



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA



**CARACTERIZACIÓN DE SECRECIONES DE *Beauveria bassiana* Y
Metarhizium anisopliae CON ACTIVIDAD PATOGENICA CONTRA EL
GORGOJO DEL FRIJOL *Acanthoscelides obtectus*.**

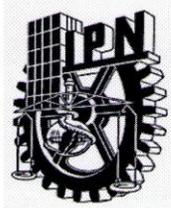
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA:

Jesús Manuel Mancillas Paredes



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Guasave Sinaloa el día 9 del mes diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Jesús Manuel Mancillas Paredes alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B091705, adscrito a CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Cipriano García Gutiérrez y el Dr. Sergio Medina Godoy cede los derechos del trabajo intitulado CARACTERIZACIÓN DE SECRECIONES DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* CON ACTIVIDAD PATOGENICA CONTRA EL GORGOJO DEL FRIJOL *Acanthoscelides obtectus*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección contra_babilon@hotmail.com, cgarciaq@ipn.mx, smedinam@ipn.mx.

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Jesús Manuel Mancillas Paredes
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

GUASAVE, SIN. A 03 DE NOVIEMBRE DEL 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR- SIN. en su sesión ORDINARIA No. 11 celebrada el día 03 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Mancillas	Paredes	Jesús Manuel
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)
Con registro: B 0 9 1 7 0 5		

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
CARACTERIZACIÓN DE SECRECIONES DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* CON ACTIVIDAD PATOGENICA CONTRA EL GORGOJO DEL FRIJOL *Acanthoscelides obtectus*.

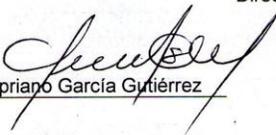
De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Caracterización de las proteínas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, así como la evaluación de éstos sobre el gorgojo del frijol.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Cipriano García Gutiérrez y Sergio Medina Godoy

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR,IPN-UNIDAD SIN. Que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios. Este trabajo será financiado por los proyectos: SIP 20101207 y SEP CONACYT No. P49067-Z

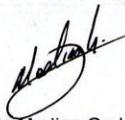
4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

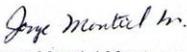

Dr. Cipriano García Gutiérrez

Aspirante


Jesús Manuel Mancillas Paredes


Dr. Sergio Medina Godoy

Presidente del Colegio


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sin. siendo las 15:00 horas del día 9 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:

CARACTERIZACIÓN DE SECRECIONES DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae*
CON ACTIVIDAD PATOGENICA CONTRA EL GORGOJO DEL FRIJOL *Acanthoscelides obtectus*
Presentada por el alumno:

Mancillas Jesús Manuel
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)
Con registro:

B	0	9	1	7	0	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:
MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Sergio Medina Godoy

Dr. Cipriano García Gutiérrez

Dr. Antonio Luna González

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

M. en C. Eusebio Nava Pérez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR-IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

"El hombre es el paso medio entre el mono y el super-hombre"

Friedrich Nietzsche

Dedicatoria

Blanca Yaneth te dedico mi trabajo de tesis, aunque nunca he ido a visitarte.
Tú sabes que no me gusta ir pero en fin algún día nos encontraremos, te quiero.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología Agrícola en el Laboratorio de Bioinsecticidas en conjunto con el laboratorio de Alimentos Funcionales del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección del Dr. Cipriano García Gutiérrez y el Dr. Sergio Medina Godoy. Para este proyecto se recibió el financiamiento por parte de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN (Proyectos: 20101207, 20113533). El autor agradece al CIIDIR Unidad Sinaloa por su apoyo en infraestructura para la realización de la presente investigación así como a CONACYT, COFAA-IPN e IPN por las becas otorgadas (Beca CONACYT y PIFI).

AGRADECIMIENTOS

No es fácil resumir los años en sólo unas líneas.

Primero que nada agradezco a mis directores de tesis Dr. Cipriano García Gutiérrez y Dr. Sergio Medina Godoy por sus valiosas aportaciones a esta tesis, así como el conocimiento que han dejado en mí durante este tiempo. Un especial agradecimiento a mi comité tutorial por la revisión de esta tesis: Dr. Antonio Luna González, M. en C. Eusebio Nava Pérez y Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza, agradezco sus buenas aportaciones a este trabajo, sus comentarios ampliaron el campo de mis conexiones neuronales.

Dr. Amador Osorio Pérez es “FABULOSO” en mundo de las proteínas, gracias por sus consejos, M. en C. Roberto Moreno León aquí vamos.

Muchas gracias a mis compañeros de laboratorio de Bioinsecticidas y Alimentos Funcionales, sin ustedes no hubiese funcionado ésto.

Gracias MAMI, PA por traerme a este mundo.

SEÑOR, los últimos serán los primeros.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURA	IV
GLOSARIO	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Importancia del frijol	3
2.2. Taxonomía del gorgojo pardo del frijol	4
2.2.1. Morfología de <i>Acanthoscelides obtectus</i>	4
2.2.2. Biología y hábitos de <i>Acanthoscelides obtectus</i>	5
2.3. Bioplaguicidas	6
2.3.1. Bioplaguicidas usados en granos almacenados	8
2.4. Hongos entomopatógenos y su mecanismo de acción	9
2.4.1. Acción de las quitinasas, proteasas y lipasas durante la infección	12
2.4.2. Características generales de <i>M. anisopliae</i>	14
2.4.3. Clasificación taxonómica.....	16

2.4.4. Proteínas relacionadas con la virulencia y patogenicidad de <i>M. anisopliae</i>	17
2.4.5. Características generales de <i>B. bassiana</i>	17
2.4.6. Clasificación taxonómica.....	19
2.4.7. Producción de enzimas que confieren patogenicidad y virulencia a <i>B. bassiana</i>	20
2.5. Proteómica.....	21
2.5.1. Preparación de la muestra	22
2.5.2. Primera dimensión: isoelectroenfoque	23
2.5.3. Proteómica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO GENERAL	29
5.1. Objetivos específicos	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1. Área de colecta de muestras de suelo	30
6.2. Selección de aislados patogénicos	32
6.3. Identificación de los aislados	35
6.4. Bioensayos	35
6.4.1. Cría masiva de <i>A. obtectus</i>	35
6.4.2. Estimación de la concentración de conidios	36

6.4.3. Prueba de germinación de conidios.....	38
6.4.4. Infección en adultos de <i>A. obtectus</i>	38
6.5. Determinación de indicadores de virulencia CL ₅₀ y TL ₅₀	39
6.6. Inducción del secretoma de los aislados más virulentas.....	40
6.7. Análisis electroforético	41
6.7.1. Preparación de la muestra de proteínas secretadas por los HE	41
6.7.2. Cuantificación de proteínas.....	42
6.7.3. Protocolo de limpieza para la electroforesis bidimensional 2D-SDS-PAGE.....	42
6.7.4. Separación de proteínas por punto isoelectrico [Isoelectroenfoque (IEF)].....	43
6.7.5. Separación de proteínas por peso molecular (SDS-PAGE).....	44
7. RESULTADOS.....	45
7.1. Identificación morfológica de los aislados	45
7.2. Viabilidad de los conidios.....	45
7.3. Selección de aislados patogénicos	49
7.4. Indicadores de virulencia de los aislados seleccionados	52
7.5. Caracterización del secretoma de los aislados más virulentas contra <i>A. obtectus</i>	53
7.5.1. Electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE).....	55

8. CONCLUSIONES	59
9. RECOMENDACIONES	60
10. BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

En el presente trabajo se seleccionaron 10 aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, provenientes de una colección de hongos entomopatógenos del CIIDIR-Sinaloa, estos aislados fueron resembradas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) con la finalidad de mantenerlas. Mediante bioensayos se determinaron cuales aislamientos presentaron mayor patogenicidad, provocando la mayor mortalidad de adultos de *Acanthoscelides obtectus*, así mismo se determinaron los parámetros de virulencia CL_{50} y TL_{50} de los aislados más virulentos. Elegidos los aislados Bb AGG24 y Ma AGG28 de mayor mortalidad, se realizó un análisis de las secreciones extracelulares en medio de cultivo conteniendo 1 % de insecto pulverizado (medio inductor), así como en medio carente de éste (medio no inductor).

El aislado Bb AGG24 y Ma AGG28 presentaron una mayor patogenicidad causando una mortalidad de 84.9 y 64% respectivamente, se determinó la CL_{50} y TL_{50} . Bb AGG24 presentó una CL_{50} de 9.2×10^4 conidios/mL con límites de confianza inferior y superior de 8.2×10^4 a 8.1×10^5 conidios/mL en 2 días con límites de 1.9-2.1 días, mientras que Ma AGG28 la CL_{50} fue de 1.6×10^6 conidios/mL, límites de confianza de 3.5×10^5 a 5.1×10^6 conidios/mL en 2.7 días con límites de 2.6 a 2.8 días.

Para caracterizar las proteínas extracelulares de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se evaluaron 4 métodos de precipitación, determinando que el método de precipitación con acetato de amonio al 0.1 M en metanol absoluto resultó ser más eficiente en cuanto a resolución y calidad. Los resultados de la caracterización de las proteínas mediante el software GelScape reveló un total de 40 spots claramente diferenciales en las secreciones de *B. bassiana* en un rango de pH de 5.6-7.5 y una masa molecular de 19-102 kDa, mientras que en *M. anisopliae* el rango fue de pH 4.4-9.3 y una masa molecular de 15- 120 kDa.

ABSTRACT

Ten isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* were selected in this work from the entomopathogenic fungi collection at CIIDIR - Sinaloa, these isolates were subcultured using Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium for isolates maintenance. Bioassays were used to determine which isolates were most pathogenic, and caused mortality of *Acanthoscelides obtectus*. In addition, virulence parameters CL_{50} and TL_{50} of the highly pathogenic isolates were determined. Two isolates of *B. bassiana* AGG24 and *M. anisopliae* AGG28 were selected due to their highest mortality, and then the extracellular secretions were analyzed in the culture medium containing 1 % of powdered insect (induced medium), as well as in the medium without insect (non induced medium).

The isolates Bb AGG24 and Ma AGG28 presented the highest pathogenicity causing a mortality rate of 84.9 and 64% respectively. CL_{50} and TL_{50} was determined for each one. Bb AGG24 presented a CL_{50} of 9.2×10^4 conidia/mL with 8.2×10^4 and 8.1×10^5 conidia/mL as upper and lower confidence limits respectively and a TL_{50} of 2 days, with 1.9-2.1 days as limits, while Ma AGG28 showed a CL_{50} of 1.6×10^6 conidia/mL, 3.5×10^5 to 5.1×10^6 conidia/mL of confidence limits and 2.7 days with 2.6 to 2.8 days as limits.

To characterize the extracellular proteins secreted by *B. bassiana* and *M. anisopliae* four protein extraction methods were evaluated, determining that the precipitation with ammonium acetate 0.1 M in absolute methanol was the most efficient method in terms of resolution and quality. Protein characterization results using the GelScape software revealed a total of 40 clear spots in secretions of *B. bassiana* in a range of pH from 5.6 to 7.5 and a molecular mass from 19 to 102 kDa, while *M. anisopliae* spots were observed in a pH range from 4.4 to 9.3 and a molecular mass from 15 to 120 kDa.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de muestreo de suelo para la obtención de aislados con potencial entomopatógeno contra <i>S. frugiperda</i>	31
Cuadro 2. Hongos entomopatógenos aislados de suelos procedentes de sitios diferentes del Estado de Sinaloa.....	34
Cuadro 3. Resultados obtenidos durante 24 horas de incubación, para la variable porcentaje de germinación de acuerdo a los medios de cultivo evaluados.....	48
Cuadro 4. Mortalidad de <i>A. obtectus</i> tratados con diferentes concentraciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>A. obtectus</i>	6
Figura 2. Aislamiento de <i>M. anisopliae</i> AGG28 en medio de cultivo PDA.....	15
Figura 3. Langosta roja infectada por <i>M. anisopliae</i> “muscardina verde”	15
Figura 4. <i>M. anisopliae</i> visto a 40X.....	16
Figura 5. Micelio de <i>B. bassiana</i> en medio de cultivo PDA	18
Figura 6. Muscardina blanca en gorgojo del maíz causada por <i>B. bassiana</i>	19
Figura 7. Propagación de aislados de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en medio PDA.....	33
Figura 8. Cría masiva de <i>A. obtectus</i> (A), diferenciación sexual mediante dimorfismo sexual	36
Figura 9. Conteo de conidios en la cámara de Neubauer, cuadros marcados de verde son los utilizados para dicho conteo	37
Figura 10. Aplicación tópica de <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones sobre adultos de <i>A. obtectus</i>	39
Figura 11. Mortalidad de <i>A. obtectus</i> con diferentes aislados de <i>B. bassiana</i> a los 5 días	50

Figura 12. Mortalidad de <i>A. obtectus</i> tratado con diferentes aislados de <i>M. anisopliae</i>	51
Figura 13. Gorgojo pardo infectado por a) <i>M. anisopliae</i> “ muscardina verde”, y b) <i>B. bassiana</i> “muscardina blanca” visto al estereoscopio de 10X.....	51
Figura 14. Análisis SDS-PAGE de proteínas extraídas con acetato de amonio 0.1 M en metanol absoluto	54
Figura 15. Análisis 2D-SDS-PAGE de secreciones de <i>B. bassiana</i> en medio inducido con el método de extracción acetato de amonio 0.1M en metanol	56
Figura 16. Análisis 2D-SDS-PAGE de secreciones de <i>M. anisopliae</i> en medio inducido con el método de extracción acetato de amonio 0.1M en metanol	56

GLOSARIO

Control biológico de plagas. Estrategia que utiliza organismos vivos y/o sus productos del metabolismo para reprimir o repeler poblaciones de plaga.

Cutícula. Es la capa más externa del tegumento, secretada por la epidermis, se encuentra formada por la epicutícula, procutícula y endocutícula.

Electroforesis. La migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos negativos- y +), en dependencia de una combinación de sus cargas, peso molecular y estructura tridimensional.

Dimorfismo sexual. Diferencias físicas entre machos y hembras de una misma especie.

Larvas. Son denominadas así, las formas juveniles de todos los insectos con una metamorfosis completa en su desarrollo para convertirse en adultos. Las larvas carecen de alas y ojos compuestos y suelen tener formas de gusano.

Micelio. Estructura vegetativa de los hongos, constituidas por filamentos llamadas hifas.

Pigidio. Parte final del abdomen en forma de punta.

Pupa. Estado del ciclo vital de algunos insectos en el que se transforman los tejidos de la larva y se forman las estructuras del adulto; mientras, el insecto permanece en el interior de un capullo protector o vaina endurecida. En esta fase el insecto no se alimenta y permanece en estado de reposo.

Plaga. Cualquier insecto, ácaro, molusco, roedor, ave, mamífero, maleza o planta parásita, patógeno de plantas, o nemátodo que afecta el rendimiento de un cultivo de forma negativa.

Quitina. Es un polisacárido compuesto por unidades de N-acetilglucosamina, unidas entre sí por enlaces β -1,4.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las prácticas de la agricultura moderna el uso de los insecticidas químicos ha permitido el control eficaz de insectos plaga incrementando considerablemente los rendimientos de los cultivos. Sin embargo, se ha establecido que estos compuestos son perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas; además favorecen la selección de insectos plaga resistentes, motivando el uso de dosis cada vez mayores o de productos más tóxicos (Asaff *et al.*, 2002). Por esta razón, actualmente se utiliza el manejo integrado de plagas (MIP), que es el uso de diversas estrategias de control efectivas y menos contaminantes, que permiten disminuir o evitar el uso de los insecticidas químicos. Una de esas prácticas es el control biológico, el cual hace uso de los enemigos naturales o patógenos de los insectos, entre los que se encuentran cierto tipo de organismos entomopatógenos como: hongos, bacterias, nematodos y virus (Monzón, 2001).

