de enzimas hidrolíticas (Pr1, Pr2 y NAGasa); y la respuesta inmune del insecto, mediada por la actividad fenoloxidasa.

OBJETIVOS PARTICULARES

2.1 Producir mediante fermentación líquida en diferentes medios a nivel de matraz tres aislamientos de *B. bassiana* reportados como virulentos para *P. americana*.

2.2 Analizar la producción de las enzimas degradadoras de la cutícula Pr1, Pr2 y NAGasa por los aislamientos de *B. bassiana* seleccionados al crecer en los diferentes medios líquidos.

2.3 Determinar la actividad insecticida de los aislamientos producidos con los diferentes medios contra *P. americana*, mediante bioensayos por contacto directo.

2.4 Determinar si la sobrevivencia de los insectos expuestos al hongo producido en los dos medios de cultivo, está relacionada con la respuesta inmune humoral mediada por actividad de fenoloxidasa.

3. HIPÓTESIS

La actividad insecticida de *Beauveria bassiana* contra la cucaracha urbana *Periplaneta americana* L. depende del medio de cultivo donde crece, la cantidad de enzimas degradadoras de cutícula que produce en ese medio y la actividad fenoloxidasa del insecto.

4. ANTECEDENTES

4.1 *Beauveria bassiana* como agente de control biológico

B. bassiana (Hypocreales, Ascomycotina) es un organismo heterótrofo, posee células quitinizadas (presentes en todos los hongos). Parasita a otros insectos gracias a sus diferentes mecanismos, procesos físicos y químicos desarrollados durante el crecimiento fúngico. Morfológicamente, se componen de hifas septadas, que poseen una longitud de 2.5 a 25 μm de diámetro, a partir de los cuales se generan conidióforos simples (estructuras reproductivas), raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más angosto en uno de los extremos), los cuales sostienen a los conidios. Éstos, se originan de forma simpodial o acropeta, dando una forma de zigzag al raquis bajo un proceso de reproducción asexual (Barron, 2001; Carrillo, 2005; Kouassi, 2001) (Fig. 1).

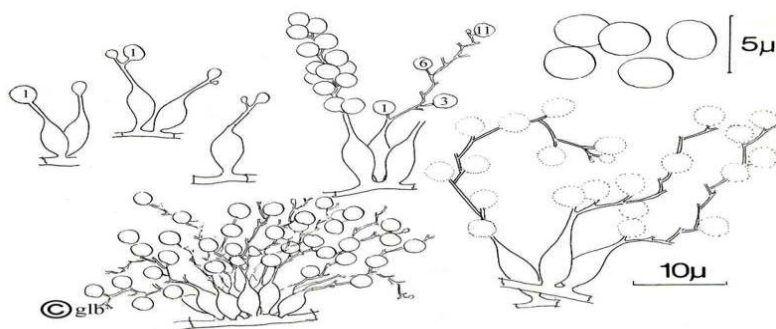


Fig. 1. Estructuras morfológicas de *Beauveria bassiana* (Barron, 2001)

B. bassiana tiene la capacidad de vivir de manera parasítica o saprofita, lo que le permite subsistir en presencia de un insecto hospedero o no. En el suelo, su forma de crecimiento es micelial, desarrollada en conjunto con la materia orgánica del suelo. Sin embargo, en el proceso de infección en insectos, el conidio germina produciendo micelio y estructuras semejantes a levaduras conocidas como blastosporas (Wong, 2003).

B. bassiana es considerado uno de los hongos con mayor potencial patogénico contra un amplio rango de insectos plaga, y es considerado una estrategia para sustituir a los compuestos químicos como herramienta para el control biológico. Este entomopatógeno muestra un gran potencial debido a su acción insecticida contra diversos grupos de insectos plaga, relacionados con el humano. Dentro del área clínica hay estudios que han demostrado la actividad reductora de poblaciones de insectos vectores de microorganismos patógenos, como *Glossina morsitans* (Westwood), conocida comúnmente como la mosca tse tse; *Phlebotomus sp.* (Psychodidae), mosquito vector del hemoflagelado *Leishmania*; así como otros vectores transmisores de la enfermedad de Chagas (*Triatoma sp.* y *Rhodnius sp.*) y de la malaria (*Anopheles spp.*) (Maniania *et al.*, 2003; Blanford *et al.*, 2005).

En el ramo de la agricultura existen plagas que han causado pérdidas millonarias en diversos cultivos; la utilización de *B. bassiana* ha sido útil para contrarrestar plagas como el lepidóptero conocido como broca del maíz (*Ostrinia nubilalis*, Hübner Mutuura & Munroe), las termitas (*Reticulitermes flavipes*, Kollar) y las hormigas (*Acromirmex sp.* y *Atta sp.*); así mismo, a la cucaracha de la papa de colorado (*Leptinotarsa decemlineata*, Say), grillos verdes del género *Nephotettix*, y a la oruga del pino *Dendrolimus sp.*, por mencionar algunos (Wong, 2003; Blanford *et al.*, 2005).

Wekesa y colaboradores en 2006 realizaron un estudio donde midieron la actividad insecticida de *B. bassiana* a diferentes concentraciones (3.0×10^6 , 1.0×10^7 y 1.0×10^8 conidios/mL) contra *Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard) en sus diferentes estadios (huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto). Los resultados obtenidos mostraron que los adultos y las deutoninfas presentaron mayor susceptibilidad a la infección fúngica que las protoninfas, en todas las concentraciones. En Brasil, un estudio realizado por Albano y colaboradores en 2009 reportaron que *B. bassiana* posee actividad insecticida contra *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva), insecto que funge como vector de la Leishmaniasis visceral. Se obtuvo como resultado una disminución de hasta el 59% ($p < 0.01$) de la producción de huevos en hembras, en comparación con el control negativo; y la longevidad de los adultos se vio reducida significativamente de 7 a 5 días ($p < 0.001$).

B. bassiana posee la propiedad de entablar relaciones endofíticas con diversas plantas, potenciando diversas propiedades que les permiten a ambos resistir efectos del medio ambiente y de otros hospederos. En estudios de invernadero contra el gorgojo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar), se realizó la infección del tejido de la planta de

plátano (*Musa* spp.) con el hongo entomopatógeno, inoculando 1.5×10^7 conidios/mL por 2 hrs mediante la inmersión de raíces. Después de 2 meses de la inoculación, se infestó la planta con larvas de *C. sordidu*. Posterior a esto, 2 semanas después de la infestación, se observó que *B. bassiana*, en su forma endofítica, redujo la supervivencia larvaria en rangos de 23.5 a 88.9%. Así mismo, el proceso endofítico proporcionó protección a la planta de plátano donde se observaron rangos de reducción del daño a la planta en 42-86.7% (Akello *et al.*, 2008).

En otros experimentos relacionados con la utilización de cepas de *B. bassiana*, Santoro y colaboradores en 2008 realizaron pruebas para el control biológico de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae), insecto plaga que ha presentado resistencia ante las diversas estrategias de control de pesticidas. Los resultados mostraron una mortalidad de al menos del 40% en 10 días.

El proceso de infección de los hongos utiliza diferentes estrategias físico-químicas, las cuales son determinantes para el éxito del entomopatógeno. *B. bassiana* posee también la capacidad de desarrollar dicho proceso infectivo, al encontrar las condiciones ambientales óptimas. En general, el proceso consta de 3 eventos:

- a) Adhesión
- b) Penetración
- c) Invasión

4.1.1 Adhesión:

Dentro de los organismos que fungen como agentes de control biológico existen géneros de hongos que tienen la capacidad de ser parásitos obligados u organismos oportunistas demostrándose que hongos de los géneros *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp., presentan en la superficie de sus conidios una naturaleza química hidrofóbica, interaccionando con la cutícula de diferentes hospederos de manera inespecífica, característica que les proporciona la particularidad de poder tener un amplio rango de hospederos (Shah y Pell, 2003). Por otra parte, zoosporas de *Lagenidium giganteum* (Lagenidiales) es un agente de control biológico específico, dicha especificidad pudiera estar dada por la composición de las superficies de los conidios y de la cutícula; con la

presencia de posibles moléculas de reconocimiento (Holder y Keyhani, 2005). Otros estudios han arrojado resultados donde la utilización de iones (Ca^{+2} y Mg^{+2}) tiene una interacción con la cutícula del insecto, promoviendo la hidrofobicidad y haciendo más propicio el ambiente para la adhesión del conidio a la cutícula (Barnes y Moore, 1997; Jeffs *et al.*, 1997; Kershaw y Talbot, 1998; Wessels, 1999)

4.1.2 Penetración:

En el proceso de penetración, los hongos entomopatógenos segregan gran variedad de enzimas líticas con el fin de debilitar la estructura de la cutícula y poder ingresar al hospedero, entre las proteínas identificadas se encuentran esterasas, proteasas, quitinasas, lipasas, lipooxigenasas (Kershaw y Talbot 1998; Monzon, 2001). Se ha demostrado que la cutícula está compuesta en su mayoría por proteínas (hasta en un 70%) por lo que, mediante estudios y técnicas de microscopía electrónica se comprobó que la acción enzimática y la presión mecánica ejercida por el elongamiento de los cuerpos hifales, son los principales mecanismos para penetrar y atravesar la cutícula del hospedero (Charnley, 2003). Sin embargo, se han realizado estudios donde los procesos de penetración pueden verse favorecidos o, en contraste, disminuidos o detenidos (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996). Se reportó la existencia mensajeros que generalmente disparaban la germinación de la espora, Dichos mensajeros eran principalmente glicoproteínas cuticulares. Por otra parte, la formación de apresorio bajo las condiciones adecuadas para la adhesión de la espora y la penetración, es de vital importancia para el proceso de infección (Monzon, 2001). Sin embargo, se han realizado estudios comparando la formación de apresorios de *M. anisopliae* aisladas de homópteros y coleópteros, el cual demostró, que no sólo se ve influenciado por la concentración de fuentes de nitrógeno y carbono; sino que los resultados siguieron que la formación de apresorios por parte de los conidios puede ser efecto de diferentes adaptaciones en los procesos de infección parasitaria, ya que las conidios obtenidas de homópteros generaban apresorios en presencia de altas concentraciones de carbono y nitrógeno, fenómeno no observado en las mismas condiciones en el caso de las cepas aisladas de coleópteros (St. Leger *et al.*, 1992).

4.1.3 Invasión:

Después de realizada la penetración del hongo, llega al torrente de la hemolinfa, que le servirá de medio para poder llegar a los demás tejidos del hospedero causándole la muerte. En el proceso de crecimiento, el hongo va formando metabolitos secundarios, los cuales presentan actividad insecticida, siendo también factores para matar el insecto. El ciclo termina cuando el hongo sobresale sobre el insecto ya muerto, formando conidios, en condiciones de niveles de humedad altos; así como, estructuras de resistencia como clamidosporas (Charnley, 2003).

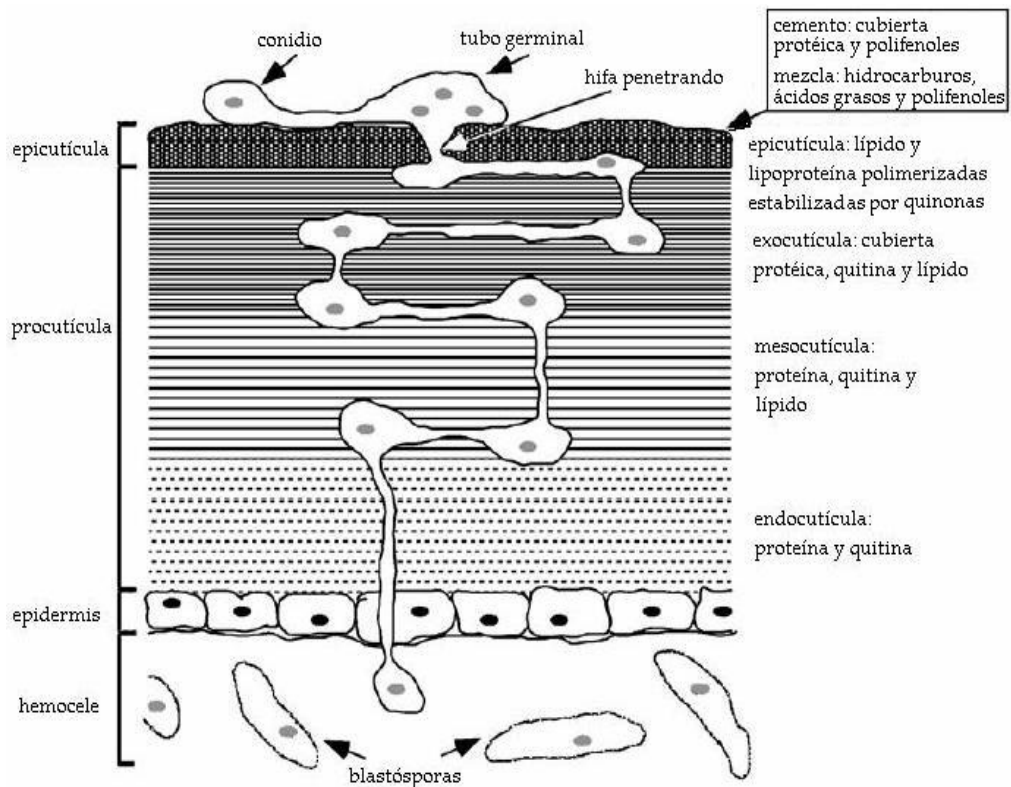


Fig.2. Estructura y composición de la cutícula del insecto y el proceso de infección de hongos entomopatógenos (Duperchy, 2003)

4.2 Medios de cultivo y virulencia de *B. bassiana*

4.2.1. Enzimas proteolíticas

4.2.1.1 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo influye principalmente sobre el desarrollo, producción de toxinas y producción de propágulos de diversos organismos. Campbell y colaboradores en 1978, utilizaron 24 aminoácidos y KNO_3 para observar los efectos de los mismos sobre el crecimiento y esporulación de 2 aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisoplie*, concluyendo que los aminoácidos con presencia de azufre indujeron una pobre producción de esporas de *M. anisopliae*; así mismo, en presencia de triptófano y alanina se presentó un mayor crecimiento y producción de conidios de *B. bassiana*. En ambos casos se observó un decremento del pH durante el proceso de crecimiento, y un incremento en el mismo, al iniciar la fase estacionaria de ambos; en cuanto a la velocidad de crecimiento, *B. bassiana* presentó en el inicio del proceso un crecimiento y un desarrollo más rápido.

Existen diversos estudios que muestran el comportamiento de los microorganismos en relación al medio en el cual se desarrollan. Ibrahim y colaboradores en 2002 realizaron un estudio con aislados diferentes de *M. anisoplie*, donde analizó la germinación del conidio, la formación de apresorio y el crecimiento micelial al someterlo a un crecimiento en diferentes medios de cultivo. Observó que la utilización de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), adicionado con un componente llamado KCl (SDAM), retardó la germinación y formación del apresorio. Sin embargo, obtuvo que los conidios producidos en medio SDAM y MM (medio mínimo) presentaron mayor patogenicidad en el momento de la infección, en comparación con los conidios generados del crecimiento SDA y agar extracto de levadura. Safavi y colaboradores en 2007 evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (rango C/N) sobre el crecimiento, producción de esporas, velocidad de germinación, virulencia y actividad Pr1 (enzima degradadora de cutícula del insecto) de *B. bassiana*. Observaron que en un medio de estrés osmótico, el número de conidios y el crecimiento colonial fueron bajos en todos los aislados; no obstante, hubo alto crecimiento radial y altos niveles de virulencia en todos ellos. En medios que contenían 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y baja concentración de C/N, se presentó actividad alta en comparación con otros medios de cultivo. Sin embargo, en algunos casos no se pudo concluir la existencia de alguna relación entre nutrientes y condición de medio con la actividad de Pr1, virulencia, producción de conidios y crecimiento de la colonia. Por su

parte, Vidal *et al.* (1998) desarrollaron un estudio para verificar el efecto de diferentes medios de cultivo sobre *B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*, observando que la producción de biomasa durante un periodo de 96 h en los medios Jackson y Catroux, la máxima producción (40-60 mg/mL) fue en las primeras 42 h, es decir, durante la fase exponencial. En el caso de los propágulos, en los medios Jackson, Catroux y Paris, se obtuvo un rendimiento máximo de $1.4-5.5 \times 10^8$ propágulos/mL después de 48-72 h de incubación. En cambio, en los medios Goral y Kondryatiev, con maltosa como fuente de carbono, la cantidad de propágulos fue menor al obtener $0.4-3.7 \times 10^7$ propágulos/mL hasta las 96 h.