En nuestro país, uno de los principales granos presentes en la dieta de los Mexicanos es el frijol, el cual proporciona una cantidad adecuada de proteínas, vitaminas y minerales esenciales para la alimentación (Broughton *et al.*, 2003). Sin embargo, este grano, una vez almacenado es atacado frecuentemente por *Acanthoscelides obtectus* (Say), conocido comúnmente como “gorgojo pardo”; proporcionándole al frijol un aspecto indeseable para su comercialización y consumo, trayendo consigo pérdidas económicas importantes para los productores (García y Medrano, 2006).

Los hongos entomopatógenos (HE) son organismos heterótrofos que poseen células quitinizadas, normalmente no móviles. En la naturaleza los HE pueden controlar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos, estos hongos se encuentran en rastrojos de cultivos, estiércol, suelo, y plantas, alcanzando un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con baja luminosidad. Los HE son el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos-plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos (Becerra *et al.*, 2006; Tajick *et al.*, 2009). Actualmente se conocen 100 géneros y 700 especies de HE (Monzón,

2001), siendo los más utilizados *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* debido a su facilidad de producción, al rango de hospederos, a la capacidad de producir epizootias y por criterios ecológicos (Mata, 2008). Los HE son un grupo de organismos que se caracterizan por atacar generalmente estadios inmaduros de insectos (larvas), así como adultos produciendo epizootias. Dentro de estos hongos los más importantes son los de la división Deuteromycota debido a que incluyen la mayoría de las especies conocidas como patógenos de insectos, y a la mayoría de los géneros considerados como promisorios en el control microbiano, además las clases de esta división se caracterizan por ser productores de conidios; por lo que se conocen como hongos imperfectos ya que carecen de reproducción sexual, o por lo menos aún no se conoce.

Lo anterior indica la posibilidad de encontrar aislados nativos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con patogenicidad y virulencia contra el gorgojo del frijol.

En el presente trabajo se planteó caracterizar el secretoma de aislados nativos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, tanto en medio inductor como no inductor, así como la evaluación de su patogenicidad y virulencia sobre *A. obtectus*. Esta investigación permitirá establecer las bases para el estudio de los proteomas de HE, y con esto entender el papel de las proteínas en el (los) mecanismo(s) de acción sobre esta plaga.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del frijol

En nuestro país uno de los principales granos presentes en la dieta es el frijol, ocupando éste un lugar importante en la dieta diaria de los mexicanos (García y Medrano, 2006), el grano proporciona una cantidad adecuada de proteínas, vitaminas y minerales esenciales para la alimentación del ser humano. Sin embargo, una vez almacenado es atacado frecuentemente por *A. obtectus* (Say), conocido comúnmente como “gorgojo pardo”, proporcionándole al frijol un aspecto indeseable para su comercialización y consumo, trayendo consigo importantes pérdidas económicas para los productores (Fao,1993).

En México, en el año del 2010 se sembraron 1,887,176 ha de frijol, las cuales produjeron un total de 1,156,257 ton; de las cuales Sinaloa produjo 225,320 ton, ocupando el segundo sitio en producción después de Zacatecas con 265,038 ton. El frijol crece bajo sistemas de cultivo diferentes (riego y temporal) y las variaciones que se presentan en su rendimiento dependen de los factores socioeconómicos y climáticos (SIAP-SAGARPA, 2010; García y Medrano, 2006).

El “gorgojo pardo del frijol” es una importante plaga en México, por presentar una distribución amplia, así como por sus hábitos y ataque al cultivo en campo y en los granos de frijol en almacén (Flore *et al.*, 2008). Las pérdidas causadas por el ataque de *A. obtectus* van del 5 al 100% si no se realizan acciones de control (Fernández *et al.*, 2009). Sin embargo, en México se ha estimado que los gorgojos causan de 30 a 50% de pérdidas en frijol negro almacenado (García, 2007).

Los daños causados por gorgojos a nivel mundial se estiman que son de alrededor del 13%; y se clasifican en cuantitativos, % semillas afectadas, mientras que los cualitativos se caracterizan por presencia de semillas contaminadas con excremento o partes del cuerpo del insecto. El insecto consume el embrión y/o endospermo de la semilla; en consecuencia se reduce el peso y disminuye la

germinación así como las reservas nutricionales, provocando su baja cotización en el mercado, ya que los consumidores e industriales rechazan el producto (Cardona y Corneja, 1999).

2.2. Taxonomía del gorgojo pardo del frijol

Reino	Animal
Phylum	Artropoda
Clase	Insecta
Orden	Coleoptera
Superfamilia	Chrysomeloidae
Familia	Chrysomelidae
Género	<i>Acanthoscelides</i>
Especie	<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say, 1831).

2.2.1. Morfología de *A. obtectus*

Los huevos de este organismo son muy pequeños (miden de 0.7 mm de largo por 0.3 mm de ancho), y hialinos cuando recién puestos, pero a medida que avanza la incubación se tornan color blanco, distinguiéndose con claridad del sustrato en que fueron depositados. La ovoposición es aislada o en grupos no compactos (López, 2011).

Las larvas recién nacidas miden 0.5 mm de largo y 0.2 mm de ancho; en la última etapa de desarrollo alcanzan de 4.0 a 4.5 mm de largo, son de tipo vermiforme, ápodas, de color blanco y con segmentos bien pronunciados, su cabeza es muy reducida (López, 2011).

Las pupas tienen 4 mm de largo y 2 mm de ancho, son de tipo exarata, con cabezas, patas y élitros libres; recién formadas en esta etapa se asemejan a un adulto momificado de color blanco, pero luego se oscurecen (López, 2011).

En la etapa adulta esta especie de insectos alcanza de 3.5 a 4 mm de largo, de color pardo ceniciento y con ligeras estrías longitudinales de color ceniza y oscuro, alternadas, en los élitros; las coxas posteriores, el abdomen y pigidio son rojizos. El cuerpo tiene contorno oval, con la cabeza libre, inclinada, que se prolonga en un rostro corto y achatado, los ojos están bien desarrollados, las antenas tienen once segmentos, las patas posteriores son más robustas que las anteriores, tibia con una espuela, en ambos sexos los élitros son cortos dejando expuesto el último segmento abdominal, pero con alas desarrolladas. Las hembras son más grandes que los machos, la curvatura de la extremidad de su pigidio no es tan acentuada y su abertura anal es terminal, en los machos el pigidio es bastante recurvado, en éste la abertura anal está ubicada en posición ventral y presenta una curvatura media ventral, visible al microscopio, que en la hembra aparece recta, otra diferencia es que las vellosidades abdominales son más claras en el macho que en la hembra (López, 2011).

2.2.2. Biología y hábitos de *A. obtectus*

Durante el ciclo de vida del gorgojo se pueden apreciar distintas etapas esquematizadas en la Figura 1.

1) Huevos: Son depositados en la planta, dentro de las vainas maduras o próximas a secarse, preferentemente en el sitio de unión de las valvas de las vainas o aprovechando grietas de las mismas; en estos lugares pueden ser introducidos de dos a cuarenta huevos, la duración de incubación es de cuatro días (López, 2011).

2) Larvas: atacan a los granos, se desarrollan y se alimentan dentro de la vaina, así pasan generalmente sin ser detectadas a los depósitos donde se

multiplican con mucha facilidad, el estado larvario por término medio dura 20 días (López, 2011).

3) Pupas: Las pupas, permanecen todo el tiempo dentro del grano, al finalizar su período de cinco días, nacen los adultos, quedándose en el mismo lugar durante aproximadamente un día. (López, 2011).

Con la finalidad de mantener su desarrollo, la larva se alimenta continuamente sintetizando enzimas digestivas. Entre ellas están las cisteína proteasas las cuales son primeramente producidas como precursores inactivos (procisteinas) (Silva, 2007).

4) Adultos: Vuelan solo durante todo el día, realizan migraciones hasta de 100 m hacia plantas de frijol con vainas maduras, aunque tal movimiento en campo no es esencial; allí el macho copula con varias hembras, el período de vida de un adulto es de 20 días (López, 2011).

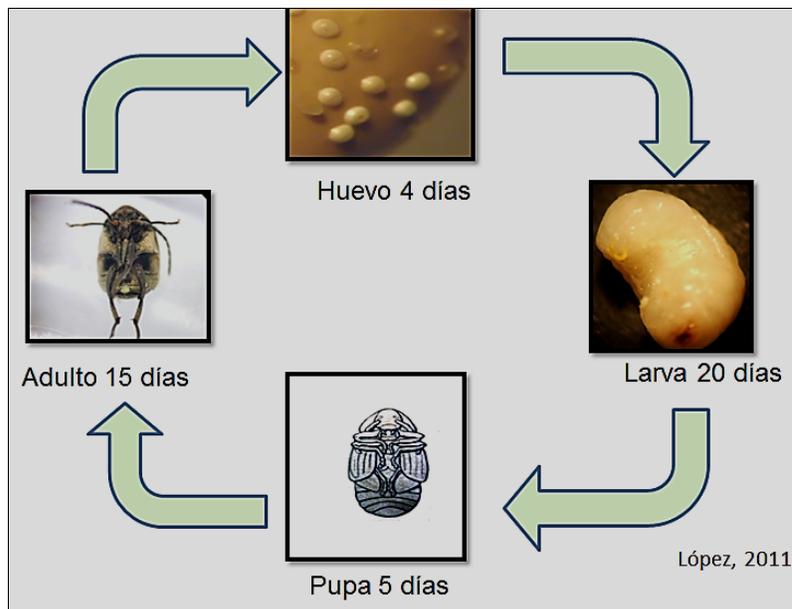


Figura 1. Ciclo de vida de *A. obtectus*.

2.3. Bioplaguicidas

En el transcurso de los años, el humano ha encontrado en los microorganismos una fuente de insecticidas altamente selectivos, eficientes y amigables con el medio ambiente (García y Medrano, 2006). De los microorganismos estudiados se sabe que los HE *B. bassiana* y *M. anisopliae* producen una serie de toxinas (subtilisinas PR1H, serina proteasas, tripsina) eficientes en el control biológico de insectos plaga (Castillo, 2006; Murad *et al.*, 2008).

El combate de insectos plagas para mantener los cultivos de importancia agrícola ha sido una preocupación del hombre desde tiempos remotos. Muchas sustancias de diversos orígenes (químico, botánico y animal) fueron empleadas para combatirlos. Más de 2,000 años A.C., los chinos (2,700 A.C.) ya conocían enfermedades en el gusano de seda y en las abejas y los sumerios (2,500 A.C.) utilizaban el azufre para controlar algunas plagas de insectos. Posteriormente, los egipcios (1,200 A.C.) empezaron a utilizar para el control de algunas plagas la cicuta (*Conium maculatum*) y el acónito (*Aconitum napellus*) que eran plantas bien conocidas por sus propiedades venenosas. Para el año 70 A.C. Plineo el grande recomendó el uso de arsénico para matar insectos, pero fue en realidad hasta el siglo XVI cuando los chinos usaron este elemento además de sulfuro para el mismo propósito (Citado en García y Medrano, 2006).

En el siglo XVIII Réamur (1726) había identificado el hongo *Cordyceps* atacando a un lepidóptero. Pero no fue sino hasta los siglos XIX y XX que los hongos fueron utilizados preponderantemente para el control de plagas en los primeros trabajos en el control microbiano. Esto se vio claramente reflejado cuando en 1835 Agostino Bassi comprobó que el hongo *B. bassiana* (Bals) era el causante de la muscardina blanca en el gusano de seda (Alves, 1998).

En 1873 Le Conte hizo la primera propuesta formal para hacer uso del control microbiano de insectos y 5 años más tarde Metchnikoff (1878) aplicó por primera vez el hongo *M. anisopliae* (Metchnikoff) para controlar larvas de *Anisopliae*

austriaca y a partir de este hallazgo de 1879 a 1884 Metchnikoff junto con Krassiltschik experimentaron con el hongo *M. anisopliae* y establecieron la primera planta operacional de producción para un agente de control microbiano para aplicarlo a un curculiónido en betabel de Ucrania (Lord, 2005).

No obstante, todos los avances que habían ocurrido respecto al control biológico, para el siglo XX los químicos sintéticos se utilizaban comúnmente para controlar las plagas de insectos (Edwards, 2000).

Después de la segunda guerra mundial, los insecticidas químicos así como algunos otros agroquímicos formaron parte de la llamada Revolución Verde y ofrecieron grandes ventajas junto con los fertilizantes químicos, la mecanización y el uso de variedades altamente productoras. Esto dio como resultado una disminución considerable en las poblaciones de una gran variedad de insectos plaga y estos compuestos se hicieron muy populares debido a la larga acción residual y al amplio aspecto de toxicidad que presentaban. No obstante, la era de los verdaderos insecticidas químicos sintéticos empezó a partir de 1940 con el descubrimiento de los insecticidas organoclorados y organofosforados y a finales de esta misma década los Estados Unidos se había hecho altamente dependiente del uso de los insecticidas químicos, como el DDT, los cuales eran aplicados durante toda la temporada de cultivo para combatir a los insectos en toda su fase de desarrollo (Citado en García y Medrano, 2006).

Sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos causó a principios de la década de 1950 el resurgimiento de las plagas debido a la eliminación de sus enemigos naturales, la aparición de organismos previamente inocuos que se transformaron en plagas primarias, la resistencia debido a la difícil eliminación aun cuando se aplicaran químicos en dosis muy altas, y los riesgos causados por la presencia de residuos químicos sintéticos en productos comestibles, agua y aire; lo que trajo como consecuencias serios problemas ambientales. Estos hechos condujeron a enfocar la atención hacia el uso y la aplicación de los agentes de control biológico, entre los que se incluyen enemigos naturales tales como depredadores, parásitos y patógenos (Margalith y Ben, 2000).

2.3.1. Bioplaguicidas usados en granos almacenados

El control de insectos plaga en granos almacenados puede ser muy difícil por la variedad de especies que pueden infestar los granos. Se encuentran muchas proteínas biocidas que existen en la naturaleza que son bioplaguicidas potenciales que ofrecen protección a granos almacenados. Una de las proteínas es la “avidina” (glicoproteína de 69 kDa) del maíz transgénico, esta proteína causa mortalidad en muchas especies de insectos de productos almacenados evitando la absorción de la biotina dietética. Cuando la avidina está presente en el grano del maíz a concentraciones aproximadas de 100 ppm o más, evita el desarrollo de casi todas las plagas que infectan el maíz durante el almacenamiento incluyendo a *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitotoga cerealella*, *Trogoderma variable*, *Orizaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus*, *Triboleum castaneum*, *T. confusum*, *Plodia interpunctella* y *Anagasta kuehniella* (García y Medrano, 2006).

Los efectos negativos causados sobre el ambiente y la salud, el desarrollo de cepas genéticamente resistentes, la falta de abastecimiento y los costos prohibitivos han sido la principal preocupación que ha dado ímpetu a la búsqueda de métodos alternativos de control de plagas para reducir el uso de insecticidas sintéticos. Sin embargo, los insecticidas sintéticos son el método más ampliamente utilizado para el control de plagas de productos almacenados en la actualidad (García y Medrano 2006).

2.4. Hongos entomopatógenos y su mecanismo de acción

La característica por la cual se descubrió por primera vez que organismos producían enfermedades a insectos plagas, fue por las estructuras macroscópicas que forman los hongos al infectar a sus hospedantes. Sin embargo, algunos HE no producen crecimiento superficial o se desarrollan muy poco.

La clasificación taxonómica hecha por Ainsworth 1973 (Citado en Soto, 2008), separa los hongos en dos divisiones: Mixomycota por formar plasmodios y Eumycota por no formarlos y ser frecuentemente miceliales. Los HE se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (Species, 2000).

Los HE tienen un mecanismo complejo que les permite penetrar y asimilar los materiales del hospedero, y a la vez evadir los mecanismos de defensa por parte del insecto. Los hongos penetran a través de la cutícula, la cual está compuesta principalmente de proteínas, quitina, lípidos y compuestos fenólicos, los cuales funcionan como una barrera contra la invasión de microorganismos y medio ambiente (Hegedus y Khachatourians, 1995).

El proceso se inicia cuando la espora se adhiere a la cutícula del insecto, luego se desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración (apresorio), la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente, lipasas, proteasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Los propágulos germinativos de los hongos, están continuamente en movimiento a través de diferentes partes durante la penetración cuticular, éstos responden a cambios por estímulo de los procesos bioquímicos hasta originar una diferenciación celular y formar estructuras morfológicas específicas (Hajek y Leger, 1994). Las interacciones hidrofóbicas, la producción de mucosidad y apresorios por el hongo influyen en la adhesión del hongo a la cutícula del insecto (Bidochka *et al.*, 1997).

Los tubos germinativos constantemente detectan su medio y se adaptan para colonizar el tejido del insecto y contrarrestar el potencial de respuestas del

hospedero, estas estructuras infecciosas probablemente evolucionaron como un mecanismo con el cual el patógeno supera las barreras del hospedero (Hajek y Leger, 1994).

Durante la infección, la epicutícula es la primer barrera en cruzar (Leger *et al.*, 1988), la penetración de ésta puede realizarse por infección a través de ganchos producidos por apresorios, o por la entrada directa de los tubos germinativos, las hifas que penetran en la procutícula (Leger, 1993).

Una vez que la epicutícula es perforada, el inicio de la penetración a través de la cutícula puede ser vía directa por hifas o estructuras que se pueden extender lateralmente, esta expansión lateral puede causar fracturas que favorecen el proceso y facilitan la dispersión de las enzimas fúngicas degradadoras de la cutícula (Hajek y Leger, 1994).

Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. Al invadir el hemocele, el hongo prolifera, y el micelio de los tubos germinativos libera blastosporas (Hegedus y Khachatourians, 1995). Las blastosporas se desarrollan para su dispersión a través del hemocele (Leger, 1993). Éstas usualmente germinan a las 48 h después de la infección, (Todorova *et al.*, 1994). El hongo prolifera dentro del cuerpo del hospedero, frecuentemente como un estado de vida que no sobrevive naturalmente fuera del hospedero (Hajek y Leger, 1994).

El insecto infectado muere debido a la reducción drástica de su hemolinfa, nutrientes y la toxemia causada por los metabolitos tóxicos del hongo (Feng *et al.*, 1994), o bien, por la combinación de éstos con el daño mecánico producido por el crecimiento del hongo (Hajek y Leger 1994; Bidochka *et al.*, 1997). En ocasiones el cuerpo graso puede ser infectado inmediatamente después de la penetración a la cutícula, mientras que otros tejidos y órganos permanecen intactos por más de una semana, o son colonizados hasta después de la muerte (Hegedus y Khachatourians, 1995).

Bajo condiciones húmedas, uno o dos días después de que el hospedero muere, el hongo emerge y produce una capa de conidias en la superficie del cadáver (Feng *et al.*, 1994; Goettel *et al.*, 1995). A partir de la muerte del insecto se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad la cual ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación.

La virulencia, patogenicidad y agresividad son conceptos comunes en el lenguaje técnico propuesto para los HE, virulencia es definida como el grado de patogenicidad con que un organismo mata a un hospedero específico, patogenicidad como la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad y agresividad como la habilidad de un patógeno para invadir a su hospedero (Carrillo y Blanco, 2009).

La importancia de estos mecanismos varía con el aislado específico del hongo o el hospedero (Hajek y Leger, 1994).

2.4.1. Acción de las quitinasas, proteasas y lipasas durante la infección

El éxito de la penetración de la cutícula de los insectos por *B. bassiana* depende principalmente de varias enzimas hidrolíticas que degradan las proteínas, quitinas y lípidos en el integumento del insecto y proporcionan nutrientes para el hongo (Feng *et al.*, 1994; Hegedus y Khachatourians, 1995).

Los niveles de enzimas específicas que degradan la cutícula como la lipasa, quitinasa, proteasa, quimoelastasa, y quimotripsina tienen relación con los parámetros de virulencia específica (Gupta *et al.*, 1994). Varias enzimas patogénicas son importantes al determinar la virulencia debido a que permiten al patógeno coexistir con el proceso de cambios metabólicos asociados con el estado de la enfermedad del hospedero (Hajek y Leger, 1994).

Los lípidos de la epicutícula son la primer barrera en cruzar, por lo que las lipasas son importantes en el proceso de la infección; la composición de estos lípidos incluye 65% de alcanos, 25% de ésteres cerosos secundarios, triglicéridos,

alcoholes, y ácidos grasos; además de lípidos, la epicutícula contiene aminoácidos, y aminoazúcares que funcionan como nutrientes para la germinación del hongo (Bidochka *et al.*, 1997). Los hidrocarburos son los lípidos más comunes y abundantes en la cutícula de los insectos, en *Schistocerca gregaria* constituyen el 76% del total de lípidos extraídos de la cutícula, los lípidos son usualmente mezclas de *n*-alcanos (principalmente C12 a C33) y alcanos ramificados metilados (Leger *et al.*, 1988).

La incapacidad para utilizar los lípidos que predominan sobre la superficie de la cutícula puede reducir la virulencia de algunos hongos; estos lípidos son suficientemente heterogéneos y contribuyen a la especificidad de la relación patógeno-hospedero (Leger, 1993; Kosir *et al.*, 1991). La importancia de las lipasas depende principalmente del sistema de especificidad patógeno-hospedero (Hegedus y Khachatourians, 1995). Los HE *B. bassiana* y *M. anisopliae* poseen lipasas y otras esterasas que son capaces de hidrolizar los lípidos cuticulares de los insectos (Bidochka *et al.*, 1997).

Los estudios preliminares indican que existen dos posibles funciones de los lípidos cuticulares de los insectos en la actividad de los HE; algunos de ellos podrían ser usados como recursos pobremente accesibles de energía para la germinación de la espora. Otros podrían tener una actividad antifúngica específica probablemente expresada en el crecimiento hifal, polaridad, insaturación, o ramificación como longitud de cadenas de los lípidos cuticulares probablemente involucrados en cada proceso. Es necesario realizar investigaciones sobre la posible correlación entre cepas infectivas y los lípidos cuticulares de los hospederos (Lecuona *et al.*, 1997).

La producción constitutiva de niveles de lipasa es evidente cuando *B. bassiana* es propagado en un medio complejo, y la adición de triglicéridos, como el aceite de oliva, inducen en gran cantidad a la actividad de las lipasas sin alterar las características de crecimiento del hongo. Además ciertos ácidos grasos presentes en la cutícula de los insectos, inhiben el crecimiento fúngico y la germinación de la espora (Hegedus y Khachatourians, 1995).

Las lipasas han ganado atención especial por su uso potencial en la biotecnología debido a su disponibilidad y estabilidad (Essamri *et al.*, 1998). La producción de lipasa contribuye significativamente en la penetración y provisión de nutrientes. *In vivo*, la lipasa actúa antes que la quitinasa sobre los lípidos, y como en el caso de las proteínas, pueden situarse como una capa protectora de quitina. Sólo a través de la acción coordinada y combinada de las tres principales enzimas hidrolíticas (lipasas, proteasas y quitinasa) ocurre la desintegración completa de la cutícula (Hegedus y Khachatourians, 1995; Tanada y Kaya, 1993).

2.4.2. Características generales de *M. anisopliae*

El hongo, a los 15 días de desarrollo, presenta un micelio de aspecto algodonoso de color verde oliva, (Figura 2). La colonia es completamente redonda, de color oliváceo, de color amarillento-verdoso a marrón oscuro, dependiendo de la cepa (Ames y Cañedo, 2004).

M. anisopliae es un hongo que produce la enfermedad conocida como “muscardina verde” (Figura 3). Es capaz de infectar más de 300 especies de insectos pertenecientes a los órdenes Coleóptera, Ortóptera, Hemíptera, Díptera y Lepidóptera (St. Leger y Roberts, 1992).

Los conidios son producidos en cadenas cortas o cabezas mucilaginosas diferentemente arregladas; los conidios son cilíndricos u ovals. Miden 3.5 a 9 μm de longitud por 1.5 a 3.5 μm de diámetro (Figura 4).

Los conidióforos nacen del micelio y están irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septa. Miden 14 μm de longitud y 2.5 μm de diámetro.



Figura 2. Aislamiento de *M. anisopliae* AGG28 en medio de cultivo PDA (Mancillas-Paredes 2010)

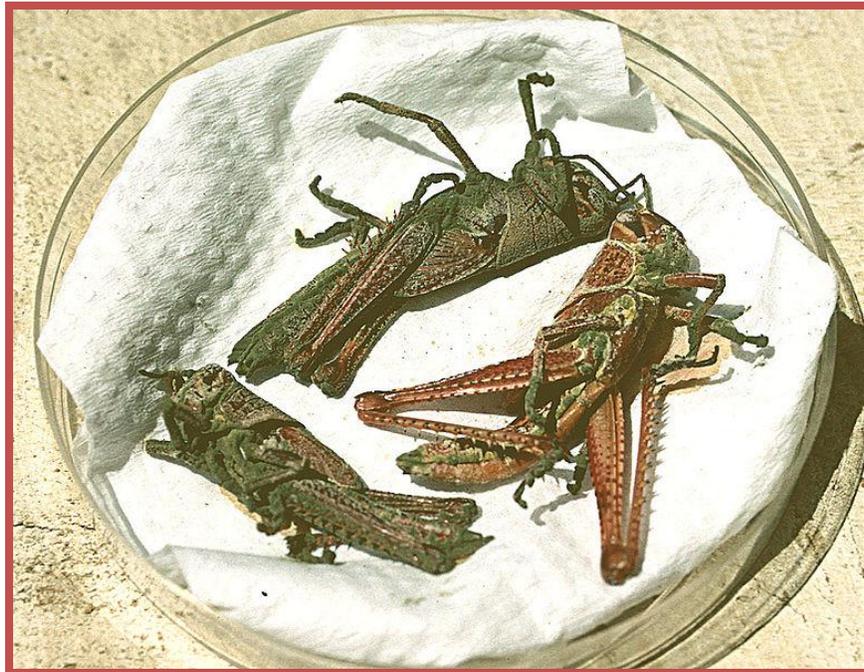


Figura 3. Langostas rojas infectadas por *M. anisopliae* “muscardina verde”

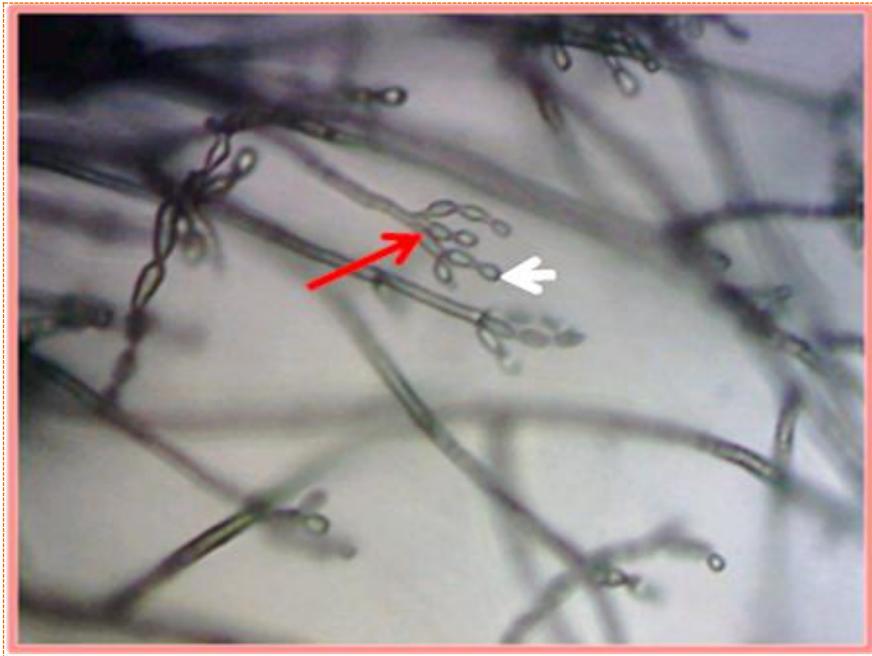


Figura 4. *M. anisopliae* visto a 40X. La flechas roja indica los conidióforos y la flecha blanca los conidios (Mancillas-Paredes, 2011).

2.4.3. Clasificación taxonómica

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Metarhizium</i>
Especie	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin 1883

2.4.4. Proteínas relacionadas con la virulencia y patogenicidad de *M. anisopliae*

Las principales toxinas producidas por este hongo son los depsipéptidos cíclicos, entre los más comunes están las destruxinas, subtilisinas Pr1, serina proteasas, y tripsinas. Fargues *et al.*, (1986) mencionan que la producción de destruxinas está relacionada con la patogenicidad del hongo, pudiendo ser éstas las responsables de la mortalidad del insecto, por lo que han sido consideradas como una nueva generación de insecticidas.

Para inducir la producción de destruxinas ($C_{29}H_{47}N_5O_7$). Tajick *et al.* (2009) inocularon *M. anisopliae* en 50 mL de medio de cultivo PDB (Caldo Papa Dextrosa) dejándolo durante una semana a temperatura ambiente. Se filtró el medio de cultivo utilizando papel Whatman No. 1 y el filtrado se esparció sobre larvas de *Phyllocnistis citrella* minador de los cítricos, observando que los nueve aislados utilizados secretaron destruxinas que intervinieron en la mortalidad del minador de los cítricos.

Numerosas bandas de proteínas se pudieron visualizar en medio inducido (medio con integumento de *Callosobruchus maculatus*) con distinta masa molecular de 27 a 80 kDa. Mientras que en un medio no inducido, carente de integumento de *C. maculatus* únicamente se visualizaron dos bandas de 35 kDa y 57 kDa (Murad *et al.*, 2006).

2.4.5. Características generales de *B. bassiana*

El hongo, a los 15 días de desarrollo forma un micelio de aspecto algodonoso de color blanco (Figura 5). A medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillento. El revés es de color rojizo al centro y amarillento en la periferia, este hongo produce una enfermedad conocida como “muscardina blanca” debido a que los insectos presentan una morfología característica algodonosa en su cuerpo (Figura 6).

El micelio se ramifica formando conidióforos simples e irregulares que terminan en vértices en formas de racimo, el conidióforo es abultado en su base, surgiendo un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios los cuales son globosos de 3 μm de largo y 2 μm de ancho (Ames y Cañedo, 2004).