En un estudio donde se compararon los patrones de crecimiento de 2 cepas de *B. bassiana*, una mutante (cepa resistente a desoxiglucosa) y una nativa, en diferentes medios que contenían ya sea salvado de trigo o quitina coloidal o exoesqueleto de saltamontes, más SDA los resultados mostraron que la cepa mutante tuvo una mayor velocidad de germinación (del 33%). Al analizar la mortalidad, en la fase de adultos y larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus), de los aislamientos bajo distintas condiciones del medio de cultivo, se observó que el 90% de mortalidad se presentó en adultos, después de 6 días de inoculación. Sin embargo, para larvas se alcanzó una mortalidad de 80% hasta los 11 días, pero sólo en conidios cultivados en SDA pero no en los demás medios, que mostraron de un 11-35%. La producción de conidios fue 10 veces más alta en la cepa mutante crecida en SDA que la cepa nativa bajo las mismas condiciones (Rodriguez-Gomez *et al.*, 2009).

La adición de sustancias a los medios de cultivo se ha realizado con el propósito de encontrar sinergias que potencien el efecto insecticida de los entomopatógenos, de manera que se alcance una alta eficiencia, sin poner en riesgo la viabilidad y virulencia del agente causal. A este respecto, Hernandez-Ramirez *et al.* (2008) reportaron una actividad sinérgica al utilizar cantidades subletales de ácido bórico en conjunto con *B. bassiana* y *M. anisoplie*, donde la adición del mismo a una relación del 3-5% al medio de cultivo incrementó la actividad insecticida y atracción de *P. americana*.

4.2.1.2 Proteasas Pr1 y Pr 2

Durante el proceso de crecimiento, los hongos tienen la capacidad de formar conidios, blastosporas y estructuras miceliales, así como moléculas que son partícipes durante la infección a insectos blanco. Diversos estudios han demostrado la presencia de proteínas quitinasas (NAGasa) y proteasas (Pr1 y Pr2), verificándose también que dichas enzimas están altamente relacionadas con la virulencia del hongo.

Las proteasas Pr1 (quimoelastasas o proteínas semejantes a subtilisina) y Pr2 (proteasas similares a tripsina) han sido descritas y caracterizadas en *M. anisoplie*, en donde la Pr1 es la principal dentro del procesos de hidrólisis de la cutícula, y Pr2, una enzima cooperador de la misma. En *B. bassiana* se ha visto que poseen funciones muy similares (Donatti *et al.*, 2008). Así mismo, se ha observado la presencia de Pr1 y Pr2 en otros hongos. Una investigación realizada por Castellanos-Moguel *et al.* (2007), mostraron que tres aislados de *P. fumosoroseus*, usado como control biológico de la mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), presentó proteínas con actividad lítica.

El proceso de infección inicia con la unión del conidio sobre la cutícula del insecto. Posteriormente, las enzimas líticas secretadas por el hongo entran en acción para desintegrar la cutícula del insecto, la cual se compone principalmente de proteínas, lípidos y quitina (Safavi *et al.*, 2007). Existen diversos estudios que demuestran la función de dichas proteínas, Pr1 y Pr2, donde Pr1 es la principal proteína presente en el proceso de infección. Sin embargo, la presencia de Pr2, se cree que tiene actividad de inducción o activación sobre Pr1, además, de actividad proteolítica (Joshi *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2005). Se ha visto que estas 2 familias de enzimas poseen un mecanismo catalítico similar, que consiste en una identificación estereoquímica de una “triada catalítica” y un “pozo oxianión”, donde una serina es un nucleófilo primario, y una histidina es donador y receptor de electrones. Se cree que una asparagina lleva a la histidina a una orientación adecuada para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico (Liu *et al.*, 2007).

Dhar y Kaur (2010) observaron la actividad de Pr1 y Pr2 en diferentes medios de cultivo, mostrando alta actividad de ambas proteínas en medios mínimos suplementados con quitina coloidal (2%) y caseína (1%). En un estudio realizado por Varéa-Pereira *et al* (2007), la producción de proteína extracelular en *B. bassiana* se vio incrementada, hasta en un 80% en las primeras 48 h, al reactivar la cepa primero en *Hypothenemus hampei*

(Ferrari), usando un medio de glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

4.2.1.3 Quitinasas

Las quitinasas, de diferentes pesos moleculares, y quitosanasas reblandecen el exoesqueleto del insecto, y las proteasas se ha observado que participan en la penetración del hongo, donde Pr2 es ayudante de Pr1 (St. Leger *et al.*, 1996b, 1998; St. Leger y Screen 2001; Charnley 2003; Campos *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). Existen gran diversidad de quitinasas en la naturaleza, y existen diversos sistemas de clasificación de las mismas. La primera clasificación de enzimas es en familias (18 y 19), donde la familia 18 posee dominios de 8 α -hélice y 8 β -láminas. En el caso de las quitinasas, pertenecientes a la familia 19, similares a lizosimas y quitosanasas, poseen dominios de α - hélices (Henrissat y Bairoch, 1993). Las enzimas quitinolíticas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces β 1-4 de N-acetilglucosamina presentes en los polímeros de quitina (también presentes en la peptidoglicana), componentes que se encuentran en la mayoría de los insectos (Arakane y Muthukrishnan, 2009). Dicho proceso se lleva a cabo en 2 pasos, una primera hidrólisis, en la cual el resultado es romper moléculas complejas a oligómeros, y una segunda hidrólisis para la formación de monómeros de N-acetilglucosamina (celobiosa). Este proceso es utilizado por hongos para el crecimiento y germinación de conidios, formación de apresorios y elongación de hifas (Ulhoa y Peberdy, 1991). Para los hongos entomopatógenos, son herramientas de vital importancia para el éxito del proceso de infección. *B. Bassiana* tiene la capacidad de secretar al medio estas proteínas; en los primeros 4 días de crecimiento, la quitinasa está presente en mayor cantidad que las proteasas, que aparecen después del día 5 de crecimiento (Leopold y Samšišáková, 1970). Se ha observado que la producción de quitinasa se vio optimizada mediante una fermentación sólida en un medio con salvado de trigo, el aislamiento a partir de sedimento marino de *B. bassiana* bajo condiciones alcalinas (pH 9.2), NaCl y quitina coloidal tuvieron un efecto potenciador, al igual que mayor cantidad de quitinasa en estructuras miceliales que en estructuras conidiales (Suresh y Chandrasekaran, 1999). La utilización de técnicas moleculares han sido útiles para la optimización y mejora en la producción de quitinasas; observándose que por medio de mutaciones inducidas mediante UV se ha logrado obtener

cepas que, en presencia de quitina coloidal en el medio de cultivo, se producen altas cantidades de quitinasas en comparación con cepas nativas de *Aphanocladium album* (Vasseur *et al.*, 1990).

4.3 Características Generales de *Periplaneta americana* L.

Según evidencias de restos fósiles, se piensa que la cucaracha americana *Periplaneta americana* L., apareció en la tierra hace aproximadamente 340 millones de años. Es originaria del continente africano, de regiones tropicales, llegando al continente americano mediante los navíos comerciales en el siglo XVII (Barbara, 2000).

Poseen una distribución cosmopolita habitando principalmente en microambientes húmedos y con abundante materia orgánica, en lugares como alcantarillas, jardines, casas habitación y edificios por lo cual se considera una plaga urbana. Poseen un amplio espectro en relación a materiales orgánicos que pueden utilizar como alimentos. Prefieren los alimentos que contengan azúcar y almidón, además de tener la capacidad de ingerir cualquier tipo de alimento que sea consumido por el ser humano. También poseen la capacidad de ingerir diferentes tipos de materiales no considerados alimentos como papel, cartón, libros, cabellos. Así mismo, diferentes tipos de tejidos como sangre fresca y seca, restos de organismos de sus misma especie, etc. (Bell y Adiyodi, 1981; Rozendaal, 1997).

4.3.1 Ciclo de vida de *Periplaneta americana*

El ciclo de vida de *P. americana* consta de 3 etapas:

4.3.1.1 Etapa de huevo (Ooteca):

Es una estructura rígida de color café oscuro. Este tipo de estructuras son expulsadas por los adultos hembra o bien pueden mantenerlos unidos a ellas hasta que la ooteca eclosione, dependiendo de la especie. Dicha estructura tiene la capacidad de almacenar hasta 15 huevos (Barbara, 2000; Bell y Adiyodi, 1981; Ponce *et al.*, 2005).



Fig. 3. Ooteca y estadios ninfales de *P. americana* (Barbara, 2000)

4.3.1.2 Estadios ninfales:

La aparición de este estadio se presenta cuando la ooteca eclosiona liberando las ninfas. Las ninfas van creciendo y mudando de cutícula. Una de las características principales es que durante todo el período del estadio ninfal no hay una diferenciación sexual en el insecto (Barbara, 2000).

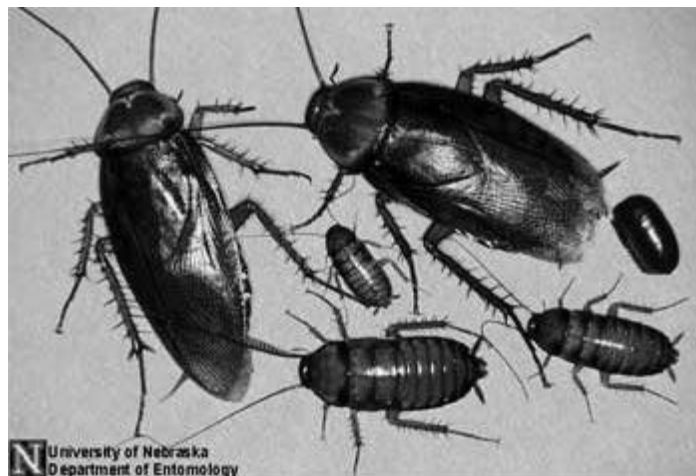


Fig. 4. Etapas de desarrollo de *P. americana* (Perrot y Miller, 2004)

4.3.1.2 Insecto adulto:

En esta etapa del desarrollo de *P. americana* se puede observar una diferenciación entre machos y hembras, presentan alas y son de un color café-rojizo. La manera de

distinguir entre una hembra y un macho es la presencia de espículas en este último, que son estructuras utilizadas para la reproducción y que se encuentran en la parte terminal del abdomen de la cucaracha. El promedio de vida de este insecto es entre 100 a 700 días, para las hembras, y de 100 a 400 días para los machos (Barbara, 2000).

Los insectos adultos presentan diversas capacidades para poder sobre vivir en los diferentes tipos de ambientes. En relación a la temperatura, tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas cercanas a los 4°C utilizando un método conocido como diapausa en el cual las cucarachas tienen la capacidad de reducir sus funciones metabólicas a niveles mínimos. Por otra parte, poseen un muy variado tipo de enzimas lo que le confiere diferentes ventajas ante situaciones adversas. Un ejemplo de esto se presenta en el desarrollo de resistencia a antibióticos, ya que las enzimas producidas por la cucaracha le ayudan a desdoblar o inactivar las estructuras químicas de un amplio número de insecticidas (Mariño–Pedraza, 2011).

Debido al hábitat donde se encuentra, sirve como transporte mecánico de agentes infecciosos como hongos, bacterias, virus, helmintos y protozoarios, convirtiéndose así en un potencial transmisor de enfermedades. La mayoría de estas enfermedades son causantes de enfermedades gastrointestinales por contaminación de alimentos por microorganismos patógenos al hombre por bacterias, como *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*; parásitos, como quistes de *Ascaris*, *Trichuris*, *E. histolytica*; hongos, pertenecientes al género *Aspergillus*; y virus como poliovirus y hepatitis A y B (Barbara, 2000; Ponce *et al.*, 2005).

5. MATERIAL Y MÉTODOS:

5.1 Colonia de *Periplaneta americana*

Se estableció una colonia de la cucaracha urbana *P. americana* a nivel de laboratorio. Se colectaron cucarachas de su hábitat natural en los jardines y patios de la UANL. Antes de su establecimiento, las cucarachas fueron puestas en cuarentena para descartar algún individuo enfermo o parasitado. Se colocaron en cajas de plástico con papel, en condiciones de 25 ± 4 °C, 65- 75% de humedad y periodos de 12 h luz-oscuridad. La dieta de los adultos y las ninfas consistió en croquetas secas de animal doméstico (Purina, Nestlé México, S.A. de C.V, México DF.) y agua. Los insectos que se desarrollaron dentro de la colonia fueron utilizados para la realización de los bioensayos. Se analizó la actividad insecticida en los siguientes estados de desarrollo de la cucaracha: ninfa, adulto macho y adulto hembra.

5.2 Fuentes de los aislamientos de *Beauveria bassiana* evaluados

Como nosotros queríamos ver si con la adición de ácido bórico en el medio de cultivo podía incrementar la virulencia de *B. bassiana* contra *P. americana*, en este trabajo se evaluaron tres cepas de *B. bassiana* (C1, C4 y C6), originalmente provenientes de insectos infectados de *P. americana* colectados en su ambiente natural en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, y reportados como altamente virulentos contra esta plaga urbana (Damas *et al.*, 2010; Damas, 2012). Estas cepas se registraron en el *Genbank* en base a estudios de la secuencia obtenida del espaciador transcrito interno ribosomal nuclear (ITS) de las cepas de *B. bassiana*, cuyas secuencias se encuentran en el número de acceso del *GenBank* como KC759728.1 (para la C1), KC759730.1 (para la C4), y KC759731.1 (para la C6) (Tamez-Guerra *et al.*, 2013).

Las cepas se cultivaron en agar dextrosa papa (PDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e incubaron a 25 ± 4 °C. A partir de conidios individuales se hicieron transferencias a nuevas placas con PDA para obtener cultivos monospóricos, según lo descrito por Choi *et al.* (1999). A partir del cultivo monospórico, y con fines de preservación, del cultivo en placa

se tomaron submuestras de 1-mm² y de éstas se transfirieron de 4-5 a viales de vidrio estériles de 1-mL adicionados con 0.4 mL de glicerol al 20% y se almacenaron a -20°C ± 4°C hasta su uso. Se usó un vial nuevo para cada bioensayo, asegurando así que no hubieran cambios genéticos del hongo a causa de resiembras.

5.3 Fermentación en medio líquido

Se evaluó el método de producción de *B. bassiana* mediante fermentación en cultivo líquido de los aislados seleccionados. El medio de cultivo seleccionado contiene medio líquido Saboraud (MLS), 1% de extracto de levadura como fuente de nitrógeno sin y con ácido bórico (AB) al 1% (MLS/AB); seleccionados previamente de acuerdo a su bajo costo y alto rendimiento, además de mantener la efectividad del entomopatógeno (Churchill, 1982; Damas, 2012).

Se realizó una fermentación a nivel de matraz de los aislamientos 1, 4 y 6 del hongo *B. bassiana*, donde se inocularon 1-9 conidios/mL de cada aislamiento en los medios MLS y MLS/AB. Posteriormente, se colocaron en agitación constante a 150 rpm, a temperatura ambiente (25 ±3°C) durante 13 días, establecido en base a los resultados observados por Damas (2012). Los fermentados se utilizaron para la realización de los ensayos establecidos en el presente trabajo. Cada bioensayo se realizó por triplicado. Para medir viabilidad y germinación de conidios, sólo una muestra se analizó al final del periodo de crecimiento, quedando como tratamientos los tres aislamientos, como variables los dos medios de crecimiento y las repeticiones, de las tres muestras tomadas en cada bioensayo independiente.

Para medir actividad celular y diferencias en la producción de enzimas degradadoras de la cutícula, durante la fermentación se tomaron muestras de 1-mL cada 12 h, a partir de las 72 h de fermentación, hasta completar 13 días, quedando como tratamientos los tres aislamientos, como variables dependientes los dos medios de crecimiento, como variables independientes los tiempos de muestreo y las repeticiones, de las tres muestras tomadas en cada bioensayo independiente.