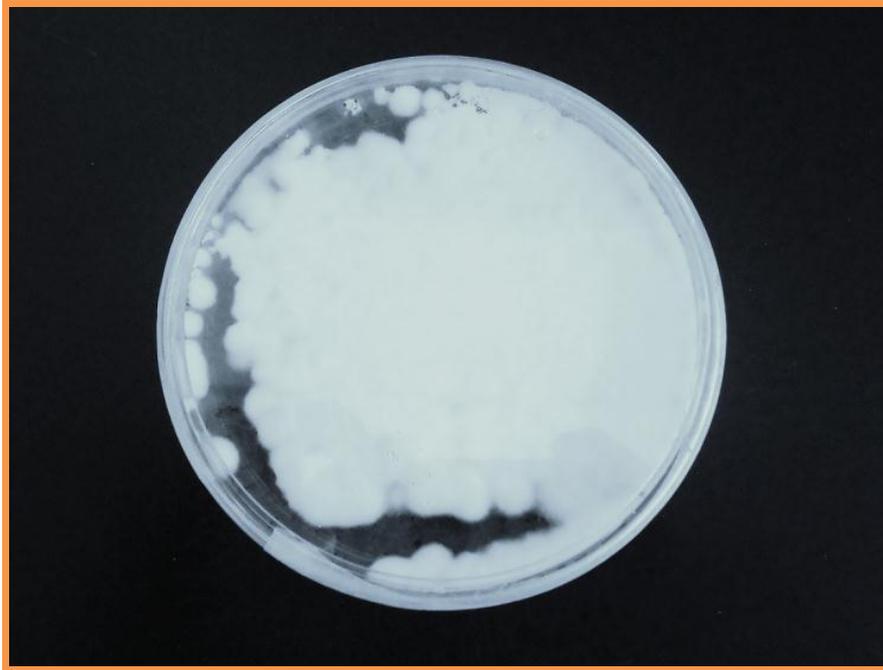


Figura 5. Micelio de *B. bassiana* en medio de cultivo PDA a los 15 días (Mancillas-Paredes, 2011).



Figura 6. “Muscardina blanca” en gorgojo del maíz causada por *B. bassiana*.

2.4.6. Clasificación taxonómica

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. 1912

2.4.7. Producción de enzimas que confieren patogenicidad y virulencia a *B. bassiana*

Samsinakona *et al.* (1971) menciona que *B. bassiana* en medio de cultivo sólido secreta por lo menos tres enzimas: lipasas, proteasas y quitinasas, enzimas necesarias para el paso del hongo a través de la cutícula de los insectos. En base a esto se concluye que las proteasas y lipasas son las primeras enzimas que actúan, mientras que las quitinasas actúan al final.

Fang *et al.* (2005), lograron purificar de un medio de cultivo líquido con quitina coloidal una quitinasa de 33 kDa y un pI de 5.4, la cual posteriormente fue clonada en cepas de *B. bassiana* mostrando una sobreproducción de ésta la cual disminuyó el tiempo letal medio (TL₅₀) comparada con las cepas silvestres.

Kyu *et al.* (1999), lograron purificar una serina proteasa “Bassiasinina I” con un peso molecular alrededor de 32 kDa mediante SDS-PAGE, así como un pI (punto isoeléctrico) de 9.5.

Se analizó el patrón de bandeo de proteínas en SDS-PAGE al 12%, pudiendo visualizar en medio inducido (con integumento de *C. maculatus*) patrones de bandeo con masas moleculares de 28 kDa, 33 kDa, 55 kDa y 120 kDa; mientras que en medio de cultivo carente de insecto, solo se pudieron visualizar bandas de 22 kDa y 55 kDa. Posteriormente, se realizó electroforesis bidimensional logrando visualizar cuatro spots en medio de cultivo carente de insecto; mientras que en medio de cultivo con integumento de *C. maculatus* se visualizaron 13 spots de los cuales se encontró una quitinasa de 33 kDa y un pI de 5.4, una quitosanasa con una masa molecular de 28 kDa y un pI de 4.0 (Murad *et al.*, 2007)

Quesada y Vey (2004) aislaron de *B. bassiana* una proteína denominada Bassiacridina de 60 kDa y pI de 9.5, una proteína tóxica para *Lacustra migratoria*.

2.5. Proteómica

La secuenciación del genoma de diferentes organismos está relacionada a mejorar nuestro conocimiento sobre la biología de los mismos. Sin embargo, la función de los productos proteicos de muchos de los genes aún se desconoce. La proteómica es la disciplina que relaciona las proteínas con sus genes (Ferrer, 2005).

El proteoma, término acuñado en 1994 por M. Wilkins, puede definirse como el total de proteínas expresadas por un genoma y la proteómica como la genómica funcional a nivel de las proteínas. Las células sintetizan varios miles de proteínas diferentes y cada una de ellas puede presentar numerosas modificaciones post-traduccionales dinámicas en respuesta a diferentes estados metabólicos y a microambientes cambiantes, lo cual incrementa de manera significativa el número de proteínas presentes. La proteína también puede interactuar para formar complejos con otras macromoléculas; estas interacciones varían en función del estado fisiológico. Por tanto, el proteoma es la imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por un organismo, célula, o compartimiento subcelular concreto en un momento dado y bajo determinadas condiciones, constituyendo el mapa de expresión proteica de una célula, tejido u organismo dado (Ferrer, 2005).

Básicamente, la proteómica pone en juego un conjunto de técnicas destinadas a resolver (geles de poliacrilamida, tanto monodimensionales como bidimensionales de alta resolución, cromatografías), identificar y caracterizar (espectrometría de masas (MS), secuenciación de proteínas por degradación de Edman, Western blot) y cuantificar proteínas (escáner, phosphorimager), así como almacenar los resultados en bancos de datos (bancos de datos de geles 2D y proteínas), comunicar y entrecruzar información con las secuencias de ADN y proteínas que aportan los proyectos del genoma (Citado en Ferrer, 2005).

La electroforesis bidimensional combinada con la identificación de proteínas por espectrometría de masas es ahora la herramienta de uso más general en proteómica. Si bien últimamente están emergiendo nuevas técnicas alternativas o

complementarias (marcaje con isótopos estables, arreglos de proteínas o anticuerpos, etc.) la electroforesis bidimensional es actualmente una de las técnicas más ampliamente utilizada que puede, de forma rutinaria, reportar los niveles de expresión de mezclas complejas de proteínas, tales como lisados celulares totales (Pandey y Mann, 2000).

La electroforesis bidimensional permite la separación de mezclas complejas de proteínas según su punto isoeléctrico (pI), masa molecular (kDa), solubilidad y abundancia relativa. Crea un mapa de proteínas intactas, que refleja los cambios en niveles de expresión, isoformas o niveles post-traduccionales. En efecto uno de los puntos fuertes de la electroforesis bidimensional es la capacidad de estudiar las modificaciones post-traduccionales tales como fosforilaciones, glicosilaciones o proteólisis limitada, ya que estas modificaciones hacen que las proteínas aparezcan en distintos puntos, ya sea en el eje vertical (variación de masa molecular) o en el eje horizontal (variaciones en el punto isoeléctrico) (Jensen, 2000).

2.5.1. Preparación de la muestra

Un método apropiado para la preparación de la muestra es absolutamente esencial para obtener buenos resultados en la electroforesis bidimensional. Debido a la gran diversidad de muestras, solo pueden darse unas líneas generales de la preparación de la muestra. El procedimiento óptimo debe ser empleado empíricamente para cada muestra. Idealmente el proceso de preparación de la muestra debe resultar en una completa solubilización, disgregación, desnaturalización y reducción de las proteínas en la muestra para romper todas las interacciones moleculares y asegurarse de que cada punto represente un polipéptido individual (Görg *et al.*, 2000). La preparación de la muestra debe ser tan simple como sea posible para incrementar la reproducibilidad, de hecho un solo paso en la preparación de la muestra sería altamente deseable. La solubilización de la muestra se realiza normalmente con un tampón que tiene

agentes caótopos (urea/tiourea), detergentes no iónicos (CHAPS, Tritón X-100, etc.), agentes reductores (DTT, TBP), anfolitos y dependiendo de la muestra inhibidores de proteasas.

2.5.2. Primera dimensión: isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es un método electroforético que separa las proteínas en base a su punto isoeléctrico (pI). Las proteínas son moléculas anfotéricas; llevan carga positiva, negativa o carga neta cero dependiendo del pH del medio en que estén. La carga neta de una proteína es la suma de todas las cargas negativas y positivas de las cadenas laterales de los aminoácidos que las componen, así como los extremos amino y carboxilo terminales.

El punto isoeléctrico es aquel pH donde una proteína tiene carga neta de cero (Creighton, 1993). Las proteínas están cargadas positivamente en valores de pH inferiores a su pI y negativamente en valores de pH superiores a su pI.

La presencia de un gradiente de pH es crítica en la técnica de isoelectroenfoque. En un gradiente de pH, bajo la influencia de un campo eléctrico, una proteína migrará hasta la posición en el gradiente donde su carga neta es cero. Una proteína con carga positiva migrará hacia el cátodo, volviéndose cada vez menos cargada positivamente a medida que se mueve a través del gradiente del pH hasta que alcanza su punto isoeléctrico. Si una proteína migra más allá de su punto isoeléctrico, inmediatamente gana carga y migra otra vez hacia su punto isoeléctrico. Este es lo que se llama “enfoco” de la técnica de isoelectroenfoque, el cual concentra proteínas en su punto isoeléctrico y permite la separación de proteínas aunque las diferencias de sus cargas sean muy pequeñas.

Cuando las proteínas han alcanzado su posición final en el gradiente de pH, hay un movimiento iónico muy pequeño en el sistema, generando una corriente muy baja (típicamente por debajo de 1 μ A). El isoelectroenfoque de una muestra determinada es generalmente conseguido por un número de voltios-hora,

constante, siendo voltios-hora la integral de los voltios aplicados a lo largo del tiempo. El isoelectroenfoque llevado a cabo bajo condiciones desnaturalizantes, proporciona una mayor resolución y unos resultados más claros. Así, es muy importante llevar a cabo una buena preparación de la muestra.

El método original para la primera dimensión, isoelectroenfoque (O'Farrell, 1975) depende de un gradiente de pH generado por anfolitos en una tira de acrilamida. Los anfolitos son moléculas pequeñas, solubles y anfóteras con una elevada capacidad de tamponar cerca de su punto isoeléctrico. Cuando se aplica un voltaje a través de una mezcla de anfolitos, los anfolitos con mayor pI (por tanto los más negativamente cargados) migran hacia el ánodo y los anfolitos con pI más bajos (por lo tanto los más positivamente cargados) migran hacia el cátodo. El resto de los anfolitos se alinean entre los extremos de acuerdo con su pI y tamponan sus alrededores de acuerdo a sus pH. El resultado es un gradiente continuo de pH.

A pesar de que este método básico ha sido estudiado en cientos de estudios de electroforesis bidimensional, éste tiene ciertas limitaciones:

- 1- Los anfolitos son mezclas de polímeros que no están bien caracterizados y que varían mucho entre lote y lote. Esta variabilidad reduce la reproducibilidad de la separación llevada a cabo en la primera dimensión.
- 2- Los gradientes de pH generados por anfolitos son inestables y tienden a marchar lentamente hacia el cátodo a lo largo del tiempo.
- 3- Las tiras de acrilamida utilizadas en estos casos tienen una resistencia mecánica muy pequeña, lo que hace difícil su manejo.

Con el resultado de estas limitaciones y problemas que conlleva el uso de anfolitos Görg *et al.*, (2000) desarrollaron los gradientes inmobilizados de pH (IPGs). Un IPG se forma por la incorporación covalente de grupos tamponadores ácidos y básicos en el gel de poli(acrilamida) mientras éste se prepara.

Los gradientes de pH inmovilizados se forman usando dos soluciones, una es una mezcla relativamente ácida de tampones en acrilamida y la otra una mezcla relativamente básica. La concentración de varios tampones en las dos soluciones define el rango de pH de la tira de isoelectroenfoque. Ambas disoluciones contienen monómeros de acrilamida y catalizadores para la polimerización. Durante la polimerización, la porción de la acrilamida que contiene los tampones generados del gradiente de pH copolimerizan con la acrilamida y bis-acrilamida para formar el gel de poliacrilamida.

Para facilitar el manejo, estos geles son polimerizados encima de un plástico de manera que los hace más resistentes.

Una vez polimerizado, el gel es lavado para eliminar los catalizadores y monómeros no polimerizados, que podrían modificar las proteínas e interferir en la separación.

2.5.3. Proteómica de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Los HE son buenos modelos celulares para realizar estudios de proteómica del secretoma, debido a la baja complejidad de sus proteomas. El primer proteoma de secreciones extracelulares de *M. anisopliae* analizado, utilizando electroforesis bidimensional fue en el año 2006 (Murad *et al.*, 2006). En este análisis se pudieron identificar cuatro proteínas en medio mínimo carente de insecto pulverizado (medio con glucosa como única fuente de carbono), mientras en el medio con insecto pulverizado (como única fuente de carbono) se encontraron once proteínas. Solo dos spots con masa molecular de 30 kDa y 37 kDa se encontraron en la misma posición en la comparación de ambos geles (medio carente de insecto contra medio con insecto pulverizado), en contraste con seis spots, 27,35,39,45, 50 y 80 kDa encontrados en el gel con secreciones en medio inducido (medio con insecto pulverizado).

Así mismo en el año 2007 se analizó el primer secretoma de *B. bassiana*, usando electroforesis bidimensional (Murad *et al.*, 2007). En este análisis se pudieron identificar cuatro proteínas en medio mínimo carente de insecto (medio con glucosa como fuente de carbono), mientras que en el medio con insecto pulverizado se encontraron trece proteínas. Todos los spots presentes en medio mínimo presentaron una masa molecular de 10 a 48 kDa, aquellos presentes en medio con insecto pulverizado presentaron una masa molecular de 27 a 120 kDa .

3. JUSTIFICACIÓN

En Sinaloa la principal plaga del frijol en almacén es el gorgojo pardo, el cual provoca pérdidas hasta del 100% y las alternativas de control incluyen el uso de insecticidas químicos principalmente bromuro de metilo y fosfuro de aluminio. Sin embargo, el empleo de insecticidas químicos como métodos de control de esta plaga ha traído como consecuencia la contaminación del ambiente y efectos negativos en la salud humana. Una alternativa viable es la utilización de HE para el control biológico de esta plaga.

Por lo anterior, es de interés científico y práctico contar con la caracterización de las proteínas secretadas que intervienen en la patogenicidad y virulencia de aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control del gorgojo del frijol.

4. HIPÓTESIS

La presencia de insecto pulverizado de *A. obtectus* induce las secreciones de proteínas involucradas en el mecanismo de patogenicidad y virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el proceso de infección.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el secretoma de aislados nativos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y evaluar su patogenicidad y virulencia contra el gorgojo del frijol.

5.1. Objetivos específicos

1. Seleccionar aislados con patogenicidad contra adultos de *A. obtectus*.
2. Determinar indicadores de virulencia de los aislados seleccionados (CL₅₀ y TL₅₀).
3. Determinar el secretoma de los aislados más virulentos contra *A. obtectus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de colecta de muestras de suelo

Se utilizaron aislados provenientes de diferentes muestreos del Estado de Sinaloa, de los municipios de Ahome, Guasave, Salvador Alvarado y Culiacán (Cuadro 1). Todo el material es proveniente de las colectas realizadas por Gaxiola-Castro (2010).

En cada punto se tomaron cinco muestras utilizando el método de cinco de oros, éstas fueron colectadas de los 15 a 30 cm de profundidad y colocadas en bolsas negras de plástico de 2 kg de capacidad, etiquetadas con la fecha, número de muestra y amarradas con hilo de rafia. Luego se trasladaron al laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, en donde se mantuvieron a temperatura ambiente, con un rango de temperatura de 27 a 30°C.

Cuadro 1. Sitios de muestreo de suelo en el estado de Sinaloa para la obtención de aislados con potencial entomopatígeno contra *S. frugiperda*.

SITIO	ALTITUD (msnm)	UTM	12 R	LUGAR Y MUNICIPIO
1	14	2826553	0745726	San Antonio, Guasave.
2	17	2843068	0732960	Ruíz Cortínez, Guasave.
3	28	2867330	0706760	2 de Abril, Ahome.
4	14	2900118	0693930	El Carrizo, Ahome.
5	30	2853551	0702761	El Burrión, Guasave.
6	103	2801787	0205593	Buena Vista, Salv. Alvarado.
7	65	2757922	0241014	El Tamarindo, Culiacán.
8	68	2750598	0252257	La presita, Culiacán.
9	23	2829361	0748423	Campo Bórquez, Guasave.
10	15	2820858	0750187	El Cubilete, Guasave.
11	19	2828861	0748149	Certenejal, Guasave.

12 R: Regiones en las cuales se divide el mapa de usos horario; UTM: Universal Transversal de Mercator; msnm: metros sobre el nivel del mar.

6.2. Selección de aislados patogénicos

El laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, cuenta con una colección de aislados de HE conservadas en sílica gel a 4 °C, para cumplir con este criterio se escogieron cinco aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, éstos se seleccionaron considerando su mayor velocidad de crecimiento en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), así como mayor esporulación. Estos hongos se aislaron de suelos de diferentes sitios del Estado de Sinaloa (Cuadro 2).

Los hongos se propagaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) debido a ser específico para hongos y levaduras (Figura 7). Sin embargo, no se descartó el crecimiento bacteriano, lo que fue necesario el uso de estreptomycin. Se resembraron cinco aislados de *M. anisopliae* con las claves: Ma AGG4, Ma AGG5, Ma AGG6, Ma AGG27 y Ma AGG28 y cinco de *B. bassiana*, claves: Bb AGG21, Bb AGG22, BbAGG23, Bb AGG24 y Bb AGG29, esto se llevó a cabo mediante la transferencia de un fragmento micelial con un asa bacteriológica a cajas Petri con medio de cultivo nuevo (PDA). La transferencia se llevó a cabo en una cámara de bioseguridad (TelStar™) para evitar una posible contaminación de los hongos y una vez que se realizaban las resiembras, se incubaron en una cámara ambiental marca Scorpion Scientific a 28°C durante 15 días.



Figura 7. Propagación de aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en medio PDA.

Cuadro 2. Hongos entomopatógenos aislados de suelos procedentes de sitios diferentes del Estado de Sinaloa.

Clave del aislado	Especie identificada	Localidad
Ma AGG4	<i>M. anisopliae</i>	Ruíz Cortínez, Guasave
Ma AGG5	<i>M. anisopliae</i>	El Tamarindo, Culiacán
Ma AGG6	<i>M. anisopliae</i>	La Presita, Culiacán
Ma AGG27	<i>M. anisopliae</i>	Buena Vista, Salvador Alvarado
Ma AGG28	<i>M. anisopliae</i>	Ruíz Cortínez, Guasave
Bb AGG21	<i>B. bassiana</i>	El Certenejal, Guasave
Bb AGG22	<i>B. bassiana</i>	Ruíz Cortínez, Guasave
Bb AGG23	<i>B. bassiana</i>	Ruíz Cortínez, Guasave
Bb AGG24	<i>B. bassiana</i>	El Certenejal, Guasave
Bb AGG29	<i>B. bassiana</i>	2 de Abril, Ahome

6.3. Identificación de los aislados

Se llevaron a cabo microcultivos con los 10 aislados de HE para determinar sus características morfométricas. Para realizar el microcultivo se cortaron cuadros de medio PDA de 1 cm², previamente estériles y se colocaron sobre portaobjetos, en los cuales se llevó a cabo la resiembra de los aislados a identificar, esto se realizó con una asa bacteriológica realizando cuatro punciones en cuatro lados de un cuadro de medio PDA (la punta se esterilizó previo al experimento), posteriormente se colocó un cubreobjetos encima del cuadro de PDA. Una vez realizado esto, se colocaron en cajas Petri.

Las cajas Petri se colocaron en una incubadora marca Scorpion Scientific a 28°C con una H.R de 80% ± 3 durante 5 ± 1 días (hasta observar esporulación del hongo), después de dejar crecer se retiró el cubreobjetos y mediante un alfiler se tomó una muestra de tejido hifal la cual se dispersó en un porta-objetos sobre una gota de colorante de azul de metileno, también se tocó levemente la superficie hifal de la colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente, colocándola en un portaobjetos y de esa manera emplear la cinta para observar bajo el microscopio biológico compuesto con el objetivo 40 X las características morfológicas de cada aislado.

6.4. Bioensayos

6.4.1. Cría masiva de *A. obtectus*

Para esto fue necesario visitar a comerciantes de frijol del mercado municipal de Guasave, Sinaloa (10 locales) y mediante una inspección al grano se pudo visualizar la presencia de huevecillos e insectos en éste. Posteriormente, los insectos se trasladaron al laboratorio de Bioinsectidas del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa con la finalidad de reproducirlos y aumentar la población, una vez establecidos en el laboratorio, éstos se mantuvieron en frascos con capacidad de

2 L colocándoles 500 g de semillas de frijol azufrado higuera debido a que es la variedad que mayor demanda tiene en Sinaloa. Finalmente se incubaron a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 70 - 80 % de H.R., los recipientes se agujeraron en la tapadera y en las paredes laterales con la finalidad de proporcionar oxígeno (Figura 8). La identificación del insecto se realizó mediante claves proporcionadas por Martínez (2006).

Se colocaron 100 adultos hembras y 50 adultos machos por cada frasco con la finalidad de reproducirlos (el sexo se puede distinguir porque existe dimorfismo sexual, la hembra es más grande que el macho), al momento de aparecer huevecillos en los granos, éstos se separaron y colocaron en frascos diferentes hasta obtener una F4 y asegurarnos de contar con una cría libre de patógenos. Se utilizaron adultos para realizar el bioensayo.

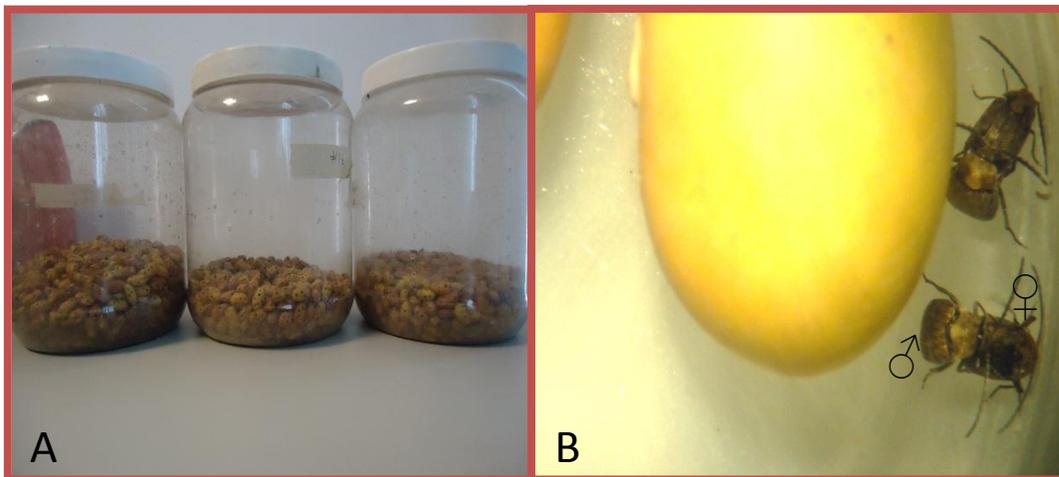


Figura 8. Cría masiva de *A. obtectus* (A), diferenciación sexual mediante dimorfismo sexual (B).

6.4.2. Estimación de la concentración de conidios

Con la finalidad de determinar la concentración del inóculo a utilizar en las pruebas de patogenicidad y virulencia de los aislados de interés se preparó una

suspensión de conidios, mediante un raspado superficial del área de crecimiento de cada una de las colonias puras en desarrollo sobre medio PDA. Una vez que los aislados presentaron esporulación (15 días de incubación), se colocó una cantidad de agua destilada estéril y con un portaobjetos se realizó un raspado de conidios y el concentrado se colocó en un tubo de ensayo de 10 mL con la ayuda de una pipeta. Posteriormente, se suspendió empleando un vórtex a velocidad máxima durante 2 min.

Se colocó 1 mL de la suspensión de conidios en hemocitómetro (cámara de Neubauer). Los conidios se contabilizaron específicamente en los cuadrantes marcados de color verde (Figura 9).

Una vez tomadas las lecturas, la concentración de conidios se determinó mediante la siguiente ecuación según Ames y Cañedo (2006).

Número de esporas/mL = $10,000 (x/4)$. En donde X = total de células contadas en los 4 cuadrantes.

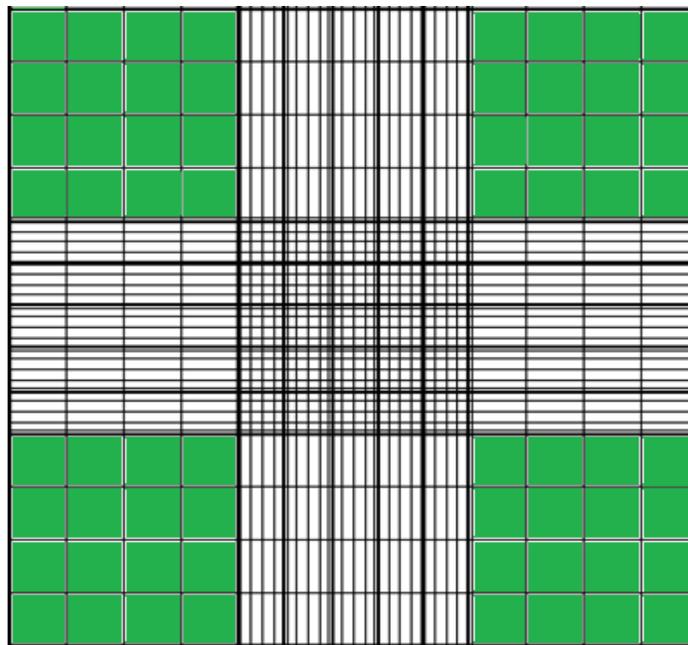


Figura 9. Conteo de conidios en cámara de Neubauer. Los cuadros marcados de verde son los utilizados para dicho conteo.

6.4.3. Prueba de germinación de conidios

La viabilidad de los conidios de los conidios empleadas en el bioensayo de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se determinó al iniciar el experimento tanto en medio PDA así como en PDA + insecto pulverizado. Para esto fue necesario lo siguiente:

Se sembraron 10 μ L de una suspensión de conidios con una concentración de 10^6 conidios/mL en medio PDA y PDA suplementado con una suspensión de 0.5% de insecto pulverizado, (para ello fue necesario colocar los insectos en un horno a 49 °C durante 48 hrs y después ser macerados con mortero y pistilo) y mediante una espátula de Drigalski el inóculo se distribuyó uniformemente sobre la caja Petri, enseguida se incubaron a 20 °C durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo se agregó 50 μ L de azul de lactofenol con la finalidad de parar la germinación, se cortó la porción del agar en cuadros de 2 cm² conteniendo la suspensión de conidios, se colocó sobre un portaobjetos a éste se le colocó un cubreobjetos. Se registró el número de conidios germinados mediante un microscopio óptico Leica con el objetivo de 40 X (se registraron como germinados los conidios cuyo tubo germinativo era dos veces mayor al diámetro del conidio). El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento y los resultados fueron analizados con el programa Statistix 8.1 mediante un análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$).

6.4.4. Infección en adultos de *A. obtectus*

En este experimento se utilizaron 1,500 insectos adultos. Los adultos se colocaron en un vaso de plástico de 10 mL conteniendo 20 semillas de frijol azufrado higuera, para la evaluación de cada aislado se establecieron cuatro concentraciones (1×10^5 , 10^6 , 10^7 y 1×10^8) con tres réplicas, se asperjaron 2 mL de estas concentraciones con un atomizador manual (Paroygo) a 10 insectos

por cada replicado excepto el testigo que solo recibió agua destilada (Figura 10). El bioensayo se arregló en un diseño completamente al azar, una vez inoculados los insectos se colocaron en la cámara bioclimática Scorpion Scientific a 28°C y una humedad relativa de 70±2 %. Se contó el número de insectos muertos diariamente hasta que murió el 100% de la población en la dosis mayor para cada aislado, los organismos muertos se colocaron en caja Petri con papel filtro humedecido con la finalidad de determinar si la mortalidad había sido causada por el hongo (Murad *et al.*, 2006).

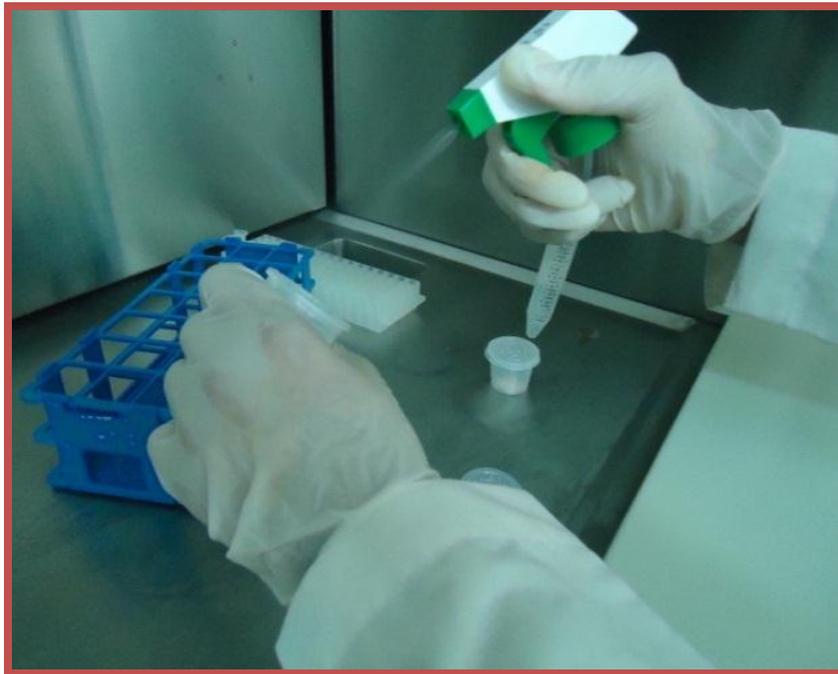


Figura 10. Aplicación tópica de *B. bassiana* a diferentes concentraciones sobre adultos de *A. obtectus*.

6.5. Determinación de indicadores de virulencia CL₅₀ y TL₅₀

Una vez seleccionada el aislado de mayor mortalidad se realizó la caracterización de los parámetros de virulencia, para esto fue necesario determinar el TL₅₀ y CL₅₀, tiempo y concentración en la cual muere la mitad de

población de insectos prueba. Para esto se empleó el análisis Probit mediante el programa PC POLO (1987) con límites fiduciales del 95% de confiabilidad.

6.6. Inducción del secretoma de los aislamientos más virulentos

Para esta prueba se escogió el aislamiento más virulento de *B. bassiana* y *M. anisopliae* de acuerdo a los resultados obtenidos mediante el tiempo letal medio (TL_{50}) y concentración letal media (CL_{50}).