5.3.1.1 Actividad de los aislamientos durante el crecimiento

La actividad celular de cada aislamiento de *B. bassiana* se determinó mediante la técnica colorimétrica de reducción del MTT, la cual es una técnica indirecta para medir la respiración celular. Este bioensayo se realizó tomando muestras de cada aislamiento creciendo en cada medio (MLS y MLS/AB), tomando lecturas cada dos días durante 13 días. Las muestras se procesaron siguiendo la metodología descrita por Gomez-Flores *et al.* (1995). El bioensayo se realizó en tres ocasiones diferentes y las lecturas se tomaron en los mismos tiempos, considerando 3 repeticiones por cada tiempo de muestreo. La presente técnica se describe a continuación: se tomó una alícuota de 500 µL de cada matraz cada 12 h, y se depositó cada muestra en viales eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se le agregaron 50 µL de MTT. Después se dejaron incubar en oscuridad, a temperatura ambiente durante 12 h. Al cumplirse las 12 h de incubación, se agregaron 375µL un buffer de lisis DMSO (dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% y dimetilformamida (DMF) al 50%; pH 4.7), y se centrifugó para obtener la sal reducida del interior de la célula. Se distribuyeron las muestras en placas de 96 pozos y se leyeron a 570 nm (multimodo DTX detector 880, Beckman Coulter Inc., Austria); el blanco colocado careció del inóculo del hongo.

5.3.1.2 Porcentaje de germinación de conidios al final de la fermentación

La prueba de germinación es una técnica ampliamente utilizada con hongos entomopatógenos. En este estudio se utilizó la técnica descrita por Aver'yanov *et al.* (2011). Primeramente, en una caja de 96 pozos de poliestireno se agregaron 100 µL de una suspensión de conidios obtenidos del cultivo de cada aislamiento de cada medio evaluado, al final del crecimiento, es decir, a los 13 días. En base a la observación y cuenta al microscopio óptico se realizaron diluciones en un rango creciente de concentración de 5×10^3 hasta 10^6 conidios/mL. Cada muestra se incubó durante 2h en oscuridad y a temperatura entre 18 a 25°C. Posteriormente se fijaron con 3 gotas de etanol por pozo. Se consideraron germinadas aquellas esporas que presenten una elongación mayor al tamaño de la spora y/o la presencia de tubo germinativo. El porcentaje de germinación se obtuvo de la observación de 100 esporas por pozo en microscopio invertido.

5.3.1.3 Viabilidad de los aislamientos al final de la fermentación

La cuenta viable de hongos se basa en el fundamento de que al crecer sobre un sustrato sólido, como los medios sugeridos para el crecimiento de hongos de agar de papa y dextrosa (PDA), o agar dextrosa Sabouraud (SDA), cada propágulo viable (conidio, blastospora o fragmento de micelio) germinará y crecerá hasta formar una colonia visible a simple vista. Por lo tanto, se utilizó esta técnica para determinar la viabilidad de los tres aislamientos de *B. bassiana* al final del proceso de fermentación en los dos diferentes medios evaluados (MLS y MLS/AB), después de 13 días de crecimiento. En base a los valores obtenidos de cuenta directa al microscopio realizado anteriormente para ajustar la cantidad de conidios por mililitro (para determinar el % de germinación) se realizaron diluciones seriadas para obtener un promedio de 30-300 UFC por caja. El bioensayo se realizó en tres ocasiones diferentes y las lecturas se tomaron en los mismos tiempos, considerando 3 repeticiones por tratamiento.

5.4. Producción de enzimas degradadoras de la cutícula de insectos

La medición de la actividad enzimática de proteasas y quitinasas presentes en los procesos infectivos ayuda a establecer un posible comportamiento de la virulencia e infectividad de diferentes especies de hongos entomopatógenos. Se realizaron comparaciones para establecer la relación entre las diferentes enzimas producidas por el hongo durante el proceso de fermentación. Dichas enzimas son importantes durante el proceso de infección por parte de *B. bassiana*.

5.4.1 Producción de quitinasa

La actividad de β -N-Acetil-glucosamidasa (NAGasa) se determinó mediante una reacción con *p*-nitrofenil- β -N-acetilglucosamina (1mg/mL) (Montesinos-Matias *et al.*, 2008). Para lograrlo, en una placa de 96 pozos se colocaron 140 μ L de buffer de citrato-

fosfato (pH 4.8), 40µL de sustrato y 20µL de extracto enzimático. Se incubó durante 10-min a 37°C. Posteriormente, para medir absorbancia a una longitud de onda de 405nm, la placa fue leída en un lector de microplacas (multimodo DTX detector 880, Beckman Coulter Inc., Austria). Se determinó la concentración de nitrofenol derivado de la reacción dividiendo la absorbancia obtenida entre el factor 11, 934 M⁻¹. La actividad enzimática se reportó como unidades por mililitro de extracto enzimático (U/mL), donde 1 unidad corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo antes mencionadas.

5.4.2 Producción de la proteasa Pr1

La proteasa Pr1 es un factor de virulencia utilizado por *B. bassiana* durante los procesos de infección contra los diferentes insectos blanco. En el presente trabajo se analizó la presencia y cantidad de dicha proteasa secretada en el medio por las diferentes cepas utilizadas (1, 4 y 6) después de un proceso de fermentación de 13 días. Para la medición de Pr1 se utilizó la técnica descrita por Qazi y Khachatourians (2008) con algunas modificaciones. El sustrato utilizado fue succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-4-nitroanalina (Sigma-Aldrich de México, México DF) a una concentración de 1-mM. En una placa de 96 pozos se colocaron 170µL de buffer Tris- HCl (pH 8), 20µL de extracto enzimático y 10µL de sustrato por pozo. La paca se dejó incubando durante 5min a 25°C y se leyó la absorbancia en un lector de placas (multimodo DTX detector 880, Beckman Coulter Inc., Austria) a una longitud de onda de 405 nm. La actividad enzimática se reportó como unidades por mililitro enzimático (U/mL), donde cada unidad corresponde a la cantidad de enzima que cataliza 1-nmol de nitroanilina por minuto bajo condiciones de ensayo. La concentración de nitroanilina liberada se determinó mediante una curva de calibración de *p*-nitroanilina comercial (Sigma-Aldrich). Se realizaron ensayos por triplicado.

5.4.3 Producción de la proteasa Pr2

En una placa de 96 pozos se realizó la técnica para la proteasa Pr2 utilizando como sustrato N-benzoil-fenilalanina-valina-arginina-*p*-nitroanilida (Sigma-Aldrich) a una concentración 1-mM (Qazi y Khachatourians, 2008). En cada pozo se colocaron 170µL de Buffer Tris-HCl pH= 8, 20µL de extracto enzimático y 10-µL de sustrato. El período de incubación fue de 10-min a 25°C. La absorbancia de cada muestra se leyó a una longitud de onda de 405nm en un lector de microplacas (multimodo DTX detector 880, Beckman Coulter Inc., Austria). Al igual que para Pr1, la actividad enzimática se reportó como unidades por mililitro de extracto enzimático. La concentración de nitroanilina liberada se determinó mediante una curva de calibración de *p*-nitroanilina comercial (Sigma-Aldrich). Cada ensayo se realizó por triplicado.

5.5 Actividad insecticida

Tal y como se mencionó antes, en un estudio anterior (Damas, 2012) se comprobó que los aislamientos C4 y C6 de *B. bassiana* eran altamente virulentos contra *P. americana*, pero no eran cepas comerciales, sino aislamientos nativos. Como nosotros queríamos ver si con el medio de cultivo se podía incrementar la virulencia del entomopatógeno y evaluar la respuesta inmune del insecto para estimar la baja mortalidad del mismo, se empleó la cepa comercial C1 (Bb-Chc-LBIH-28), proporcionadas por el CESAVEG con el fin de ver si la adición del ácido bórico realmente incrementaba la virulencia y si tenía alguna relación con la producción de enzimas degradadoras de la cutícula. Por lo mismo, la actividad insecticida de los conidios de la cepa C1 producido después de 13 días de fermentación en MLS y MLS/AB se determinó en base al porcentajes de mortalidad (LeOra, 2007). Se analizó la actividad insecticida contra hembras, machos y ninfas tardías de la cucaracha.

Las dosis utilizadas de cada tratamiento fueron: 1×10^7 , 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 conidios/mL, en MLS y MLS/AB. Además de un control negativo, donde se utilizó sólo el medio sin inocular. Se colocaron las cucarachas en refrigeración durante 20 min para su manipulación. A partir de estas dosis se expusieron las cucarachas al hongo a las cucarachas a un primer bioensayos para determinar la dosis letal media (DL₅₀), donde se aplicó de forma tópica a cada individuo inmovilizado con 100µL, 50µL, 10µL y 5µL de una

suspensión de 1.3×10^8 /mL, para aplicar las dosis de 1.3×10^7 , 6.5×10^6 , 1.3×10^6 y 6.5×10^5 conidios/mL, respectivamente. Posteriormente, se colocaron las cucarachas tratadas de cada dosis en recipientes de plástico de un litro bajo la misma condición de la colonia y se colectaron los datos de mortalidad a los 3, 5, 7, 12 y 15 días de incubación.

5.6 Actividad de Fenoloxidasa (PO)

Para determinar la influencia de enzimas degradadoras de la cutícula, se evaluó el sobrenadante del aislamiento C1 proveniente de cada medio de cultivo (MLS y MLS/AB) en un bioensayo por inmersión. Para este bioensayo, cada individuo inmovilizado se sumergió y sacó inmediatamente del sobrenadante, lo cual se repitió en un promedio de 10 ocasiones, hasta completar un periodo de un minuto. Este bioensayo se realizó contra ninfas tardías, hembras y machos. Después de esto, las cucarachas se dejaron secar y se aseguró que todas siguieran vivas. Posteriormente se colocaron en forma individual en recipientes de plástico de 400 mL bajo la misma condición de la colonia y se colectaron los datos de mortalidad a los 10 días de incubación.

La actividad de PO se determinó por espectrofotometría, midiendo el grado de formación dopacromo, con un máximo de absorción a la longitud de onda 490 nm. La actividad de PO en la hemolinfa de *P. americana* se registró después de 10 días de la exposición del sobrenadante del aislamiento C1 ya antes mencionado. Todos los individuos expuestos y vivos de los diferentes tratamientos se congelaron a -70°C hasta su uso. Se seleccionaron 3 ejemplares de la fase probada: hembras, machos y ninfas infectados; así mismo de individuos no expuestos. La hemolinfa de *P. americana* fue obtenida por la maceración de la parte abdominal de individuos congelados, se homogenizó con pistilos estériles, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10-min a temperatura ambiente para obtener una hemolinfa libre de células. A continuación, 10- μL de la hemolinfa libre de células obtenida de cada individuo se transfirió a una caja de poliestireno de 96 pozos fondo plano (5 pozos por individuo), y se agregaron 150 μL de DL-dihidroxifenilalanina (DL-DOPA) a una concentración de 10-mM a cada pocillo como sustrato por muestra. Las microplacas se incubaron en la oscuridad, y las absorbancias se leyeron a 490nm cada 15min durante 1-h, usando un lector de microplacas (multimodo DTX detector 880, Beckman Coulter Inc.,

Austria). El control (-) se realizó bajo las mismas condiciones y tiempos. La actividad de PO se define como el cambio en la densidad óptica a través del tiempo. Para fines de comparación, las ninfas tardías, los machos y las hembras de los tratamientos fueron probados por separado, evaluando insectos vivos infectados (presencia de micelio aéreo) o sin infectar. Los valores obtenidos para cada tratamiento se basan en tres repeticiones.

5.7 Análisis estadístico

Todos los tratamientos y bioensayos se realizaron por triplicado. De los datos obtenidos de los parámetros de viabilidad y mortalidad, se obtuvo la media para cada repetición, las cuales fueron analizadas mediante Pruebas de *t* de *student* para muestras relacionadas e independientes, prueba no paramétrica de Friedman y análisis de Varianzas (ANOVA multifactorial). Así como, un análisis posthoc Tukey HDS a una significancia de $P \leq 0.05$ (SPSS, 2008).

6. RESULTADOS

6.1 Actividad y viabilidad de aislamientos de *B. bassiana* en medio con ácido bórico

Para conocer si el empleo de ácido bórico como aditivo en el medio líquido de crecimiento recomendado para la producción de hongos por fermentación, tenía algún efecto en la actividad o viabilidad de los diferentes aislamientos de *B. bassiana*, se realizaron diferentes bioensayos. Los resultados se describen a continuación.

6.1.1 Ensayos de Actividad por MTT

La actividad de los aislamientos de *B. bassiana* se compararon mediante curvas de incremento de actividad durante su crecimiento en los medios sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB), mediante el método indirecto de MTT (absorbancia usando una longitud de onda de 570 nm). Las diferencias entre los resultados se analizaron usando el programa de ANOVA y Tukey *honestly significant difference* (HSD), donde las diferencias se presentaron a partir de un valor igual o menor al 5% ($p \leq 0.05$). En lugar de tres muestras, una por repetición, se tomaron un total de 6 muestras, puesto que la actividad se midió de las tres repeticiones tanto de los ensayos diseñados para medir viabilidad y germinación de conidios, como los ensayos de actividad enzimática, es decir que los resultados representan el total de 6 muestras. Los resultados de ANOVA de todas las lecturas de actividad derivada del crecimiento de propágulos fúngicos en los medios MLS y MLS/AB, mostraron valores promedios de A_{570} similares en los tres aislamientos creciendo en los dos medios ($F_{5,61} = 2.135$; $p = 0.073$), donde el valor más alto lo mostró el aislamiento C4 en MLS ($A_{570} = 1.72$). La actividad celular entre aislamientos creciendo en medio sin (MLS) y con (MLS/AB) ácido bórico mostraron valores para C1 de 1.14 y 1.12 ($p = 1.0$), C4 de 1.72 y 1.23 ($p = 0.31$) y C6 1.39 y 1.41 ($p = 0.97$), respectivamente.

No obstante, al analizar únicamente los datos obtenidos a la mitad de la fermentación al 6to día (156h) los resultados de ANOVA mostraron valores de A_{570} significativamente diferentes entre los aislamientos C1 y C4 ($F_{5,30} = 26.783$; $p < 0.001$). En

general, el aislamiento C4 mostró una actividad mayor durante la fermentación en el MLS, en comparación al C4 con MLS/AB y C1 en ambos medios. No obstante, entre C1 y C4 con el medio MLS/AB no se observó diferencia (0.90 y 0.989, respectivamente); mientras que C1 en MLS, mostró el valor más bajo ($A_{570} = 0.445$) en comparación a todos los tratamientos y medios probados (Fig. 5). Al comparar el aislamiento C6 creciendo en MLS o MLS/AB, no mostró diferencias obteniéndose valores de 1.20 y 1.30 ($p = 0.97$), respectivamente; sin embargo, el aislamiento C6 creciendo en medio MLS/AB presentó una valor mayor a C1 y C4 en este mismo medio (1.3 vs 0.90 y 0.989, respectivamente) (Fig. 5).

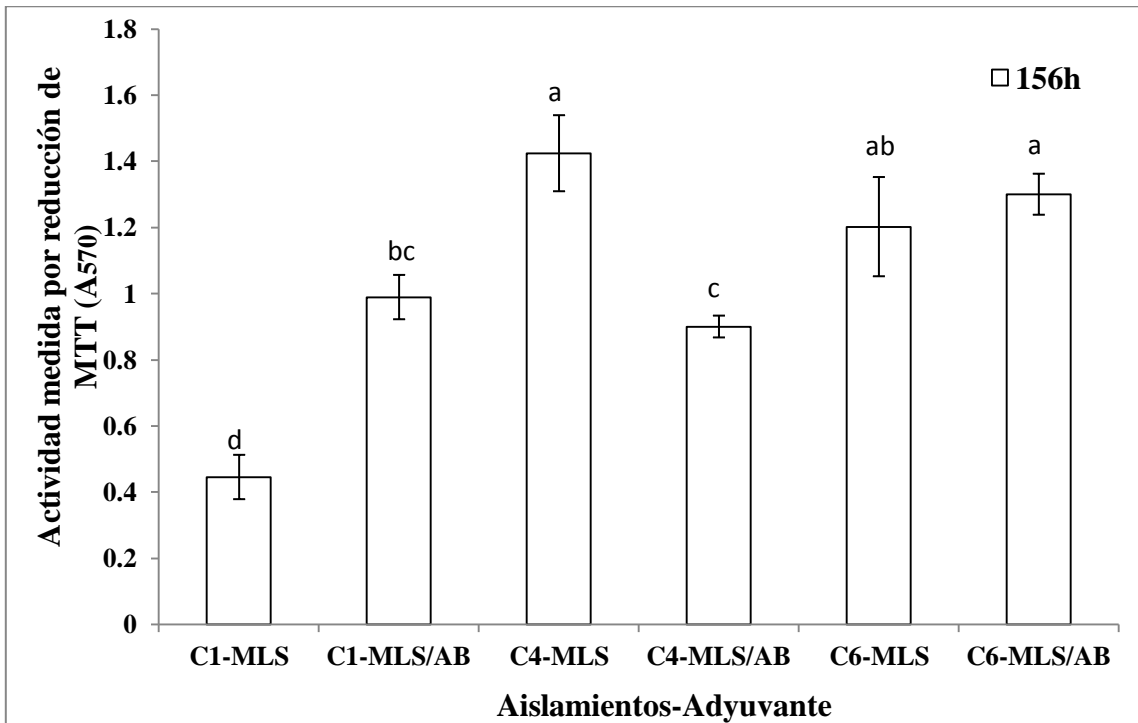


Fig. 5. Actividad celular de los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* después de 156 h creciendo en Medio Líquido Sabouraud sin adyuvante (MLS) o con ácido bórico (MLS/AB), usando el método colorimétrico de reducción del MTT (A_{570}). Las barras en cada columna indican el error estándar del promedio de 2 muestras y 3 repeticiones, mientras que las letras sobre cada columna indican los grupos, donde letras diferentes indican diferencias ($\alpha = 0.05$) mediante el análisis de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

Al analizar únicamente los datos obtenidos al final de la fermentación (312h), se observó que los aislamientos crecidos en MLS mostraron valores mayores a los MLS/AB,

excepto en el aislamiento C6, que no hubo diferencias entre ambos medios; sin embargo los tres aislamientos en MLS, no fueron diferentes significativamente. (Fig. 6). Los resultados de ANOVA mostraron valores de A_{570} significativamente diferentes ($F_{5,29}= 14.329$; $p < 0.001$) en los aislamientos C1 y C4 creciendo en medio con y sin adyuvante, donde el aislamiento C1 mostró una actividad de 2.49 y 1.76 ($p =0.001$); el aislamiento C4 una actividad de 2.13 y 1.53 ($p =0.007$); y el aislamiento C6 de 2.42 y 2.54 ($p =0.97$); creciendo en MLS y MLS/AB, respectivamente (Fig. 6).

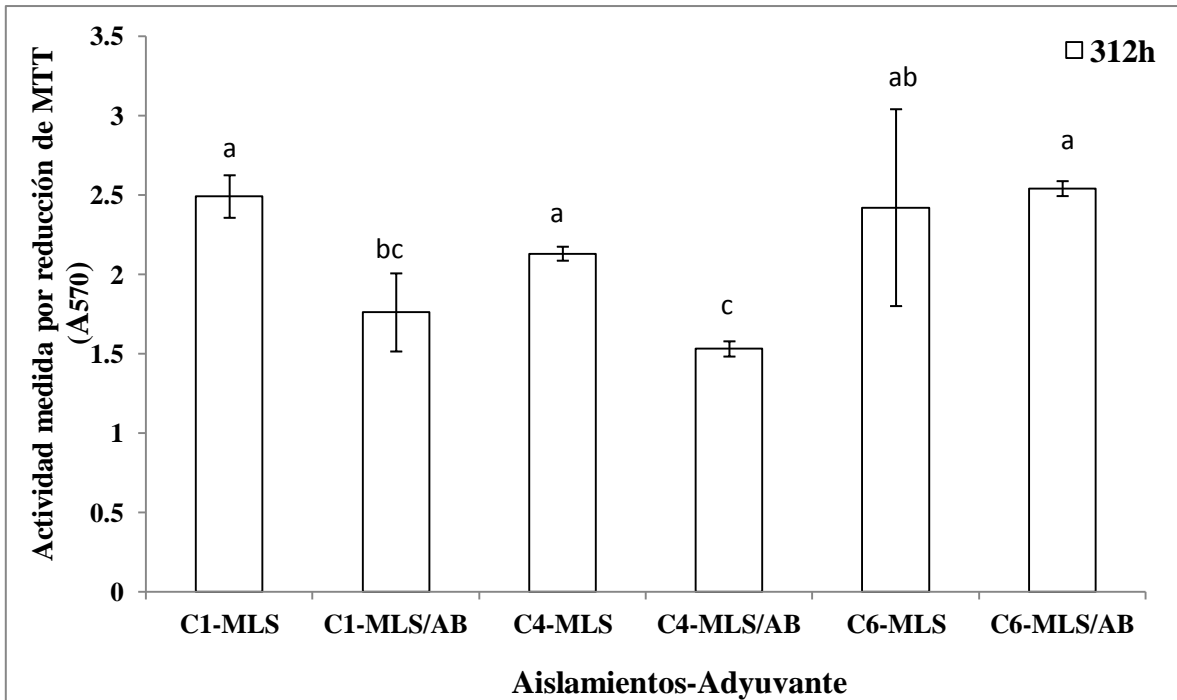


Fig. 6. Actividad celular de los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* después de 312 h creciendo en Medio Líquido Sabouraud sin adyuvante (MLS) o con ácido bórico (MLS/AB), usando el método colorimétrico de reducción del MTT (A_{570}). Las barras en cada columna indican el error estándar del promedio de 2 muestras y 3 repeticiones, mientras que las letras sobre cada columna indican los grupos, donde letras diferentes indican diferencias ($\alpha = 0.05$) mediante el análisis de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

Debido a que el aislamiento C4 mostró diferencias más significativas, se analizaron por separado los valores de actividad obtenidos hasta la mitad de la fermentación (de 0 a 156h) y de la mitad hasta el final de la fermentación (de 156 a 312h) en ambos medios. Los resultados de ANOVA mostraron valores de A_{570} significativamente diferentes ($F_{3,40}= 48.582$; $p < 0.001$), donde el aislamiento C4 no mostró diferencias en la actividad, en medio MLS o MLS/AB, al sumar todos los valores obtenidos de 0 a 156h (A_{570} de 0.367 y 0.463,

respectivamente; $p = 0.90$); pero significativamente diferentes al promediar los valores obtenidos de 156 a 312h, con valores de 1.88 y 1.30, respectivamente ($p = 0.002$) (Fig. 7).

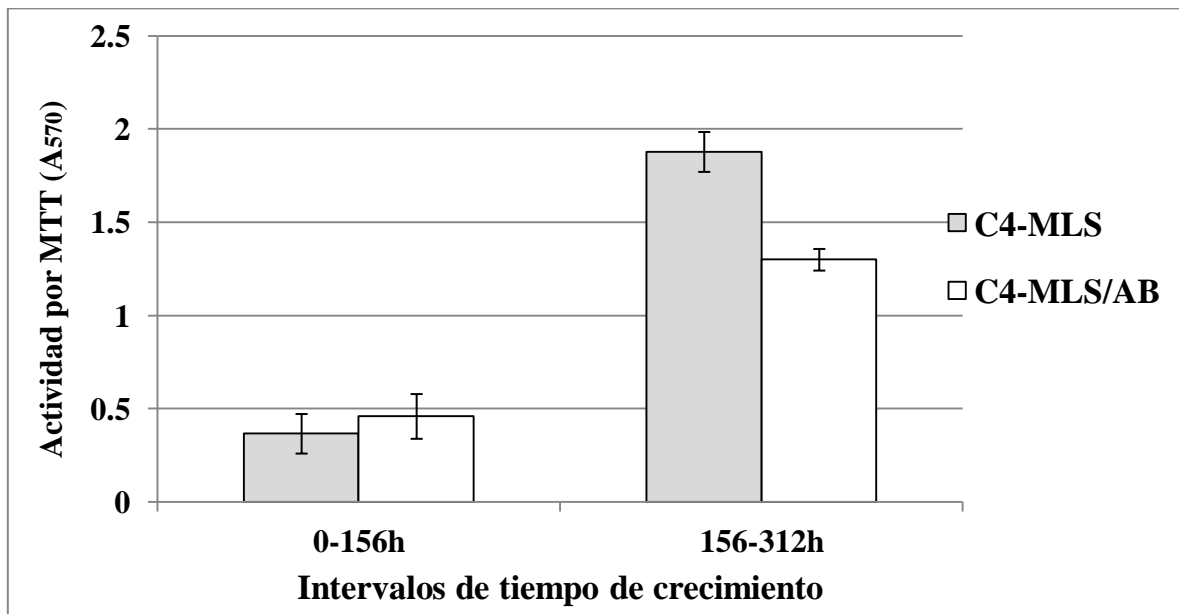


Fig. 7. Promedio de valores de actividad celular del aislamiento C4 de *Beauveria bassiana* entre las 0-156h ó 156-312 h de creciendo en Medio Líquido Sabouraud sin adyuvante (MLS) o con ácido bórico (MLS/AB), usando el método colorimétrico de reducción del MTT (A_{570}). Las barras en cada columna indican el error estándar del promedio de 4 muestras y 3 repeticiones, mientras que las letras sobre cada columna indican los grupos, donde letras diferentes indican diferencias ($\alpha = 0.05$) mediante el análisis de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

6.1.2 Ensayos de viabilidad: Cuenta viable en placa y porcentaje de germinación.

La viabilidad de los aislamientos de *B. bassiana* durante su crecimiento en los medios sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB) se evaluaron mediante la técnica de conteo indirecto conocida como cuenta viable en placa, donde cada propágulo viable es capaz de desarrollar una colonia en medio sólido, donde cada colonia representa una UFC. Para lograrlo, se tomaron muestras del cultivo después de 13 días de crecimiento y muestras de cada tratamiento se sembraron en medio de SDA. Los resultados mostraron una viabilidad mayor en los aislamientos C1 y C4 crecidos en ambos medios (MLS y MLS/AB), con valores de UFC del rango de $2-8 \times 10^7$ UFC/mL, comparados con el aislamiento C6. Este último mostró una viabilidad 5.4 veces menor de UFC durante su fermentación en MLS/AB (4.6×10^6 UFC/mL), comparada con el medio MLS (2.5×10^7

UFC/mL), mientras que las diferencias entre los otros dos aislamientos (C1 y C4) fueron de 2.5 y 2, respectivamente (Tabla 1). El porcentaje de germinación determinado fue $\geq 94\%$ en todos los aislados después de fermentados en ambos medios de cultivo, con lo cual se comprobó que el hongo continuaba viable al final del periodo de crecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Viabilidad (Unidades formadoras de colonias, UFC) y porcentaje de germinación de tres aislamientos de *Beauveria bassiana* después de su crecimiento en medio líquido Sabouraud (MLS) solo o adicionado con ácido bórico (MLS/AB), después de 13 días en agitación a 200 rpm.*

Aislamiento-medio	Viabilidad (UFC's x 10 ⁷ /mL)	% Germinación
C1-MLS	5.00 ± 0.81 bc	94.66 ± 0.58 b
C1-MLS/AB	2.00 ± 0.02 d	94.66 ± 3.05 ab
C4-MLS	3.66 ± 1.24 c	96.33 ± 2.89 ab
C4-MLS/AB	7.60 ± 1.24 a	97.00 ± 2.00 ab
C6-MLS	2.50 ± 0.50 cd	97.66 ± 2.08 a
C6-MLS/AB	0.46 ± 0.12 e	94.33 ± 2.51 ab

*Los valores representan los promedios y su desviación estándar de bioensayos realizados por triplicado. Las letras después de cada promedio indican la desviación estándar del promedio de 3 repeticiones, donde cada letra corresponde a los grupos y las letras diferentes indican diferencias, calculados por la prueba de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

6.2 Producción de enzimas degradadoras de la cutícula de insectos

Para determinar la relación entre la virulencia de los aislamientos y su producción de enzimas degradadoras de la cutícula entre los diferentes aislamientos de *B. bassiana*, en los dos medios de cultivo (MLS y MLS/AB), se determinó la actividad enzimática de las cepas de *B. bassiana* usadas (C1, C4 y C6). Las diferencias en actividad fue analizada

mediante un análisis de varianza (ANOVA, post hoc Tukey $p \leq 0.05$) y la prueba estadística no paramétrica de Friedman. Los resultados se muestran a continuación.

6.2.1 Producción total de enzimas hidrolíticas

Para observar la diferencia entre la producción de las tres enzimas degradadoras de la cutícula de insectos, Pr1, Pr2 y NAGasa, se comparó la actividad promedio durante la fermentación de los aislamientos C1, C4, y C6 en los medios de cultivo (MLS y MLS/AB) a partir del día 3 (72h) al día 11 (256h), para poder determinar si el ácido bórico adicionado mostraba cualidades como adyuvante sobre la producción de estas enzimas. La producción del total de las enzimas (NAGasa, Pr1 y Pr2) presentes en el proceso de fermentación fue analizada mediante la prueba estadística no paramétrica de Friedman.

En general, los resultados mostraron que la producción de las enzimas es significativamente diferente, ya que en el medio MLS el valor promedio de NAGasa fue de 1.00 U/mL, de Pr1 de 3.00 U/mL y de Pr2 de 2.00 U/mL; mientras que con el MLS/AB fueron para NAGasa de 1.00 U/mL, de Pr1 de 2.56 U/mL y de Pr2 de 2.44 U/mL ($p \leq 0.001$) (Fig. 8).

6.2.1.1 Producción de NAGasa (Quitinasa)

Inicialmente se analizó la producción de quitinasa (NAGasa en U/mL) en los tres aislamientos fermentados en MLS sin y con ácido bórico (MLS/AB), midiendo la actividad de la enzima por la producción de nitrofenol (nmol/min), en base a la absorbancia medida a 405nm de longitud de onda. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y *posthoc* Tukey HDS

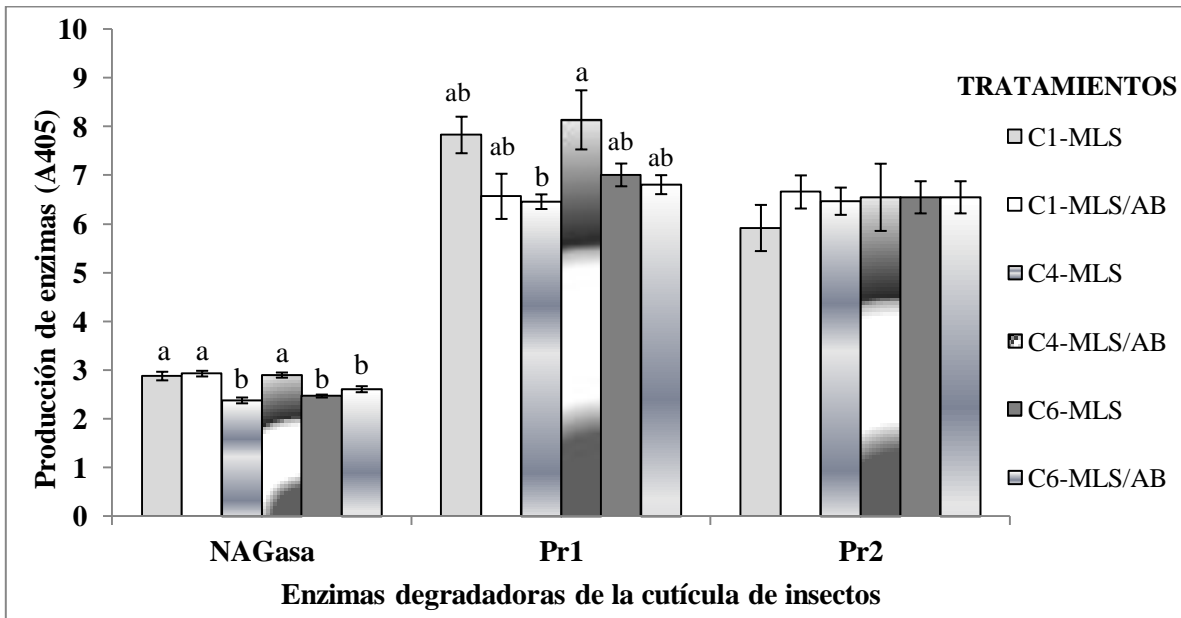


Fig. 8. Producción de NAGasa, Pr1 y Pr2 (U/mL) por los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* creciendo en los medios líquido Sabouraud sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB), a una absorbancia de 405nm. Las barras en cada tiempo de muestreo indican el error estándar del promedio de 3 repeticiones, calculados por la prueba de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

Mediante el análisis ANOVA y Tukey HDS, se observaron diferencias significativas en la producción de NAGasa ($F_{5,48} = 15.508$; $p < 0.001$), entre los aislamientos fermentados en MLS/AB y MLS, donde el aislamiento C4 produjo más NAGasa en el medio con adyuvante (MLS/AB de 2.89 U/mL) comparado con el medio sin él (MLS, 2.37 U/mL, $p < 0.001$) (Fig. 9). Los aislamientos C1 y C6 no mostraron diferencias en la producción de NAGasa entre los dos medios, donde C1 mostró valores de 2.87 y 2.93 U/mL ($p = 0.986$) y el C6 de 2.61 y 2.47 U/mL ($p = 0.986$) en MLS y MLS/AB, respectivamente (Fig. 9).