Los aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* de mayor virulencia se propagaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio conteniendo 110 mM de KH_2PO_4 , 38 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 2.4 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.1 mM de $CaCl_2$, 2.9 mM de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 7.2 mM de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 2% (p/v) de glucosa (medio no inductor) a pH de 5.5 e incubadas a 28 °C y 250 r.p.m. Se inoculó un volumen de 10 mL con una concentración de 10^7 conidios/mL. Después de tres días de incubación a 28 °C y 250 r.p.m., se filtró el medio de cultivo a través de una membrana de 0.22 μm haciendo uso de una bomba de vacío y el micelio se colocó en medio de cultivo conteniendo 1% (p/v) de *A. obtectus* pulverizado (medio inductor), así como en medio de cultivo no inductor, se propagó el inóculo a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Con la finalidad de conocer el tiempo al cual se tiene el mayor número de conidios y una obtención de éstos de buena calidad, se llevó a cabo la propagación de los aislados en medio de cultivo líquido reportado por Manalil *et al.*, 2010, para esto fue necesario hacer un raspado superficial del área de crecimiento total del hongo, e inocular una concentración de 10^7 conidios/mL. Se hizo uso de una cámara de Neubauer para ajustar la concentración de conidios.

Para la obtención del pulverizado del insecto fue necesario colocar insectos adultos en horno a 49 °C durante 48 hrs y macerarlos con mortero y pistilo para su posterior uso en bioensayos.

Terminado el tiempo de propagación de los aislados, el líquido obtenido con sus respectivas secreciones se guardó en frascos de vidrio de 50 mL a -20°C para su uso posterior.

6.7. Análisis electroforético

6.7.1. Preparación de la muestra de proteínas secretadas por los HE

Una vez obtenidos los medios de cultivo bajo condiciones inductoras y no inductoras, se procedió a concentrar la proteína para obtener la cantidad adecuada para realizar los análisis electroforéticos, por lo anterior se realizaron diferentes estrategias para determinar la mejor metodología a emplear:

a) Sulfato de amonio

Se centrifugaron 13 mL del medio inductor como no inductor a 21,000g por 15 min a 10 °C. Posteriormente al sobrenadante se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta dar una solución saturada de 80% la cual se dejó en agitación durante ocho hrs a 4°C. Transcurrido este tiempo, las proteínas fueron precipitadas mediante centrifugación a 21,000 g durante 15 min a 4°C, las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 1mL de solución conteniendo urea 7 M y tiourea 2 M (Manalil *et al.*, 2010).

b) Precipitación con metanol y cloroformo

En un tubo de centrifuga de 1.5 mL se colocó una alícuota de 150 μL de muestra más 600 μL de metanol, se mezcló mediante vórtex durante 2 minutos, se añadió 150 μL de cloroformo, se volvió a mezclar de nuevo y enseguida se añadió 450 μL de agua mili Q (18 M Ω . cm), se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 5 min. A 4°C, se removió el sobrenadante dejando intacto el disco de precipitado blanco que se forma entre las dos fases, se agregó 450 μL de metanol absoluto y se mezcló empleando un vórtex. Finalmente se centrifugó a las mismas condiciones ya mencionadas, se descartó el sobrenadante y la pastilla se secó a temperatura ambiente, ésta se resuspendió en urea 7 M y tiourea 2 M (IPB, 2006).

c) Precipitación en acetato de amonio con metanol

Se agregaron cinco volúmenes de acetato de amonio al 0.1 M en metanol al 100% por cada volumen de las secreciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para

cada condición. Posteriormente los tubos conteniendo la mezcla se dejaron precipitar durante toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La pastilla de la proteína fue obtenida por centrifugación (13,000g, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Finalmente se solubilizó la pastilla en 250 μL de 7 M de urea y 2 M tiourea (Peinado, 2011). Las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la electroforesis.

d) Ultrafiltración

Se utilizaron tubos de 4 mL Amicon Ultra-4 con membranas de 10,000 Da. Para esto se colocó 4 mL del medio con las condiciones inductor y no inductor en el reservorio de la membrana, posteriormente se centrifugaron a 7,500g a 4°C durante 10 minutos, la pastilla se resuspendió en urea 7 M y tiourea 2 M.

6.7.2. Cuantificación de proteínas

Una vez resuspendidas las proteínas se cuantificaron colorimétricamente empleando el reactivo de Bradford (Sigma, San Louis, MO, EUA), ajustando el protocolo a un formato de placa de 96 pozos, este método se basa en la reacción de los grupos aminos libres de una proteína con el azul de Coomassie en presencia de ácido fosfórico y etanol produciendo un compuesto colorido azul. Para esta cuantificación se realizó una curva estándar de tres repeticiones a las concentraciones de 0.25 a 1.40 mg/mL leídas a 595 nm en un lector multimodal (Multimode Detector DTX 880) (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se preparó una curva estándar con concentraciones de proteínas conocidas con albumina de suero bovino (sigma, San Louis, MO, EUA), corridas en paralelo con soluciones de proteínas desconocidas para analizar cuantitativamente las proteínas, al mismo tiempo se corrió un blanco como control de la reacción. Se agregaron 250 μL de Reactivo de Bradford a 5 μL de la muestra.

6.7.3. Protocolo de limpieza de proteínas para la electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE)

Antes de realizar la electroforesis bidimensional fue necesario tratar las muestras con el kit de limpieza 2-D Clean Up (Amersham Biosciences) el cual consistió en el siguiente procedimiento:

Se transfirieron 80 µg de muestra de proteína en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se le agregó 300 µL de precipitante y se mezcló vigorosamente empleando un vórtex. Se incubó en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 300 µL de co-precipitante a la mezcla anterior (mezcla de proteínas y precipitante) y se mezcló empleando un vórtex a baja velocidad. Se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4 °C. Se observó la formación de una pequeña pastilla en este paso. Se removió el sobrenadante con mucho cuidado por pipeteo. Después se agregaron 40 µL de co-precipitante sobre la pastilla y se colocaron los tubos en hielo durante 5 min. Se volvió a centrifugar a 4°C, a 12,000 g durante 5 min. Se agregaron 25 µL de agua Mili Q de 18 MΩ. cm sobre la pastilla. Se mezcló con vórtex cada tubo durante 5-10 segundos. Posteriormente, se agregó 1 mL de wash buffer (previamente almacenado a -20°C) y 5 µL de aditivo de lavado (wash additive); la pastilla se agitó hasta que estuvo completamente dispersa. Se incubó a -20 °C durante 30 min (con agitación de 20 a 30 segundos cada 10 min). Se centrifugó a una velocidad de 12,000 g durante 5 min. Cuidadosamente se removió y descartó el sobrenadante. Se secó la pastilla por no más de 5 min. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 130 µL de solución *destreak* para continuar con la rehidratación e hidratación de las tiras.

6.7.4. Separación de proteínas por punto isoeléctrico [Isoelectroenfoco (IEF)]

Se tomaron 80 µg de proteínas (medio inductor y no inductor) de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en 130 µL de buffer IEF (De-Streak Rehydration Solution), adicionando anfolitos de rango de pH 3-10 al 0.4% p/v) y se homogenizó muy bien. Se empleó esta muestra para rehidratar tiras de gel de poliacrilamida en gradiente inmovilizado pH 3-10 (ReadyStrip IPG Strip, 7 cm, BIORAD). La rehidratación consistió en 16 h a 50 volts/20°C posterior a la etapa de rehidratación las proteínas se enfocaron en el sistema Protean IEF Cell (BIORAD)

aplicando un total de 22,000 volts/h. Las tiras tratadas se almacenaron a -20 °C hasta su aplicación en la segunda dimensión. Se utilizó un marcador de peso molecular (BenchMark, Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), el cual se separó en paralelo a las muestras.

6.7.5. Separación de proteínas por peso molecular (SDS-PAGE)

El paso de la primera a la segunda dimensión involucró dos etapas: primero, la reducción, y segundo la alquilación de los grupos sulfhidrilos. Las tiras de IPG fueron equilibradas adicionando 2.0 mL de buffer de equilibrio (urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris/HCl 0.05 M pH 8.8, Glicerol 20% (v/v), DTT 2% (p/v) para reducir los grupos sulfhidrilos se agitó durante 15 min. Finalmente, se decantó y se adicionó el buffer de equilibrio II (urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris/HCl 0.05M, pH 8.8, glicerol 20% (v/v), iodo-acetamida 2.5% (p/v) con agitación durante 15 min, para alquilar los grupos sulfhidrilos. Se agitaron las tiras con el buffer I y II para correr en una segunda dimensión.

Las proteínas resueltas y equilibradas se separaron en base a su peso molecular en geles desnaturizantes en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Se utilizó un marcador de peso molecular (BenchMark, Invitrogen, Carlsbad CA, EUA). La corrida electroforética se realizó en una cámara vertical (Mini Protean Tetra Electrophoresis System, Bio-Rad) a temperatura ambiente y 80 V, por 2.5 horas y en buffer de electroforesis 1X (Tris base 25mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%). Para visualizar las manchas de proteínas (medio inductor y no inductor) los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación morfológica de los aislados

Los aislados se identificaron como *B. bassiana* en base a sus características morfológicas como lo es el micelio septado, conidióforos con hifas ramificadas en terminación simpodial y esporas en forma de racimo redondos. Se observó la célula conidiógena con la base globosa y un adelgazamiento en la parte superior. Estas características coinciden con las reportadas por Ames y Cañedo (2004).

Para el caso de *M. anisopliae* se pudo visualizar los conidióforos característicos irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septa, conidios cilíndricos en cadenas formando columnas, el hongo en los primeros días de desarrollo presentó un color blanco el cual cambió a verde a los 5 ó 7 días. Coincidiendo con la diagnosis de las claves taxonómicas de Ames y Cañedo (2004).

7.2. Viabilidad de los conidios

Los conidios de todos los tratamientos de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* superaron el 90% de germinación a las 24 horas de incubación cuando éstos se propagaron en medio PDA suplementado con insecto pulverizado (Cuadro 3). Estos resultados indicaron que los conidios provenientes de diferentes aislados presentaron una alta capacidad de germinación; este valor de germinación es adecuado considerando que se ha establecido como un parámetro de calidad de bioplaguicidas una germinación superior al 90% a las 24 horas de incubación (Vélez *et al.*, 1997). El análisis de varianza detectó diferencias significativas en los tratamientos, lo que significa que el comportamiento de los porcentajes de germinación obtenidos en el presente estudio se debe a la presencia de insecto pulverizado; este tipo de comportamiento se debe a la

adición al medio de compuestos ricos en fuente de carbono y nitrógeno como lo es el exoesqueleto. Estos datos concuerdan con los reportados por Campos *et al.* (2010) al evaluar a *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp .y *Paecilomyces* sp. en diferentes medios: PDA + quitina, PDA + extracto de levadura.

La mayoría de los cambios fisiológicos presentes durante la germinación están ligados a un incremento general en la tasa metabólica que convierte al conidio en un estado de dormancia a un estado activo de crecimiento. Aguirre (2006) menciona que para que la espora pase de un estado activo, es necesaria la presencia de fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, fuentes de carbono, aminoácidos y vitaminas específicas. Con base a lo anterior el medio PDA+ Q que tiene como base agar dextrosa, al agregarle insecto pulverizado, se estimulan las fuentes de nitrógeno necesarias para la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos necesarios para la formación de protoplasma, así como el carbono es requerido debido a que los compuestos orgánicos son utilizados como materiales estructurales, suministrando energía para los procesos de oxidación y requeridos en mayores concentraciones que los elementos esenciales. La dextrosa al ser un monosacárido incorpora importantes cantidades de carbono, aproximadamente la mitad del peso seco de las células fúngicas equivale a carbono, por lo que es de gran importancia en las células, además los compuestos orgánicos como la dextrosa son utilizados como materiales estructurales, los cuales además suministran energía para la oxidación y son requeridos en concentraciones mayores que otros elementos necesarios. Mientras que la quitina es el principal constituyente del exoesqueleto de los insectos y el polisacárido característico de la pared celular de hongos, al ser agregada al medio de cultivo, el hongo censa las condiciones naturales y empieza a desplegar su maquinaria de ataque.

Milner *et al.* (1991) demostraron que la germinación de los conidios también puede verse influenciada por otros factores, como la composición de medio de cultivo. El medio semi-sintético empleado en este trabajo proporcionó al hongo todos los requerimientos nutricionales para germinar.

De acuerdo con Guzmán (2006) el criterio de selección de aislado o cepa debe ser aquel que produzca la mayor cantidad de conidios por unidad de área o milímetro, esta característica debe ser consistente. Sin embargo, también se considera que es trascendental la elección de un medio de cultivo que estimule las características microbiológicas con el fin de desplegar a nivel de campo y/o bodegas los factores que intervienen en los mecanismos de acción de los hongos. Con base a lo anterior, se seleccionó el medio PDA + IP como el tratamiento con mejores resultados ya que presentó mejores efectos para la variable porcentaje de germinación.

Cuadro 3. Porcentaje de germinación de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en dos medios de cultivo a las 24 horas de incubación.

Especies	Medio de germinación	% de germinación
<i>B. bassiana</i>	PDA*	90.6 cd
	AGG21 PDA + IP**	97.0 ab
AGG22	PDA	90.3 d
	PDA + IP	96.3 ab
AGG23	PDA	91.3 cd
	PDA + IP	94.3 abc
AGG24	PDA	91.3 cd
	PDA + IP	97.3 a
AGG29	PDA	90.3 d
	PDA + IP	93.3 bcd
<i>M. anisopliae</i>	PDA	82.6 d
	AGG4 PDA + IP	91.3 bc
AGG5	PDA	89.6 c
	PDA + IP	97.6 a
AGG6	PDA	82.0 d
	PDA + IP	96.0 ab
AGG27	PDA	84.0 d
	PDA + IP	90.6 bc
AGG28	PDA	91.0 bc
	PDA + IP	97.6 a

*PDA= Medio Papa dextrosa agar **PDA + IP= Medio PDA más insecto pulverizado.

7.3. Selección de aislados patogénicos

Los resultados de mortalidad de las 10 aislados evaluadas se presentan en la (Figura 11 y 12). Las diferentes cepas incrementaron su patogenicidad a medida que la dosis aumentaba, resultados similares se han determinado con otros insectos y diferentes hongos (Hayden *et al.*, 1992).

Se seleccionó el aislado AGG24 de *B. bassiana* debido a que presentó diferencias significativas respecto a las demás cepas, ésta causó una mortalidad del 84.9 % en un tiempo de 5 días, mientras que *M. anisopliae* AGG28 originó una mortalidad de 64 % en un tiempo de 6 días. Se observaron la presencia de adultos muertos en todas las concentraciones utilizadas. Sin embargo, cuando las dosis fueron separadas para determinar la existencia de diferencias entre éstas los resultados arrojados determinaron que las dosis 1×10^7 y 1×10^8 presentaron diferencias significativas respecto a las dosis más bajas, pero no presentaron diferencias entre ellas (Cuadro 4). Los insectos infectados después de 5 días de aplicado el tratamiento empezaron a presentar una coloración opaca con la posterior muerte del insecto, durante este tiempo fue posible la replicación del HE en el hemocele del insecto; particularmente para el aislamiento Bb AGG24 y Ma AGG28 se empezó a observar la formación de micelio típico de cada especie (Figura 13).

El aislado Bb AGG29 presentó un 33.3% de mortalidad con todas las concentraciones del inóculo, el mismo resultado se obtuvo para Bb AGG 21, mientras que para los aislados AGG22 y AGG23 el porcentaje de mortalidad fue de 23.3 % y 51.2% respectivamente. Con estos resultados podemos inferir que los aislados colectados en distintas regiones de Sinaloa varían en cuanto a patogenicidad y virulencia.