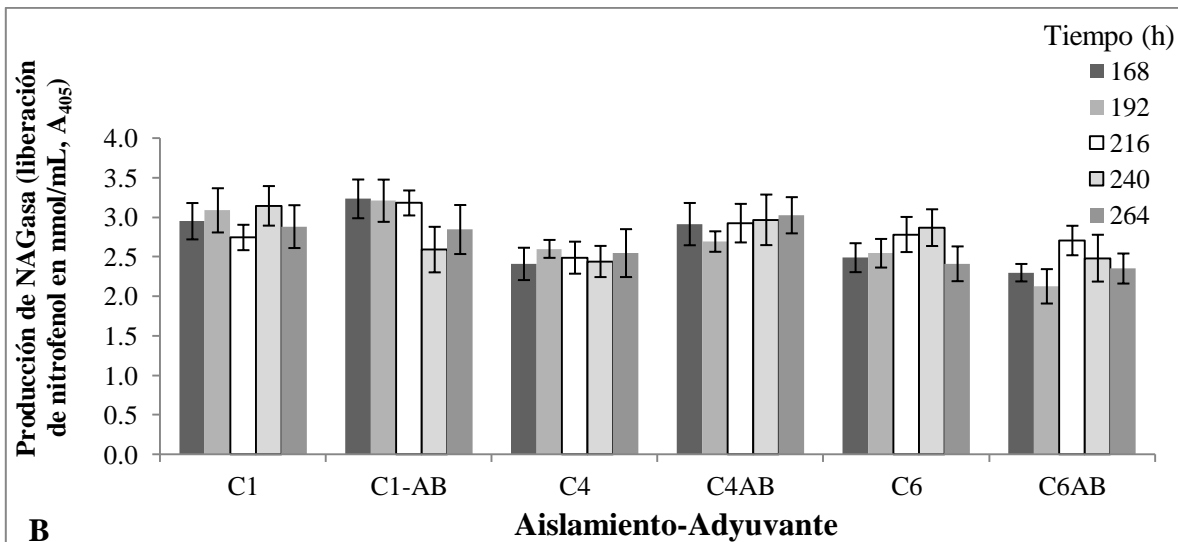
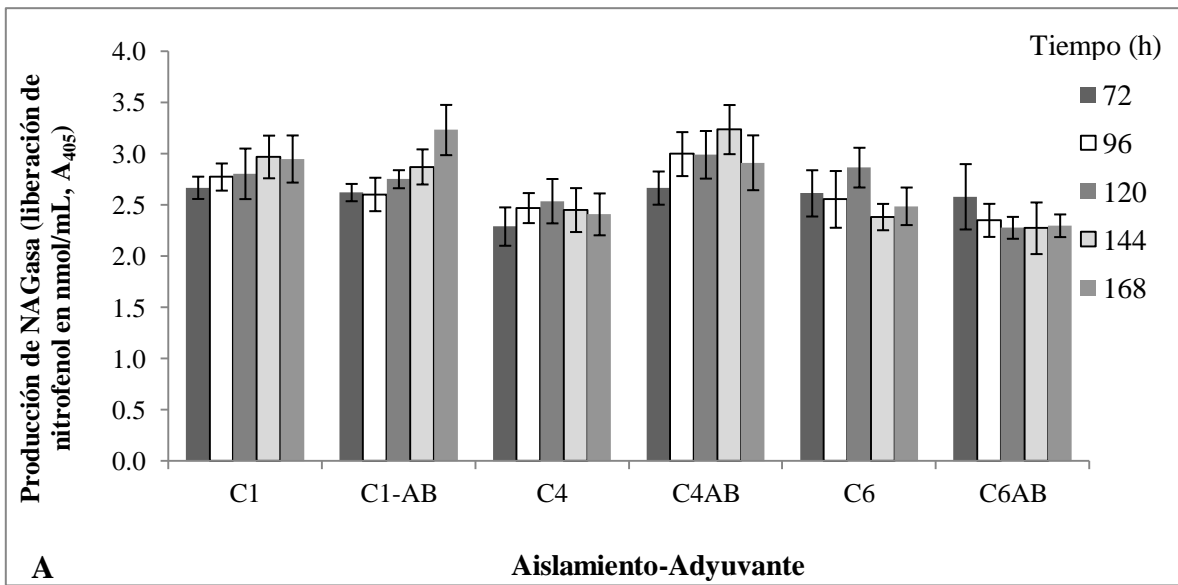


Fig. 9. Producción de NAGasa (U/mL) por los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos creciendo en medios líquido Sabouraud sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB), en base a la reducción de *p*-nitrofenil- β -N-acetilglucosamina por liberación de nitrofenol (nmol/min) a una absorbancia de 405nm. Fig. 9A), promedios de 72 a 168h; Fig. 9B), promedios de 168 a 312h. Las barras en cada tiempo de muestreo indican el error estándar del promedio de 3 repeticiones, calculados por la prueba de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

El análisis Tukey HDS ($\alpha= 0.05$) mostró dos grupos significativamente diferentes, donde en el primero quedaron el aislamiento C1 en MLS y MLS/AB (2.87 y 2.93 U/mL, respectivamente) y el aislamiento C4 en MLS/AB (2.89 U/mL), con los valores más altos; y en otro grupo el aislamiento C6 en MLS y MLS/AB (2.47 y 2.61 U/mL, respectivamente) y el aislamiento C4 en MLS (2.37 U/mL) con los valores más bajos.

Adicionalmente se evaluó la producción total de cada aislamiento en medio sin (MLS) y con adyuvante (MLS/AB) por separado, para ver las diferencias en la producción de NAGasa entre los aislamientos en un mismo medio. Los resultados obtenidos por análisis Tukey HDS mostraron diferencias significativas ($p < 0.001$), entre los aislamientos fermentados en MLS, donde el aislamiento C1 mostró mayor producción de NAGasa (2.89 U/mL) comparado con los aislamientos C4 ($p < 0.001$) y C6 ($p < 0.002$), los cuales no mostraron diferencias entre sí (C4 = 2.47 U/mL y C6 = 2.61 U/mL $p = 0.133$). De igual forma, los resultados obtenidos entre los aislamientos fermentados en MLS/AB mostraron diferencias significativas ($F_{2,24} = 19.186$; $p < 0.001$), donde el aislamiento C4 mostró mayor producción de NAGasa (2.93 U/mL) comparado con el aislamiento C6 (2.37 U/mL, $p < 0.001$), al igual que el C4 comparado con el C6 ($p < 0.001$), mientras que el C1 y C4 no mostraron diferencias entre sí ($p = 0.839$).

6.2.1.2 Producción de la proteasa Pr1

Al evaluar diferencias en la producción de Pr1 mediante el análisis ANOVA y Tukey HDS, se observaron diferencias significativas en la producción de Pr1 ($F_{5,48} = 3.382$; $p = 0.011$), entre los aislamientos fermentados en MLS/AB y MLS, donde el aislamiento C4 mostró mayor actividad Pr1 en el medio con adyuvante (MLS/AB, 8.14 U/mL) comparado con el medio sin él (MLS, 6.46 U/mL, $p = 0.030$) (Fig. 10). Los aislamientos C1 y C6 no mostraron diferencias en la producción de Pr1 entre los dos medios, donde C1 mostró valores de 7.82 y 6.57 U/mL ($p = 0.190$) y el C6 de 7.01 y 6.81 U/mL ($p = 0.645$) en MLS y MLS/AB, respectivamente (Fig. 10). De cualquier forma, el único aislamiento que mostró una tendencia significativa a incrementar la producción de Pr1 en ambos medios evaluados, conforme pasaba el tiempo, fue C1 (Fig. 11A y 11B).

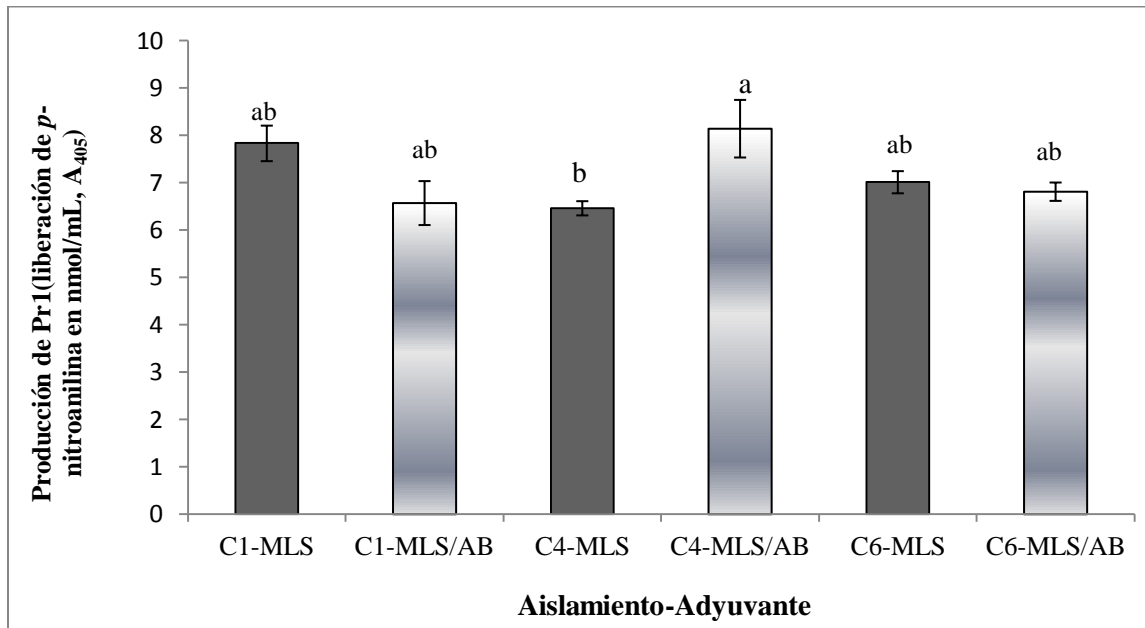


Fig 10. Producción de Pr1 (U/mL) por los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos creciendo en medios líquido Sabouraud sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB), en base a la reducción de succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-4-nitroanalina por liberación de *p*-nitroanilina (nmol/min), a una absorbancia de 405nm. Las barras indican el error estándar para el promedio de tres repeticiones, calculados por la prueba de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

El análisis Tukey HDS ($\alpha = 0.05$) mostró dos grupos significativamente diferentes, donde en el primero quedaron el aislamiento C4 en MLS/AB (8.14 U/mL), con el valor más alto; y en el extremo inferior el mismo aislamiento en MLS (6.46 U/mL) con el valor más bajo. El resto de los aislamientos/tratamientos se ubicaron en ambos grupos.

Al analizar los valores promedio de la producción total de Pr1 de cada aislamiento en medio sin (MLS) y con adyuvante (MLS/AB) por separado, los resultados del análisis Tukey HDS no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), entre los aislamientos fermentados en MLS, pero sí entre los crecidos en MLS/AB ($F_{2,24} = 4.527$; $p = 0.021$), donde el aislamiento C1 mostró mayor producción de Pr1 (7.82 U/mL) comparado con el aislamiento C4 (aunque fue por debajo del 95% de significancia, valor de 6.57 U/mL, $p = 0.051$) y el C6 (6.46 U/mL, $p = 0.032$), mientras que el C4 y C6 no mostraron diferencias entre sí ($p = 0.974$).

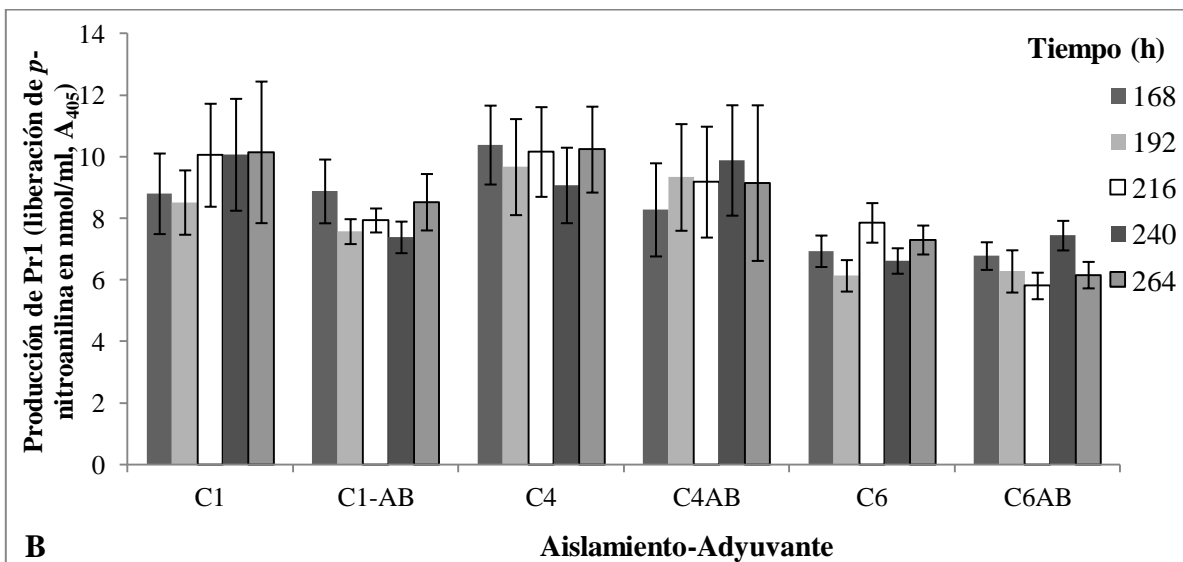
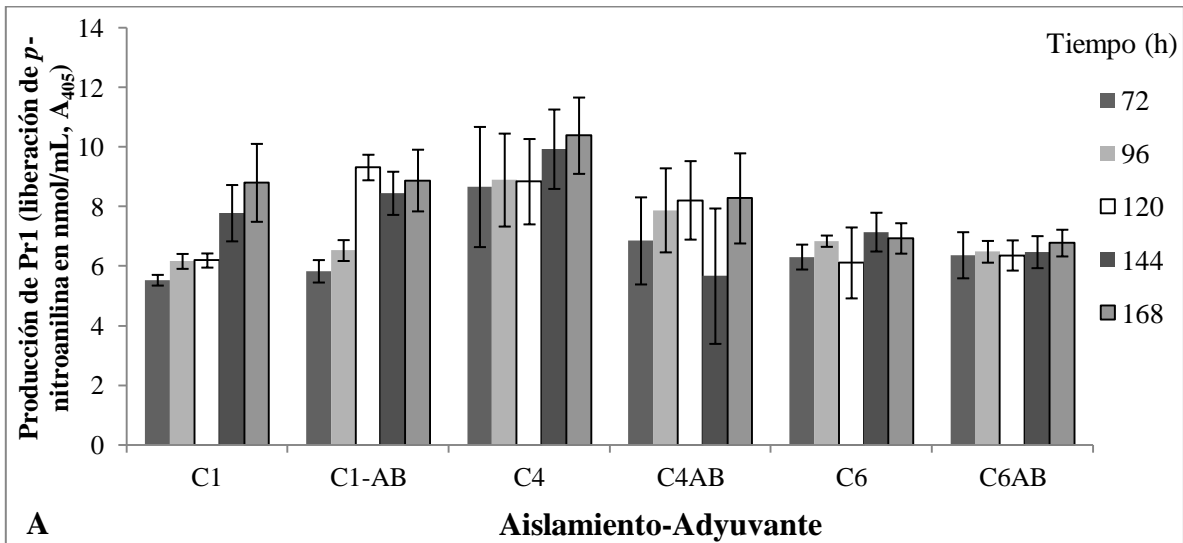


Fig. 11. Producción de Pr1 (U/mL) por los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos creciendo en medios líquido Sabouraud sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB), en base a la reducción de succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-4-nitroanalina por liberación de *p*-nitroanilina (nmol/min), a una absorbancia de 405nm. Fig. 11A), promedios de 72 a 168h; Fig. 11B), promedios de 168 a 312h. Las barras en cada tiempo de muestreo indican el error estándar del promedio de 3 repeticiones, calculados por la prueba de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

6.2.3 Producción de la proteasa Pr2

Para el caso de producción de Pr2, el análisis ANOVA y Tukey HDS, no revelaron diferencias significativas entre aislamientos y tratamientos evaluados ($F_{5,48} = 0.383$; $p = 0.858$ (Fig. 12). Los valores oscilaron entre 5.91 U/mL y 6.66 U/mL (Fig. 12). En general,

el aislamiento C1 mostró menor actividad en la primera mitad de la fermentación (Fig. 13A), pero presentó la mayor en la segunda mitad, especialmente en el MLS (Fig. 13B). Al comparar el incremento significativo en la producción de Pr2 conforme pasaba el tiempo, fue el aislamiento C6 en las primeras 168h en ambos medios (Fig. 13A), y los aislamientos C1 y C4 entre 168 y 312h de fermentación, también en ambos medios (Fig. 13B).

El análisis Tukey HDS ($\alpha= 0.05$) mostró sólo un grupo, lo que confirmó que no habían diferencias significativas entre tratamientos. El análisis ANOVA al evaluar la producción total de cada aislamiento en medio sin (MLS) y con adyuvante (MLS/AB) por separado, no mostró diferencias significativas ($F_{2,24} = 1.051$; $p =0.365$), mientras que los valores de significancia lo confirmaron ($p =1.0$ y 0.354 entre C1 y C4; $p =0.856$ y 0.563 entre C1 y C6; y $p =0.861$ y 0.930 entre C4 y C6, en MLS y MLS/AB, respectivamente)

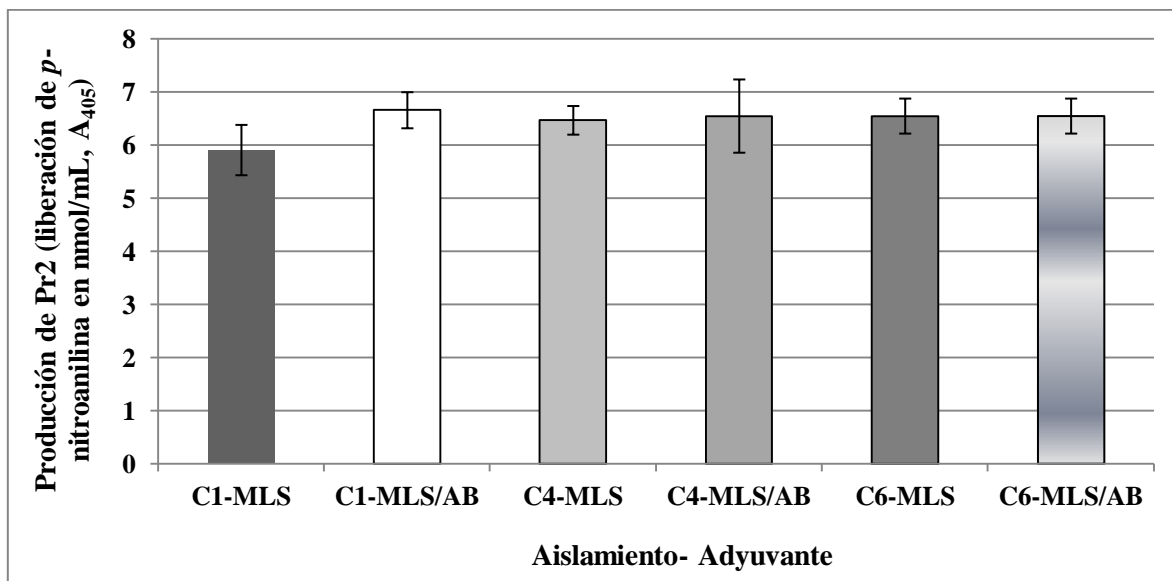


Fig. 12. Producción de Pr2 (U/mL) por los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos creciendo en medio líquido Sabouraud sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB), en base a la reducción de succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-4-nitroanilina por liberación de *p*-nitroanilina (nmol/min), a una absorbancia de 405nm. Las barras indican el error estándar para el promedio de tres repeticiones, calculados por la prueba de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

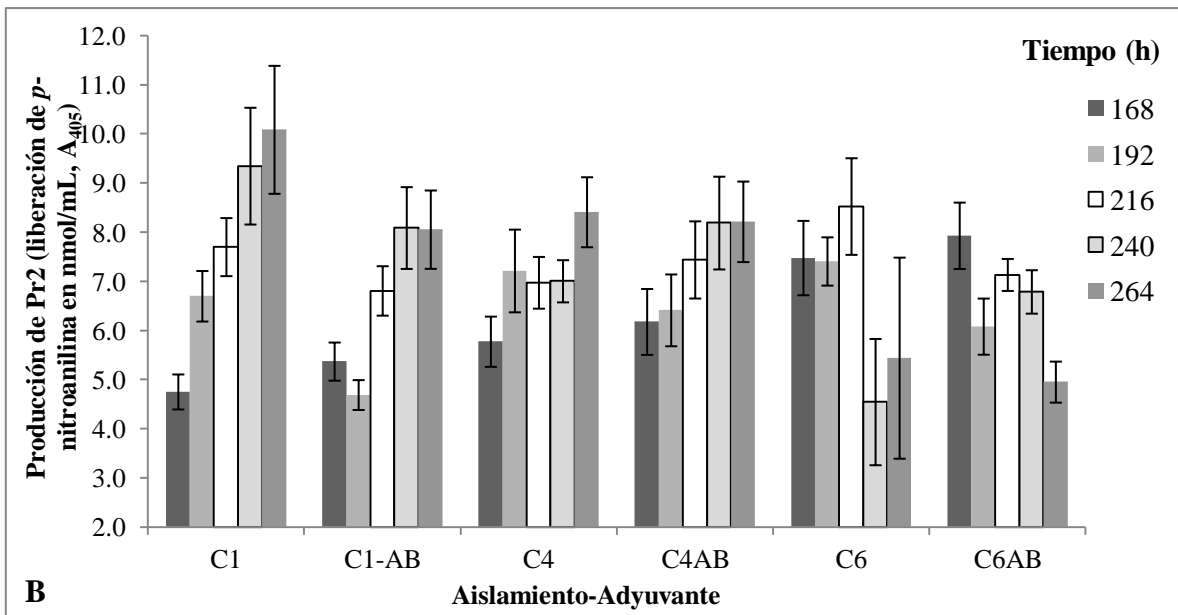
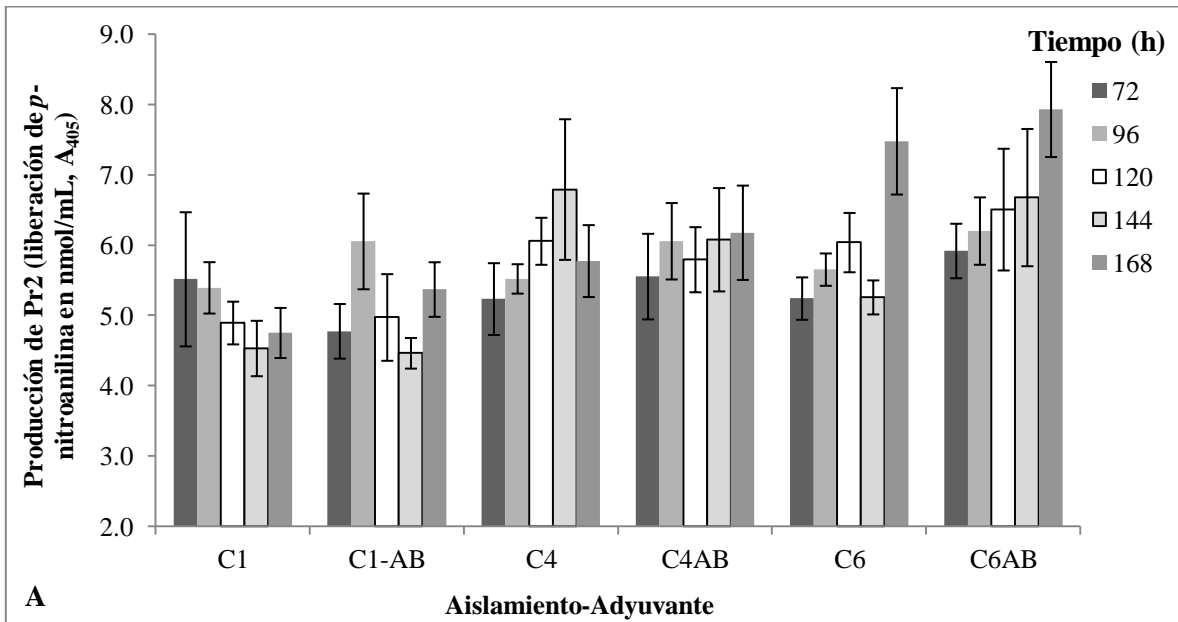


Fig. 13. Producción de Pr2 (U/mL) por los aislamientos C1, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos creciendo en medio líquido Sabouraud sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB), en base a la reducción de succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-4-nitroanalina por liberación de *p*-nitroanilina (nmol/min), a una absorbancia de 405nm. Fig. 11A), promedios de 72 a 168h; Fig. 11B), promedios de 168 a 312h.. Las barras en cada tiempo de muestreo indican el error estándar del promedio de 3 repeticiones, calculados por la prueba de Tukey HSD (SPSS Statistics 17.0, 2007).

6.3 Actividad insecticida contra *P. americana*

Para conocer si el empleo de ácido bórico como aditivo en el medio líquido de crecimiento tenía algún efecto en la actividad insecticida (AI) de *B. bassiana*, se realizaron diferentes bioensayos de exposición tópica o por inmersión. De acuerdo a resultados obtenidos previamente (Damas, 2012) de los aislamientos evaluados el C1 mostraba infección (micelio aéreo) pero los insectos expuestos al hongo no se morían en el plazo en que se presentaba mortalidad con los aislamientos C4 y C6. Por esta razón se probó solamente la AI del aislamiento C1, sobre el cual se pretendió buscar un incremento en su virulencia mediante la adición de ácido bórico en el medio de crecimiento.

El bioensayo de exposición tópica se realizó empleando 60 individuos de los diferentes estados de desarrollo y sexo de *P. americana* (20 ninfas tardías, 20 hembras y 20 machos) por dosis, estableciendo la dosis de 1.3×10^7 conidios/mL y el medio de cultivo sin inocular como control negativo. Esta dosis se seleccionó de bioensayos de dosis respuesta anteriores, probando 5 dosis con 1.3×10^7 , 6.5×10^6 , 1.3×10^6 , 6.5×10^5 y 0.0 conidios/mL, pues se pretendía determinar la correlación entre virulencia y respuesta inmune. Se observó una esperada baja virulencia, con valor máximo del 25% de mortalidad contra machos expuestos al aislamiento C1 producido en MLS a la dosis de 1.3×10^7 conidios/mL. (Fig. 14).

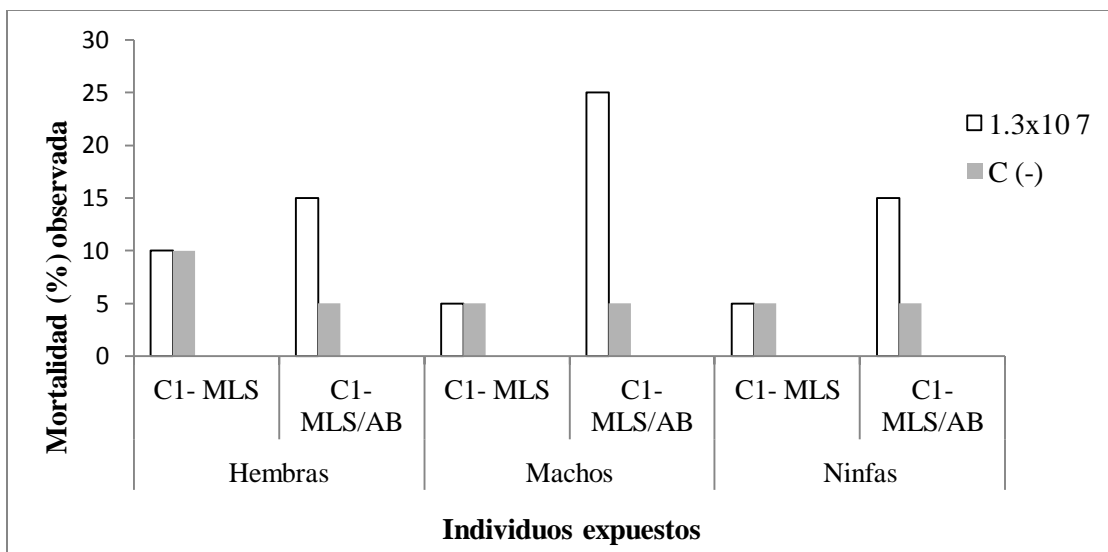


Fig. 14. Actividad insecticida del aislamiento C1 de *Beauveria bassiana* crecido en medio líquido Sabouraud sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB).

6.4 Actividad de fenoloxidasa (PO)

Con el propósito de determinar la relación entre la producción de enzimas degradadoras de la cutícula y la respuesta inmune humoral innata de las cucarachas mediada por la actividad fenoloxidasa, se expusieron ninfas tardías, hembras y machos al sobrenadante de cada medio (MLS y MLS/AB) obtenido después de 10 días de fermentación. El ensayo se hizo 10 días después de haber expuesto los individuos al sobrenadante del hongo.

Se realizó un análisis de *t* de *student* donde se comparó la actividad de PO (U/mL, A₄₉₀) y los resultados mostraron una significativamente mayor actividad de PO ($p < 0.001$) entre los individuos expuestos al sobrenadante comparados contra los no expuestos, donde las hembras presentaron la mayor actividad de PO (16.27), y la menor se observó en machos (8.47). El análisis de comparación de los grupos de individuos tratados confirmó una mayor actividad PO entre los expuestos en todos los estados de desarrollo y géneros estudiados (hembras: $t = 37.544$, $p < 0.001$; machos: $t = 5.811$, $p = 0.004$; ninfas: $t = 7.571$, $p = 0.002$) (Fig 15).

Al analizar por separado la actividad de PO entre los individuos expuestos también se encontraron diferencias significativas al comparar hembras y machos (16.27 y 8.47, $p = 0.009$), no así entre machos contra ninfas ($p = 0.052$), o hembras contra ninfas ($p = 0.32$). El mismo análisis estadístico se realizó para comparar la actividad de PO entre individuos no expuestos al sobrenadante de C1, encontrándose que no habían diferencia significativas entre las medias registradas de actividad de PO entre hembras, ninfas y machos de *P. americana*, arrojando valores de 12.004 para hembras, de 6.508 para machos y de 10.214 para ninfas, con valores de $p = 0.056$ para hembras y machos, de $p = 0.450$ para hembras y ninfas, y de $p = 0.142$ para machos y ninfas.