Estos resultados coinciden con los de Barrantes *et al.* (2010) donde determinaron la mortalidad del 100 % de *Boophilus microplus* con la cepa *M. anisopliae* clave MTps a los 5 días. Así mismo Hernández *et al.*, (2010) reportan una mortalidad de 50 % de *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera) a

los nueve días con la cepa GC01 de *M. anisopliae*. Cabe señalar que estos organismos pertenecen a otros géneros y especies pero tiene la particularidad de pertenecer al orden coleóptera lo que implica que los HE presentan especificidad a nivel de orden en la escala jerárquica.

Barrantes *et al.*, (2010) reportaron una mortalidad de 80% de la cepa *B. bassiana* clave Bvjv sobre la garrapata *Boophilus microplus* en 7 días, en nuestro estudio *B. bassiana* AGG24 presentó un 84.9 % en 5 días.

Murad *et al.*, (2007) reportan una mortalidad de 63.3% en siete días con la cepa de *B. bassiana* CG05, mientras que la cepa CG07 presentó un 54.4 % sobre *C. maculatus*. Sin embargo el porcentaje de mortalidad puede variar según la procedencia de la cepa y el organismo sobre el cual se haya evaluado. En este trabajo el aislamiento *B. bassiana* AGG24 causó un 84.9% de mortalidad en 5 días; no obstante, es importante recalcar que estas cepas pertenecen a regiones geográficas distintas.

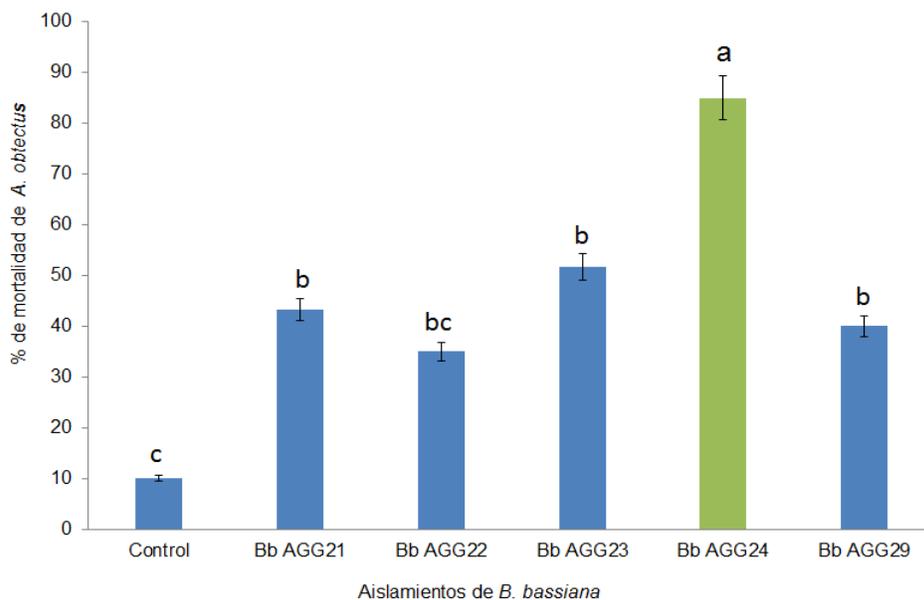


Figura 11. Mortalidad de *A. obtectus* con diferentes aislados de *B. bassiana* a los cinco días de tratamiento. Medias con letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

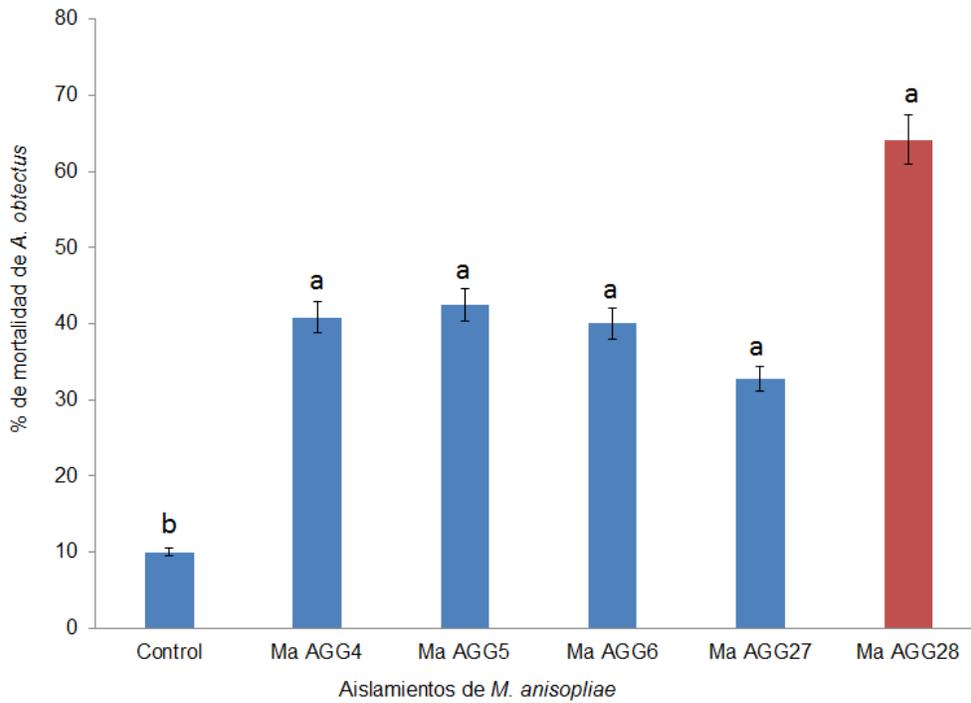


Figura 12. Mortalidad de *A. obtectus* tratado con diferentes aislamientos de *M. anisopliae* a los seis días de aplicación. Medias con letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

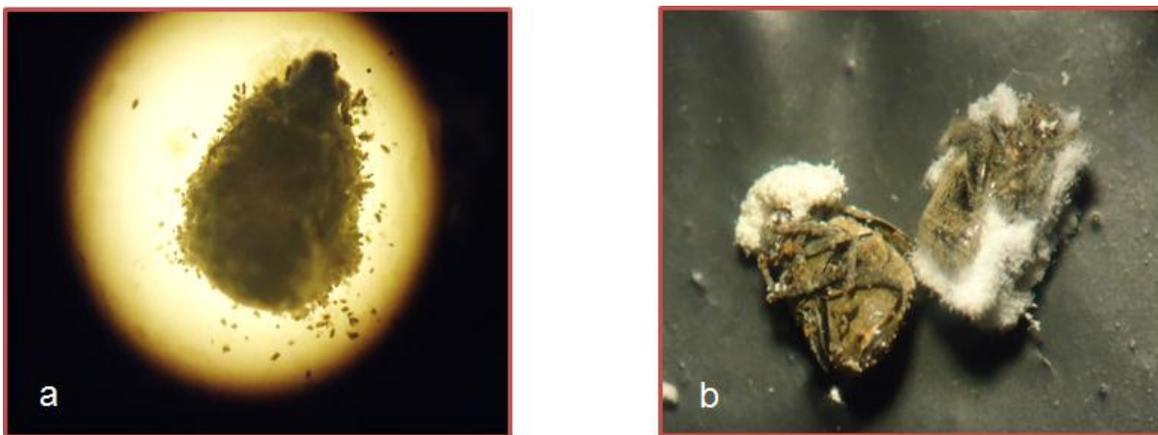


Figura 13. Gorgojo pardo infectado por a) *M. anisopliae* “muscardina verde”, y b) *B. bassiana* “muscardina blanca” visto al estereoscopio a 10 X.

Cuadro 4. Mortalidad de *A. obtectus* tratados con diferentes concentraciones de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

<i>B. bassiana</i>		<i>M. anisopliae</i>	
Conidios/mL	Mortalidad (%)	Conidios/mL	Mortalidad (%)
Control	10 ^c	Control	10 ^b
1 X 10 ⁵	63.3 ^b	1 X 10 ⁵	30 ^b
1 X 10 ⁶	76.6 ^b	1 X 10 ⁶	50 ^b
1 X 10 ⁷	100^a	1 X 10 ⁷	76.6^a
1 X 10 ⁸	100^a	1 X 10 ⁸	100^a

Medias con letras iguales son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

7.4. Indicadores de virulencia de los aislados seleccionados

Para el aislado Bb AGG24 a mayor concentración de conidios mayor fue el porcentaje de mortalidad sobre los adultos de *A. obtectus*. De acuerdo con el análisis Probit se determinó que la CL₅₀ y TL₅₀ del aislado Bb AGG24 fue de 9.2×10^4 conidios/mL con límites de confianza inferior y superior de 8.2×10^4 a 8.1×10^5 conidios/mL en un tiempo de 2 días con límites de 1.9-2.1 días respectivamente, lo anterior demuestra la homogeneidad de la respuesta del insecto prueba al tóxico. Para el aislado Ma AGG28, de igual manera, a mayor concentración de conidios mayor porcentaje de mortalidad de adultos de *A. obtectus*. De acuerdo con el análisis Probit se determinó que la CL₅₀ y TL₅₀ fue de 1.6×10^6 conidios/mL con límites de confianza de 3.2×10^5 a 5.1×10^6 conidios/mL en 2.7 días con límites de 2.6-2.8 días. Los resultados anteriores indicaron que se obtuvieron buenos valores de CL₅₀ y TL₅₀ por lo que estas concentraciones eliminaron al 50% de la población de *A. obtectus*.

Datos muy similares son reportados por Murad *et al.* (2007) con la cepa de *B. bassiana* CG05 y CG07, donde la CL_{50} fue de 2.7×10^4 y 5.05×10^4 , respectivamente.

Álvarez *et al.* (2010) obtuvieron una CL_{50} de 5.9×10^7 conidios/mL y un TL_{50} de 6.6 días con la cepa de *M. anisopliae* código M379 cabe señalar que estos resultados son obtenidos de los bioensayos se realizaron con *Boophilus microplus*.

7.5. Caracterización del secretoma de los aislados más virulentos contra *A. obtectus*

En este trabajo fue necesario seleccionar el método más eficiente para el análisis de proteínas de secreciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Se evaluaron cuatro métodos diferentes de extracción de proteínas: precipitación al 80% de saturación con sulfato de amonio, ultrafiltración, precipitación con acetato de amonio al 0.1 M en metanol absoluto y precipitación en metanol con cloroformo. Sin embargo, al momento de realizar la SDS-PAGE el mejor método para la separación de las proteínas fue con acetato de amonio al 0.1 M en metanol absoluto ya que con los otros tres no se pudo visualizar el patrón de bandeo. Es difícil determinar los factores por los cuales se obtuvieron mejores resultados con este método debido al análisis multifactorial de las muestras.

En la (Figura 14) se puede apreciar el patrón de bandeo de las proteínas que son expresadas en una determinada condición (se indican con flechas).

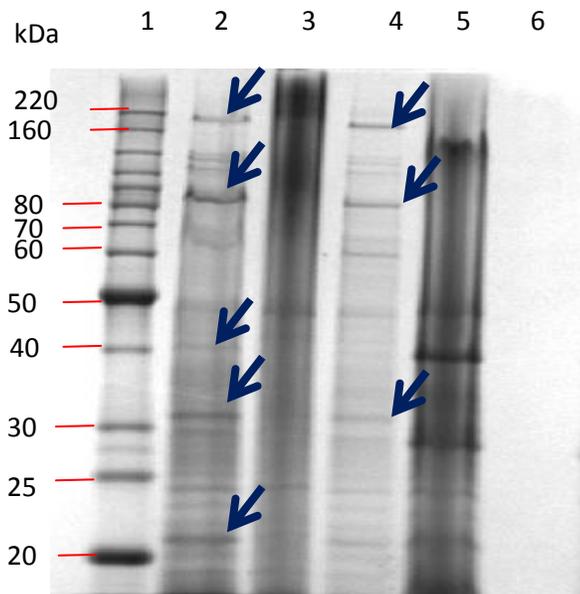


Figura 14. Análisis SDS-PAGE de proteínas extraídas con acetato de amonio 0.1M en metanol absoluto. Carril 1 Marcador de peso molecular, carril 2 y 3: secreciones de *B. bassiana* de medio inductor y no inducido; 4 y 5 secreciones de *M. anisopliae* en medio inductor y no inducido; carril 6 medio conteniendo insecto pulverizado. Se cargaron 10 µg de proteína por carril.

El análisis SDS-PAGE es de gran ayuda para asegurarnos de que realmente estamos extrayendo la concentración de proteínas estimada mediante el método de Bradford. Aun cuando este método permitió la separación adecuada de proteínas, en este paso solo estamos realizando la separación en base a su peso molecular, esto no permite determinar si se hará la separación adecuada en los geles bidimensional. Por lo que la realización del análisis 2D-SDS-PAGE dará mejor información.

Se identificaron, a través de SDS-PAGE bandas de proteínas en un rango de 20-220 kDa en la cepa *B. bassiana* cuando creció en medio de cultivo inductor y de 25-50 kDa en medio no inductor. En la cepa *M. anisopliae* se visualizaron bandas en intervalos de 20-220 kDa cuando se propagó en medio de cultivo inductor y de 25-40 kDa en medio no inductor. Estos resultados sugieren que la expresión de proteínas está influenciada por la presencia de insecto al medio de

cultivo y no a las proteínas del insecto pulverizado ya que al agregarlo al medio, este pasa por el proceso de esterilización, el cual desnaturaliza las proteínas presentes en el insecto, exponiendo las cadenas hidrofóbicas al medio, formando conglomerados, que al momento de filtrar a través de la membrana de 0.22 μm las proteínas quedan retenidas.

En contraste con lo obtenido por Murad *et al.* (2007) donde se caracteriza un patrón de bandeos de menor peso molecular, sin embargo, hay que considerar que las condiciones de propagación utilizadas fueron diferentes a las de este estudio.

Aunque no existan suficientes estudios que revelen los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de hongos entomopatógenos, es importante tener en cuenta los diferentes factores que intervienen en su desarrollo, ya que los medios de cultivo para el crecimiento de éstos se pueden modificar con el propósito de obtener no solo un máximo crecimiento y esporulación, sino también estimular la expresión de enzimas que intervienen en los mecanismos de acción de los HE.

En base a esto podemos establecer que la producción de proteínas puede ser afectada por las condiciones físicas y químicas del medio.

7.5.1. Electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE)

Para realizar una mejor separación de mezclas de proteínas, se llevó a cabo la 2D-SDS-PAGE tanto de las secreciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en medio inductor y no inductor. Las imágenes son representativas del análisis por duplicado.

Se pudo visualizar y caracterizar mediante el software GelScape (Young *et al.*, 2004) una cantidad de (40 spots) en los geles de secreciones inducidas de *B. bassiana*, y para *M. anisopliae* se lograron identificar (31 spots) (Figura 15 y 16).

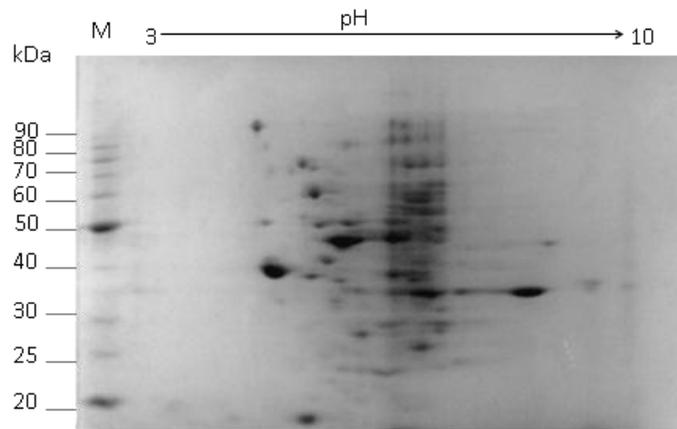


Figura 15. Análisis 2D-SDS-PAGE de secreciones de *B. bassiana* en medio inducido con el método de extracción acetato de amonio al 0.1M en metanol. 80 μ g de proteínas fueron enfocados en tiras IPG (pH 3-10, 7cm).