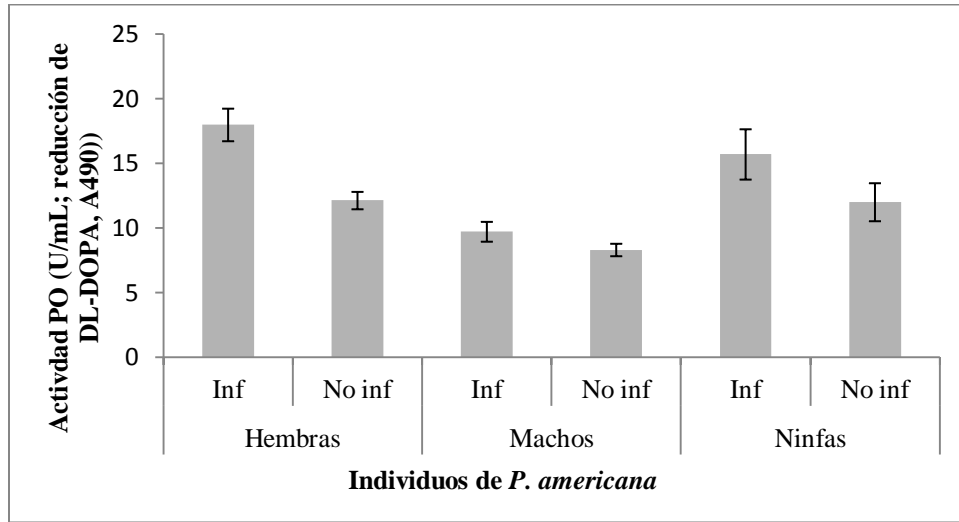


Fig. 15. Medición de Actividad insecticida (U/mL) del aislamiento C1 sin (MLS) y con ácido bórico (MLS/AB) de *Beauveria bassiana* sobre hembras, machos y ninfas tardías de *P. americana*, en base a la reducción de DL-DOPA a una absorbancia de 490nm. Las barras en cada tiempo de muestreo indican el error estándar del promedio de 5 repeticiones. Estudio calculado por la prueba *t* de student (SPSS Statistics 17.0, 2007).

7. DISCUSIÓN

El empleo del control biológico ha tomado fuerza en tiempos recientes, donde microorganismos como *B. bassiana* representa uno de los géneros de hongos más utilizados y representativos en la utilización de estas técnicas. *P. americana*, organismo vector de enfermedades gastrointestinales, se ha vuelto una plaga importante a tratar; es por eso que en el presente trabajo se buscó la aplicación de *B. bassiana* producida en medio líquido Sabouraud, adicionado con ácido bórico como adyuvante para observar el efecto de este sobre la efectividad y mortalidad de *B. bassiana* contra *P. americana*. Hernandez-Ramirez *et al.* (2008) realizaron un estudio donde observaron que la utilización de ácido bórico en formulaciones alimenticias con *B. bassiana*, no influía en la viabilidad del hongo, pero si en la virulencia, potenciando su actividad insecticida contra *P. americana*. En cambio, en un estudio realizado en *C. albicans* se observó un efecto fungistático al utilizar concentraciones entre 1.563 y 6.250 g/L de ácido bórico (De Seta *et al.*, 2008). El empleo de sales de tetrazolio se ha vuelto un método efectivo que permite cuantificar, de manera indirecta, la viabilidad de diferentes tipos de células. La técnica de MTT se fundamenta en la reducción de MTT a formazan, reacción catalizada por las células viables (Thom *et al.*, 1993; Gomez-Flores *et al.*, 1995). En el presente estudio se utilizó esta técnica siendo un método útil, fácil, y práctico para verificar la actividad celular de *B. bassiana* durante un proceso fermentativo (Freimoser *et al.*, 1999); el cual nos permitió establecer si había diferencia significativa entre los promedios de las A_{570nm} registradas en los diferentes aislados (1, 4 y 6) fermentados en ambos medios de cultivo (MLS y MLS/AB). La actividad celular durante el crecimiento de *B. bassiana* es un punto crucial para las formulaciones. Las técnicas utilizadas para medir la viabilidad demostraron que los diferentes aislados se mantienen activos y se desarrollan en los ambos medios de cultivo (MLS y MLS/AB) no existiendo diferencia al comparar las absorbancias registradas durante los 13 días de fermentación (Tabla 1). Sin embargo, la actividad celular registrada a la mitad (156h) se presentó en mayor cantidad en C4-MLS y en menor cantidad en C1-MLS. En el caso de C1 y C6, la mayor actividad celular se presentó en MLS/AB, sin embargo, no existió diferencia significativa entre C4-MLS/AB y C6 en ambos medios; caso similar en C1 y C4 ambos en MLS/AB y C6-MLS. De igual forma, se registró la actividad celular al final de la fermentación (312h). Se encontró que la mayor actividad celular se registró en C6-

MLS/AB (2.54) y la menor en C4-MLS/AB (1.53). No se encontraron diferencias entre C1-MLS, C4-MLS y C6 en ambos medios (2.49, 2.12, 2.42 y 2.54 $p < .001$, respectivamente); caso similar el que se presentó entre C1-MLS/AB y C4-MLS/AB. El rendimiento total de UFC's estuvo en un rango de 0.46- 7.6×10^7 en todos los aislados, siendo C4-MLS/AB el mayor y C6-MLS/AB el menor. Al realizar la comparación no se presentó diferencia significativa en las UFC's registradas en C1 y C4 ambos en MLS, similar a lo presentado en C4-MLS y C6-MLS; así como en C6-MLS y C1-MLS/AB. La comparación entre C4-MLS/AB y C6-MLS/AB presentó diferencia significativa, de igual manera después de la comparación con los demás aislados y medios de cultivo. La viabilidad medida en porcentaje de germinación fue superior al 94% en todos los casos, indicando los altos niveles de viabilidad después de 13 días de fermentación; donde fue mayor en C6-MLS y el menor se registró en C1-MLS; no existiendo diferencia significativa al comparar cada uno con el resto de los aislados y medios de cultivo. En este estudio, nosotros utilizamos una concentración de AB utilizada fue de 0.66g/L, cantidad que no se convierte en un factor que marque una tendencia positiva o negativa sobre la actividad celular y viabilidad de los diferentes aislados.

La presencia de enzimas quitinolíticas se encuentran presentes en diversos géneros y especies de hongos (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Aspergillus*), donde la aparición de estas enzimas muestra relación con los factores de virulencia de diversos hongos entomopatógenos. La actividad de quitinasa y proteasas varía y se define dependiendo del aislamiento y medio de cultivo sobre el que se desarrollan diversos organismos. *B. bassiana* tiene la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno, así como, componentes procedentes de cutícula y hemolinfa, al igual que biomoléculas como ácidos grasos, trealosa, glucosa, combinación de aminoácidos, quitina, glucosamina y N-acetilglucosamina (Bidochka y Khachatourians, 1988; Dhar y Kaur 2009). Los medios utilizados en este trabajo (MLS yMLS/AB) contienen fuentes de nitrógeno y carbono necesarias para el desarrollo del hongo, sin embargo la actividad enzimática registrada fue baja, lo que indica que la falta de algún componente similar a la quitina no estimula la producción de quitinasas. Se ha visto que, la utilización de medios adicionados con quitina muestra una sobreproducción de quitinasas. Así mismo, se ha observado que se logra una represión en *M. anisoplie* al adicionar componentes

producto de la degradación de quitina (St. Leger *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 1994). En el presente estudio se detectó actividad quitinasa, tanto en el cultivo con MLS y MLS/AB en un rango de 2.5–3.3 U/mL, no existiendo diferencia significativa entre ambos medios de cultivo. En cambio al comparar las absorbancias en el tiempo final de la fermentación (312h), existen diferencias en el aislamiento C4 siendo mayor el fermentado en MLS/AB (2.89 U/mL, $p < 0.001$); efecto que no se presentó en los aislamientos C1 (2.87 y 2.93 U/mL, $p = 0.986$) y C6 (2.61 y 2.47 U/mL, $p = 0.986$) en ambos medios de cultivo. Su *et al.* (2011), realizaron un estudio en el cual *B. bassiana*, fue fermentado en medios de cultivo adicionados con extractos de levadura, mostrando valores de actividad de quitinasa de hasta 5.1 U/mL, y de 15.7 U/mL, con una óptima combinación de 2 sustratos; además de brindar un control efectivo hacia poblaciones de áfidos. St. Leger *et al.* (1996a) dedujeron que, en el proceso inicial de adhesión e infección, los niveles de quitinasa son bajos; sin embargo, hay un aumento significativo en los niveles de quitinasa cuando se presentan los fenómenos iniciales de hidrólisis. Se ha visto que la actividad quitinasa participa en los procesos de crecimiento y desarrollo de diversos organismos, mudas de insectos, algunos nemátodos, división celular de levaduras, crecimiento y elongación de hifas, incluso en organismos que la poseen constitutivamente para utilizarla en procesos metabólicos (Passonneau y Williams, 1953; Elango *et al.*, 1982; Kuranda y Robbins, 1991). En cambio, bajo condiciones de producción adecuadas, se han desarrollado procesos biotecnológicos que permiten la utilización de dichas enzimas para el desarrollo de biopesticidas o fungicidas (Kramer y Muthukrishnan, 1997; Herrera-Estrella y Chet, 1999). Por todo lo anterior, se podría deducir que las unidades de actividad enzimática reportadas en el presente trabajo corresponden a las de una cantidad basal, y correspondiente, a la de procesos de elongación y crecimiento de hifas.

Las proteasas son enzimas que catalizan reacciones hidrolíticas teniendo como sustratos moléculas de naturaleza proteica, dichas enzimas poseen gran importancia a nivel industrial. Durante procesos de infección se ha demostrado que las proteasas se presentan más rápido y en mayor cantidad que las quitinasas (St. Leger *et al.*, 1987). En el caso de proteasas secretadas por microorganismos, la producción varía en relación al medio de cultivo y las cantidades de carbono y nitrógeno presentes en el mismo. Se ha demostrado que fuentes exógenas de carbono y nitrógeno son inductivas para que *B.*

bassiana secreta proteasas en medio líquido (Bidochka y Khachatourians 1988; Donatti *et al.*, 2008), y que además funcionan como un sistema de activación y represión en la síntesis de proteasas, siendo la presencia de cutícula un inductor; y productos de degradación de la misma los encargados de una represión de dichas proteasas (Harrison y Bonning 2010). La mayor cantidad de proteasas es producida en las primeras 48-72 h en un crecimiento de 5 días (Dias *et al.*, 2008). En nuestro trabajo, el proceso fermentativo fue de 13 días, observándose que el nivel de enzima Pr1 se mantuvo en el mismo rango de unidades/mL durante la mayoría del tiempo, esto para los aislamientos C4 y C6; mientras que para el aislamiento C1 fermentado en MLS, se observó un aumento en la actividad Pr1. Para el caso de Pr2 se vio un aumento progresivo durante el proceso de crecimiento en los aislamientos C1 y C4 para ambos medios. En cambio, en el caso del aislamiento C6, se observó un decremento en la actividad de Pr2 en relación a la actividad registrada al inicio de toma de muestras (Fig. 13A y 13B). La utilización de medios que contienen caseína y otros suplementos como gelatina, yema de huevo, suero fetal bovino, extracto de arroz, carne de pescado, arrojan rendimientos de actividad enzimática no mayor a 3 U/mL (Raja *et al.*, 2010). En comparación, estos valores indican que el crecimiento de los aislamientos de *B. bassiana* evaluados en los medios MLS y MLS/AB, obtuvieron una mayor actividad enzimática, con rangos de entre 4 a 9 U/mL para ambas proteasas (Pr1 y Pr2). Qazi y Khachatourians (2008), realizaron un estudio donde analizaron el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en un medio a base de exuvias de *Sitobion avenae* (Fabricius) sobre *B. bassiana*, no encontrando diferencias en la producción de proteasas. La mayor actividad de proteasas se presentó en el medio adicionado solo con C. En cambio, al adicionarlo con fuentes tanto de C y N, se presentó mayor actividad en Pr2 que en Pr1. En el medio de cultivo adicionado solo con fuente de N, se observó una disminución de actividad de Pr2, lo que sugiere una represión en la síntesis de esta proteína. En el caso de la represión de proteasas, a raíz de la adición de C y N externos, solo se presentó un crecimiento abundante del micelio lo que indica que una represión en la producción de proteasas por la adición de C/N externo ocurre cuando la formación de estructuras infectivas del hongo encuentran un equilibrio nutricional, no teniendo la necesidad de interactuar con las estructuras del hospedero. Esto concuerda con nuestros estudios, donde se observó una alta cantidad de micelio al final de la fermentación, pero una baja cantidad de Pr1 y Pr2, esto debido, quizá con la disponibilidad de C (MLS) y N

(extracto de levadura). En el presente estudio observamos una producción de Pr1 ligeramente mayor a Pr 2; sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre la producción de las proteasas. La presencia de sustratos de la misma naturaleza del exoesqueleto de insectos es determinante para la producción de estas proteasas. A este respecto se ha observado que la actividad enzimática se ve aumentada en presencia de estos compuestos, principalmente en etapas tempranas en el proceso de hidrólisis, similar al proceso infectivo (Zibae y Bandani, 2009).

Los medios de cultivo utilizados en el cultivo de *B. bassiana* ha establecido que, dependiendo del tipo de fermentación, ya sea sólida o líquida, es el propágulo obtenido. Donde se pueden obtener conidios aéreos (cultivo sólido), o conidios sumergidos y blastosporas (cultivos líquidos); estos propágulos y condiciones, influyen en la adhesión y virulencia. Las blastosporas tienen la capacidad de unirse con mayor fuerza a las superficies que presentan características hidrofílicas (Holder y Keyhani, 2005). Sin embargo, la naturaleza de la cutícula del insecto es hidrofóbica lo que no favorece a la adhesión de blastosporas. En el presente estudio se realizaron ensayos de actividad insecticida donde se presentaron niveles bajos de mortalidad al exponer la C1 (MLS y MLS/AB) contra machos, hembras y ninfas de *P. americana*. Los porcentajes de mortalidad obtenidos no fueron mayores al 50% en los aislados fermentado en ambos medios de cultivo. Por lo que 2 factores pudieron influir en dicho fenómeno. La presencia abundante de micelio obtenido en el presente estudio, indica que la alta disponibilidad de nutrientes propició el desarrollo de blastosporas, que según las condiciones descritas anteriormente, puede convertirse en un factor influyente sobre la baja mortalidad de *P. americana*. Por otra parte, existen diversos factores en la respuesta inmune del insecto que pudo influir en los mecanismos de defensa contra la infección. Tavacol *et al.* (2007), realizaron un estudio para observar la población microbiana presente en 133 individuos de *B. germanica* procedentes de diferentes lugares (ambientes nosocomiales y residenciales), encontrando, en el 98% de los insectos la presencia de hongos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*) y bacterias (*Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Haemophilus*) en diversos porcentajes. Por otra parte, en un estudio realizado por Faulhaber y Karp (1992), concluyeron que *P. americana* presenta un fenómeno de respuesta inmune de manera bifásica, observando que al inyectar individuos de

cucaracha americana con diferentes bacterias patógenas se presentó un fenómeno de respuesta no específica, la cual declina a las 72 h, para después desarrollar una respuesta más larga en los días posteriores, regresando a niveles normales hasta el día 14 post infección. Lo anterior indica que la presencia de una flora bacteriana abundante en *P. americana* puede llegar a ser un factor determinante contra la infección de hongos entomopatógenos, de manera que la misma flora presente mantiene encendidos los mecanismos de defensa de la cucaracha. Una de las líneas de defensa de los insectos contra infecciones es la respuesta humoral y celular, teniendo la capacidad de reconocer moléculas presentes en los diferentes organismos que les puedan ser patógenos, peptidoglicana de G(+), LPS G(-) y 1-3 β - glucanos presentes en los hongos (Prochazková *et al.*, 2006). Se ha observado, aunque no de manera muy clara, la presencia de enzimas, como la fenoloxidasa (PO), que presenta una acción homóloga a la de los anticuerpos en mamíferos, además de participar en fenómenos de encapsulamiento y melanización (Téllez-Jurado *et al.*, 2009). Es una enzima que se encuentra en artrópodos en forma de Pro-fenoloxidasa (Zymogeno), que se activa al sufrir una hidrólisis en sitios específicos cercanos al extremo amino-terminal. La PO cataliza una cascada de reacciones que consiste en la hidroxilación de mono-fenoles a *O*-difenoles, y posteriormente, estos a quinonas; que participan en los procesos de esclerotización y precursor de melanina (Jiang *et al.*, 1998; Procházkova *et al.*, 2006). Schwarzenbach *et al.* (2005), realizaron una comparación entre la actividad de PO, entre machos y hembras, de la mosquita del estiércol amarillo (*Scathophaga stercoraria* L.) encontrando que no existió diferencia significativa al comparar la actividad de PO en ambos sexos de la mosquita. Nuestros resultados, concuerdan con el análisis de actividad de PO en los insectos de *P. americana* no infectados. En cambio, se observó que en los individuos infectados hubo una mayor actividad de PO en hembras (16.27) (Fig. 15). Además observamos una diferencia significativa en relación a los machos (8.47, $p= 0.009$). Sin embargo al comparar hembras y ninfas (16.27 y 13.7, $p= 0.320$) así como machos y ninfas no se observó diferencia significativa (8.47 y 13.75, $p= 0.052$). Hay diversos estudios que muestran una mayor actividad de PO en insectos hembra (Radhika *et al.*, 1998; Kurtz & Sauer, 2001; Rolff, 2001; Hasselquist *et al.*, 1999). No obstante, otros confirman que no hay diferencia en la producción de PO entre machos y hembras cuando recién inician esta etapa madura (Hasselquist *et al.*, 1999; Adamo *et al.*, 2001).

8. CONCLUSIONES

- La fermentación sumergida para el crecimiento de *B. bassiana*, utilizando MLS, adicionado con extracto de levadura al 1%, induce la producción de blastosporas y abundante micelio, lo cual es importante para la producción en masa del entomopatógeno.
- El ácido bórico a una concentración de 0.66 g/L, no es un factor adyuvante de la viabilidad, rendimiento, virulencia y producción de enzimas degradadoras de cutícula por los aislamientos de *B. bassiana* evaluados.
- Se obtuvo una baja producción de enzimas degradadoras de cutícula (Pr1, Pr2, NAGasa) en los medio de cultivo evaluados.
- Los niveles de NAGasa registrados corresponden a una cantidad basal, correspondiente a la de procesos de elongación y desarrollo del hongo.
- Se mostró baja mortalidad del aislamiento C1, debido probablemente a la respuesta inmune innata de *P. americana*.
- Los niveles de fenoloxidasa de individuos infectados es significativamente diferente y mayor comparado con los individuos no infectados, concluyendo que existió una estimulación de la respuesta inmune innata por el proceso infeccioso.
- Se observó una mayor actividad de fenoloxidasa en hembras infectadas con *B. bassiana*, comparados con machos y ninfas, lo que indica una estimulación mediada por hormonas femeninas.

9. REFERENCIAS

- Adamo S.A, Jensen M, Younger M. 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Anim. Behav.* 62: 417–425.
- Akello, J. Dubois T. Coyne D. Kyamanywa S. 2008. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa spp.*) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. *Crop Prot.* 27(11): 1437-1441.
- Albano, SS. Leal CM. Carneiro FM. Araújo M. Macedo RH. Cardoso S. Dutra N. Morais FA Magalhães D. 2009. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), a potential biological control agent of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Biol. Control.* 50 (3): 329-335.
- Ali S, Huang Z and Ren S. 2010. Media composition influences on growth, enzyme activity, and virulence of the entomopathogen hyphomycete *Isaria fumosoroseus*. *J. Pest Sci.* 83(4): 361-370.
- Arakane Y, Muthukrishnan S. 2009. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(2): 201-2016.
- Aver'yanov, AA. Lapikova VP. Pasechnik TD. Zakharenkova TS. 2011. Self-inhibition of spore germination via reactive oxygen in the fungus *Cladosporium cucumerinum*, causal agent of cucurbit scab. *Con Jacyn Baker. Eur. J. Plant Pathol.* 130:541–550.
- Barbara, KA. 2000. American Cockroach, *Periplaneta americana* (Linnaeus) (Insecta: Blattodea: Blattidae). University of Florida/IFAS. EENY141. <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures>.
- Barnes, SE, Moore D. 1997. The effect of fatty, organic or phenolics acids on the germination of conidia of *Metarrhizium flavoviride*. *Mycol. Res.* 101: 662- 666.
- Barron, G. 2001. George Barron's Website on Fungi. Universidad de Guelph, Ontario, Canadá. Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>.
- Bell, WJ and KG Adiyodi. 1981. The American cockroach. Chapman and Hall, London.
- Bidochka M J, Pfifer T, Khachatourians G G. 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathol.* 99: 77- 83.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. 1988b. N-Acetyl-D-glucosamine- mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Environ. Microbiol.* 54: 2699–2704.
- Blanford S. Chan B. Jenkins N. Sim D. Turner R. Read A. Thomas M. 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science.* 308: 1638-1641.
- Campbell RK, Perring TM, Barnes GL, Eikenbary RD, Gentry CR. 1978. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* on media containing various amino acids. *J. Invertebr. Pathol.* 31(3): 289–295.
- Campos RA, Arruda W, Boldo JT, Silvia MV, Barros NM, Azevedo JL, Schrank A, Vainstein MH, 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and

- Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiol.* 50: 257–261.
- Carrillo L. 2005. Los hongos de los alimentos y forrajes: Estructuras. Universidad Nacional de Salta. Facultad de Ciencias Agrarias. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>.
- Castellanos-Moguel J, González-Barajas M, Mier T, Reyes-Montes MR, Aranda E, Toriello C. 2007. Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Rev. Ib. Micol.* 24(1): 62–68.
- Castrejón-Antonio J.E., Iracheta-Cárdenas, M.M., Núñez-Mejía, G., Tamayo-Mejía, F., Ocampo-Hernández J.A., Gómez-Flores, R., Tamez-Guerra, P. 2012. Assessment of cuticle-degrading enzymes production by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin in liquid media to improve the *Epilachna varivestis* (Mulsant) biocontrol. Biotechnology SUMMIT-2012. International Foundation for Biotechnology Research. March 18-21, Mérida, Yuc. MX. Pp 65-71. ISBN: 978-607-9023-12-6.
- Charnley AK. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Adv. Bot. Res.* 40:241–321.
- Choi YW, Hyde KD, Ho WH. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity.* 3: 29-38.
- Churchill BW. 1982. Mass production of microorganisms for biological control, En: R. Charudattan and H.L. Walker (Ed.). *Biological Control of Weeds with Plant Pathogens.* John Wiley and Sons, New York. pp. 139-56.
- Damas G, Valadez-Lira A, Gomez-Flores R, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra P. 2010. Production of phenoloxidase and susceptibility of *Periplaneta americana* cockroach following *Beauveria bassiana* infection. 58th Ann Meeting, ESA-Southwestern Branch. Cancún, Quintana Roo.
- Damas G. 2012. Aislamiento y efectividad de *B. bassiana* (Blasm) Villemin para el control biológico de la cucaracha urbana *P. americana*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- De Seta F, Schmidt M, Vu B, Essmann M, Larsen B. 2008. Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida vaginitis*. *J. Antimicrob. Chemotherapy* 63(2): 325-336.
- Dhar P, Kaur G. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopliae* isolates. *Ann. Microbiol.* 59(3): 545-551.
- Dhar P, Kaur G. 2010. Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. *African J. Biochem. Res.* 4(3): 65-72.
- Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Braz. J. Microbiol.* 39: 301-306.

- Donatti AC, Furlaneto-Maia L, Fungaro M.H.P, Furlaneto MC. 2008. Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoidescuticle*. *Curr. Microbiol.* 56: 256-263.
- Duperchy E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p.
- Elango N, Correa JU, Cabib E. 1982. Secretory character of yeast chitinase. *J. Biol. Chem.* 257: 1398-1400.
- Faulhaber LM, Karp RD. 1999. A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunol.* 1992(75): 378-381.
- Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8): 3727-3729.
- Gomez-Flores R, Gupta S, Tamez Guerra R, Mehta RT. 1995. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J. Clinical Microbiol.* 33 (7): 1842–1846.
- Gupta GC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 64(1): 13-17.
- Harrison RL, Bonning BC. 2010. Proteases as Insecticidal Agents. *Toxins.* 2: 935-953.
- Hasselquist D, Marsh JA, Sherman PW, Wingfield JC. 1999. Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone?. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 45: 167–175.
- Hegedus D, Khachatourians GG. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol. Adv.* 13: 455- 490.
- Henrissat BI, Bairoch A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 293: 781-788.
- Hernandez-Ramirez G, Sanchez-Arroyo H, Alatorre-Rosas R. 2008. Patogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the American cockroach (dictyoptera: blattidae). *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests* William H Robinson and Dániel Bajomi (eds).
- Herrera-Estrella A, Chet I. 1999. Chitinases in biological control. *EXS* 87: 171-184.
- Holder DJ, Keyhani NO. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5260–5266.
- Ibrahim L, Butt T M, Jenkinson P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 106 (6): 705–715.
- Jeffs LB, Xavier IJ, Matai RE, Khachatorians GG. 1997. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolylocadium* and *Verticillium*. *Can. J. Microbiol.* 45: 936- 948.

- Jiang H, Wang Y, Kanost MR. 1998. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. PNAS. 95: 12220–12225.
- Joshi L, St. Leger RJ, Bidochka MJ. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiol. Lett. 125: 211-217.
- Kershaw MJ, Talbot NJ. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in the fungal morphogenesis. Fungal Genet. Biol. 23: 18-33, 83.
- Khachatourians GG. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En: Howard DH, Miller JD (Eds.) The Mycota VI. Human and animal relationship. Springer. Berlin, Alemania. pp 331- 364.
- Kim JS, Roh JY, Choi JY, Wang Y, Shim H J, Je YH. 2010. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. Fungal Biol. 114: 120– 128.
- Kouassi M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Universidad de Québec, Montreal, Canadá. Vértigo. La revista en ciencias ambientales de la web. 2 (2). Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html.
- Kramer KJ, Muthukrishnan S. 1997. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 887-900.
- Kuranda MJ, Robbins PW. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 266, 19758-19767.
- Kurtz J, Sauer KP. 1999. The immunocompetence handicap hypothesis: testing the genetic predictions. Proc. R. Soc. Lon. B. 266: 2515–2522.
- Leopold J, Samšínáková A. 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 15 (1): 34–42.
- LeOra. 2007. Polo Plus, Polo Encore, Polo Dose y Polo Mix. LeOra Software Company.
- Liu SQ, Meng ZH, Yang JK, Fu YX; Zhang KQ. 2007. Characterizing structural features of cuticle-degrading proteases from fungi by molecular modeling. BMC Structural Biol. 7: 33.
- Maniania NK, Laveissiere C, Odulaja A, Ekesi S, Herren HR. 2003. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents for tsetse flies. In: Upadhyay RK (ed) Advances in microbial control of insect pests. Kluwer, New York, pp 145–164
- Mariño–Pedraza E. 2011. Fósiles vivientes: Cucarachas. CONABIO. Biodiversitas, 97: 6-9.
- Montesinos-Matías R, Viniegra- Gonzalez G, Alatorre- Rosas R, Loera-Corral O. 2008. Perfiles de actividad enzimática extracelular de *Beauveria bassiana* involucrados en los mecanismos de virulencia hacia *Tenebrio monitor*. En memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico, Zacatecas, México.
- Monzon A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. CATIE, Costa Rica. 63: 95- 103.
- Passonneau JV, Williams, CM. 1953. The moulting fluid of the *Cecropia* silkworm. J. Exp. Biol. 246: 124-131.

- Perrot CR, Miller DM. 2004. American cockroach. Entomology, publication 444-288.
- Pham T A, Kim J J, Kim S G, Kim K. 2009. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. Mycobiol. 37(3): 218-224.
- Ponce G, Cantú PC, Flores A, Badii M, Barragán A, Zapata R, Fernández I. 2005. Cucarachas: Biología e importancia en salud pública. Revista de Salud Pública y Nutrición. 6 (3).
- Prochazková P, Silerová M, Stijlemans B, Dieu M, Halada P, Josková R, Beschin A, De Baetselier P, Bilej M. 2006. Evidence for proteins involved in prophenoloxidase cascade *Eisenia fetida* earthworms. J. Comp. Physiol. B 176: 581–587.
- Qazi SS, Khachatourians GG. 2008. Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beauveria bassiana*. Arch. Microbiol. 189: 589–596.
- Radhika M, Nazar AKA, Munuswamy N, Nellaiappan K. 1998. Sex-linked differences in phenoloxidase in the fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* Baird and their possible role (Crustacea: Anostraca). Hydrobiologia. 377: 161–164.
- Rodriguez-Gomez D, Loera O, Saucedo- Briseño G, Viniegra-Gonzalez G. 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 513–518.
- Rolff, J. 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. Can. J. Zool. 79: 2176–2180
- Rozendaal FG. 1997. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization pp. 288–301.
- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasoulilian GR, Bandani AR, Butt TM. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiol. Lett. 270 (1): 116-123.
- Safavi SA. 2012. Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial in vitro transfers. Biologia 67/6: 1062—1068.
- Santoro PH, Janeiro PMO, Moretto T, Sartori D, Angeli LF, Pelegrinelli MH. 2008. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. J. Invertebr. Pathol. 97 (2): 83-90.
- Schwarzenbach GA, Hosken DJ, Ward PI. 2005. Sex and immunity in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. J. Evol. Biol. 18 455–463
- Shah PA, Pell JK. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 413–423.
- Shah FA, Wang CS, Butt TM 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 251: 259–266.
- Shapiro-Ilan D, Reilly C C, and Hotchkiss M W. 2011. Comparative impact of artificial selection of fungicide resistance on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. Environ. Entomol. 40 (1): 59-65.

- St. Leger R. J., Cooper, R. M., Charnley, A. K. 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. J. General Microbiol. 133(5): 1371-1382.
- St. Leger RJ, May B, Allee LL, Frank DC, Staples RC, Roberts DW. 1992. Genetic differences in allozymes and information of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 60: 89–101.
- St. Leger RJ, Staples RC, Roberts DW. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. J. Invertebr. Pathol. 61 (1): 81-84.
- St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts DW. 1996a. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 62(3): 907–912.
- St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW 1996b. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Appl. Environ. Microbiol. 62:1257-1264.
- St. Leger R J, Joshi L, Roberts DW, 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 709–713.
- St. Leger RJ, Screen SE, 2001. Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds), Fungi as Biocontrol Agents CABI, Wallingford, pp. 219–237.
- Su JK, Ho Je Y, Yu YM. 2011. Mass production of aphicidal *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with the parameter of chitinase. J. Microbiol. Biotechnol. 21(6): 604–612.
- Suresh PV, Chandrasekaran M. 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochem. 34 (3): 257–267.
- Tamez-Guerra, P., Damas-Buenrostro, G., Lopez-Torres, M., Valadez-Lira, J.A. and Gomez-Flores, R.A. 2013. *Beauveria bassiana* biological control of *P. americana*. Definition: *Beauveria bassiana* isolate BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4, BBPTG6, and BBPTG7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession: KC759728; VERSION: KC759728.1, GI:480360075.
- Tavacol SP, Mahjub H. 2007. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. J. Vect. Borne. Dis. 44: 105–110.
- Téllez-Jurado A, Cruz Ramírez MG, Mercado Flores Y, Torres AA, Arana-Cuenca A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Rev. Mex. Micol. 30: 73- 80.

- Thom SM, Horobin RW, Seidler E, Barer MR. 1993. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 433–443.
- Ulhoa CJ, Peberdy JF. 1991 Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. General Microbiol.* 137: 2163-2169.
- Vasseur V, Arigoni F, Andersen H, Defago, Bompeix G, Seng JM. 1990. Isolation and characterization of *Aphanoeldium dbum* chitinase-overproducing mutants. *J. General Microbiol.* 136: 2561-2567.
- Varéa-Pereira G, Tiemi- Ito E, Tomoe Miyagui D, Pimenta Pinotti MH, Janeiro Neves PMO. 2007. Production of extracellular protease by a brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50(2): 217-223
- Vidal C, Fargues J, Lacey LA, Jackson MA. 1998. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propágulo production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia* 143: 33–46.
- Wang C, Typas MA, Butt TM 2002. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 213: 251-255.
- Wekesa VW. Knapp M. Maniania NK. Boga HI. 2006. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. *J. Appl. Entomol.* 130 (3): 155–159.
- Wessels JGH. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genet. Biol.* 27: 134-145.
- Wong H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. pp 147.
- Zibae A, Bandani AR. 2009. Purification and characterization of the cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in the presence of Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) cuticle. *Biocontrol Sci. Technol.* 19: 797-808.