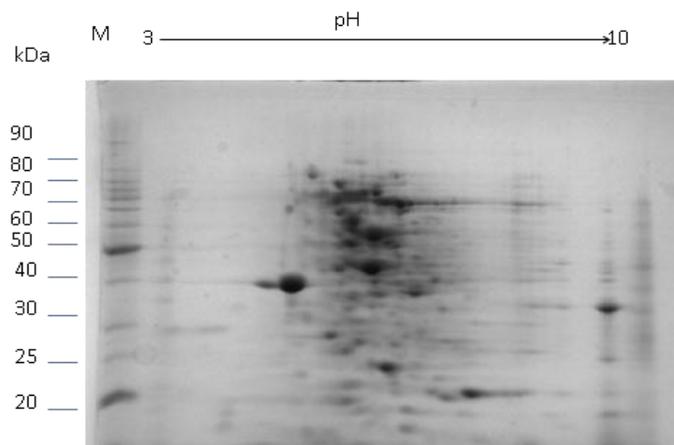


Figura 16. Análisis 2D-SDS-PAGE de secreciones de *M. anisopliae* en medio inducido con el método de extracción acetato de amonio al 0.1 M en metanol. 80 μ g de proteínas fueron enfocados en tiras IPG (pH 3-10, 7cm).

Las proteínas que secreta *B. bassiana* y *M. anisopliae* cuando éstas se propagan en medio de cultivo inductor se pudieron visualizar. Sin embargo, no se

podieron observar en medio de cultivo no inductor posiblemente las proteínas de este medio no presentaron solubilidad con los buffer de equilibrio I y II.

Cabe mencionar que las proteínas identificadas en este trabajo coinciden con el pI y peso molecular a las reportadas en la base de datos Swiss-Prot del European Bioinformatics Institute, quedando pendiente la secuenciación de las mismas para confirmar su total correspondencia.

De 40 spots generados mediante el programa GelScape, éstos presentaron un rango de 15-100 kDa y un pI de 5.4- 9.6, para *B. bassiana*. Solo seis de estos spots fueron identificados por presentar similitud con proteínas reportadas en otros estudios. Para *M. anisopliae* únicamente 11 spots se pudieron caracterizar hipotéticamente de un total de 31, los cuales se encontraron distribuidos en un pI de 5.3-9.3 y un peso molecular de 15-120 kDa.

En las secreciones de *B. bassiana* se pudo caracterizar una proteína de 40 kDa y pI de 5.4, ésta presenta una similitud con una quitinasa con actividad β -N-acetilglucosaminidasa la cual fue reportada por Barreto *et al.* (2004). Así mismo se caracterizó una proteína semejante a la nitrito oxidoreductasa, reportada por Murad *et al.* (2008) que interviene en el ruta de degradación de nitrato a nitrito cuando los niveles de amonio en el medio son altos, ya que éste a altas concentraciones es tóxico para *S. cerevisiae*.

Probablemente la función de la serina-carboxipeptidasa encontrada en este estudio está asociada a la degradación de péptidos liberados por endoproteasas, produciendo de esa manera aminoácidos libres necesarios para la nutrición y metabolismo presente en el medio.

Se caracterizó en estudios previos una quitinasa con pI 4.7/40 kDa en secreciones de *M. anisopliae*, esta enzima probablemente esté implicada en la ruta metabólica de la quitina (β -1,4-N-acetil-D-glucosamina) a N-acetil-D-glucosamina, que a su vez es transformada a D-glucosamina mediante N-acetilglucosamina deacetilasa, así como por quitosanasas (pI 5.3/28 kDa) generando D-glucosamina la cual es transformada en glucosa para ser utilizado

por el hongo en el proceso de síntesis de pared celular (Murad *et al*; 2008). También se encontró una de las proteasas más estudiadas, la subtilisina con pI de 5.9/57 kDa, esta es una serina proteasa implicada en degradar las proteínas presentes en la cutícula del hospedero y ha sido estructuralmente localizada durante las primeras fases de penetración, donde también participa la proteína parecida al colágeno con pI 5.04/60 kDa que es la encargada de enmascarar el sistema inmune del insecto. Estos resultados coinciden con los de Manalil *et al*. (2010) donde logran identificar mediante 2D-SDS-PAGE las mismas proteínas.

8. CONCLUSIONES

Los dos aislamientos nativos, uno de *B. bassiana* y otro de *M. anisopliae* presentaron patogenicidad (mortalidad de 84.9 y 64% respectivamente) contra el gorgojo pardo del frijol.

La CL₅₀ para Bb AGG24 fue de 9.2×10^4 conidios /mL con límites de confianza de 8.2×10^4 a 8.1×10^5 conidios/mL en un tiempo de 2 días con límites de 1.9-2.1 días, mientras que el aislamiento Ma AGG28 la CL₅₀ fue de 1.6×10^6 conidios/mL con límites de confianza de 3.2×10^5 a 5.1×10^6 conidios/mL en 2.7 días con límites de 2.6-2.8 días y TL₅₀ de 2.7 días.

Mediante SDS-PAGE se identificaron bandas de proteínas en un rango de 20-220 kDa en la cepa Bb AGG24 cuando creció en medio de cultivo inductor (insecto pulverizado), sin embargo cuando se propagó en medio no inductor fue de 25-50 kDa.

Se observaron bandas de proteínas en un rango de 20-220 kDa en la cepa Ma AGG28 cuando se propagó en medio de cultivo inductor (insecto pulverizado), y cuando ésta fue propagada en medio no inductor el patrón de bandeado fue de 20-40 kDa.

Se desarrolló un método de precipitación con acetato de amonio al 0.1 M en metanol que permitió visualizar proteínas a través de 2D-SDS-PAGE en un rango de 15-120 kDa y pl de 4.4- 9.3 en secreciones de *M. anisopliae* AGG28, mientras que *B.bassiana* AGG24 el rango de proteínas fue de 19-102 kDa y pl de 5.6- 7.5.

Dichas proteínas corresponden de acuerdo a su pl y peso molecular a: N-acetilglucosaminidasa, serina carboxipeptidasa aminotransferasa, esterasa STE1, óxido reductasa, subtilisina, quitosanasa, acetiltransferasa, proteína similar al colágeno y trehalasa, de acuerdo a la base de datos Swiss-Prot del EBI, involucradas en el proceso de infección de estos hongos en el insecto. Sin embargo, estas proteínas no fueron secuenciadas y su identidad aún queda por ser confirmada.

9. RECOMENDACIONES

Se requieren realizar bioensayos con hongos provenientes de cultivos monospóricos para que no exista una variación en el porcentaje de mortalidad ya que al trabajar con cultivos multiespóricos, es decir provenientes de cultivos de varias esporas cada una presenta un contenido genético diferente debido al fenómeno de la heterocariosis.

Realizar bioensayos cuando las cepas propagadas en medio PDA + IP y hacer la comparación para determinar la existencia de alguna diferencia entre el medio PDA único y suplementado con quitina, en base a esto se puede determinar la propagación de los HE en medios selectivos para disminuir el tiempo de mortalidad y por lo tanto, la concentración del inóculo que para la industria de bioplaguicidas reduciría costos de producción.

Recolectar las secreciones proteicas en el tiempo adecuado para que no exista la autofagia celular y por lo tanto una disminución en la concentración de proteínas.

Afinar más el método de extracción de proteínas con acetato de amonio en metanol, para visualizar un patrón mayor de proteínas.

Hacer la comparación del secretoma entre la cepa que presenta menor porcentaje de mortalidad y aquella con mayor y mediante esa estrategia comparar las proteínas diferenciales al momento de causar la mortalidad del insecto.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, N. 2006. Determinación de efecto de algunas fuentes de carbono y nitrógeno, del pH y de la actividad del agua sobre el desarrollo de *Nomuraearileyi*. Tesis de maestría en microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
- Alves, S. 1998. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: S. Alves (editor), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, Brasil. pp. 21-37.
- Asaff, A., Reyes, V. Y., López, L. E. y de la Torre, M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. Avance y Perspectiva. 21: 291–295.
- Barreto, C., Staats, C., Schrank, A. y Vainstein, M. 2004. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. Current Microbiology. 48: 102-107.
- Becerra, V., Paredes C. M., Rojo, M.C., France I. A., 2006. RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. Agricultura técnica de Chile. 2: 115-125.
- Bidochka, M. J., Leger, R. J., y Roberts, D. W. 1997. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. Entomological Society of Canada. 171: 213-224.

- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and soil*. 252: 55-128.
- Campos, A.L., Mata, G. X. y Obregón, G. M. 2010. Evaluación del crecimiento y desarrollo de tres hongos entomopatógenos en diferentes medios de cultivo. In: Coria-Avalos V.M., Lara-Chávez M. B. N., Orozco-Gutiérrez G., Muñoz-Flores H. J., y Sánchez-Martínez R. (Editores), Memoria. XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. 10 al 12 de Noviembre de 2010. INIFAP. CIRPAC. Campo Experimental Uruapan, Uruapan, Michoacán, México. pp. 102-105.
- Cardona, C. y Kornegay, J. L. 1999. Bean germplasm resources for insect resistance. *In*: Clement, S; Quisenberry, S. (editors). 1999 Global Plant Genetics Resources for Insect-Resistant Crops. Boca Ratón, Florida. pp. 85-99.
- Carrillo, R. M. y Blanco, L. A. 2009. Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta universitaria*. 19: 40-49.
- Castillo, Z. S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Guatemala.

- Chen S. y Harmon A.C. 2006. Advances in plant proteomics. *Proteomics*. 6: 1-13.
- Creighton, T.E. 1993. *Proteins: structures and molecular properties*. 2nd Edition, W. H. Freeman and Company. New York. p. 507.
- Edwards, C. 2000. Ecologically based use of insecticides. In: Rechcigl, J. and Rechcigl, N. (Editors), *Insect pest management, techniques for environmental protection*. USA. pp. 103-130.
- Essamri, M., Deyris, V., y Comeau, L. 1998. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *Biotechnology*. 60: 97-103.
- Fang, W., Leng, Bo, X.Y., JinKai, M.J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y. y Pei, Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 application to improve Fungal Strain Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 363-370.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., y Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*. 4: 3-34.
- Fernández, A. M., Rangel, L. J., Juárez, G. J., Bujanos, M. R., Montes, H. S. y Mendoza, E. M. 2009. Oleorresina de jícama para controlar *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) en semilla de frijol. *Agronomía Mesoamericana*. 1: 59-69.

- Ferrer, N. M. 2005. Análisis de los proteomas de dos micoplasmas: *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Flore, N. A., Tinkeu, N. L., Azéfack, T. L., Mbiapo, T. F. y Hance, T. 2008. Insecticidal effects of the powdery formulation based on clay and essential oil from the leaves of *Clausena anisata* (Willd.) J. D. Hook ex. Benth. (Rutaceae) against *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Pest Science*. 81: 227- 234.
- García, G. C. y Medrano, R. H. 2006. Biotecnología financiera aplicada a bioplaguicidas. Primera Ed. La Casa Editorial. Durango. pp. 91-157
- García, P. H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*. 2:31-34.
- Gaxiola, C.L. 2010. Virulencia de aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* nativos de Sinaloa en *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith). Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte
- Goettel, M. S., Johnson, D. L., e Inglis, G. D. 1995. The role of fungi in the control of grass hoppers. *Botany*. 73: 71-75.

- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Sheibe, B., Wildgruber, R. y Weiss, W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 21: 1037-1053.
- Gupta, S. C., Leathers, T. D., Sayed, G. N., y Ignoffo, C. M. 1994. Relationship among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Invertebrate Pathology*. 64: 13-17.
- Hajek, A. y Leger, R. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Review of Entomology*. 39: 293 - 322.
- Hayden, T.P., Bidochka, M.J. y Khachatourians, G. G. 1992. Entomopathogenicity of several fungi towards the English grain aphid (Homoptera: Aphidae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. *Economic Entomology* 1: 58-64.
- Hegedus, D. D., y Khachatourians, G. G. 1995. The impact of biotechnology on Hyphomycetes fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*. 3: 455-490.
- Jensen, O.N. 2000. Modification-specific proteomics: Systematic strategies for analyzing post-translationally modified protein. *Proteomics: A Trends Guide*, 36-42.

Kosir, J. M., MacPherson, J. M. y Khachatourians, G. G. 1991. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphism. *Journal of Microbiology*. 37: 534-541.

Kyu K, H., Sook H, H., Sang S, D., Chul K, S., Hwang C. y Tae K S. 1999. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. *Biotechnology Letters*. 21: 777-783.

Leger, R. J., Cooper, R. M., y Charnley, A. K. 1988. Utilization of alkanes by entomopatogenic fungi. *Invertebrate of Pathology*. 52: 356-359.

Leger, R. J., Staples, R.C., y Roberts, D.W. 1992. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like Protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* *Gene*. 120: 119-124.

Leger, R. J. 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. *Botany*. 2: 211-229.

Leucona, R., Loc, C. J., Riba, G., Joulie, C., y Juárez, P. 1997. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* spp. on insect lipids. *Economic Entomology*. 1: 119-123.

Lord, J. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Invertebrate Pathology*. 89: 19-29.

Manalil, S. N., Junior T., V., Braithwaite, K., Brumbley, S., Samson, P., y Nevalainen, K. M. 2010. Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles. *Fungal Biology*. 8: 637-645.

Margalith, Y. y Ben, D. 2000. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In: Rechcigl, J. and Rechcigl, N. (Editors), *Insect pest management, techniques for environmental protection*. USA. pp. 243-301.

Martínez, B.N. 2006. *Insectos plaga, una guía ilustrada para su identificación*. Primera ed. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México.

Mata V. T. 2008. Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base de esporas del hongo entomopatógenos *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría. Centro de investigación en Biotecnología Aplicada- IPN, Tlaxcala.

Milner, R., Huppatz, R y Swaris, S. 1991. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *Invertebrate Pathology* 57: 121-123.

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 95-103.

- Murad A., Laumann, R., Mehta, A., Noronha, E. y Franco O. 2007. Screening and secretomic analysis of entomopatogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145: 333-338.
- Murad, A., Noronha, E., Miller, R., Costa F., Pereira, C., Mehta, A., Caldas, R. y Franco, O. 2008. Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*. *Microbiology*. 154: 3766-3774.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Biochemical Chemistry*. 250: 4007-4021.
- PC. Poloprogram. 1987. A user's guide to probit or logit Analysis. Le oro software, Inc. Berkley, Ca. pp. 1-15.
- Pandey, A. y Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 405: 837-846.
- Peinado, G.L. 2011. Estudio de la resistencia inducida por micorrización mediante proteómica comparativa en hojas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, Mill). Tesis de doctorado Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma de Sinaloa.

- Quesada, M., E. y Vey, A. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopatogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycology*. 4: 141-452.
- Rose J.K.C., Bashir S., Giovannoni, J.J., Jahn M.M. y Saravanan S. 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hardles and experimental tool. *The Plant Journal*. 39: 715-733.
- Samsinokava, A., Msikova, A., y Leopold, J. 1971. Acción de sistemas enzimáticos de *B. bassiana* sobre el exoesqueleto de *Galleria melonella* en estadio larvario. *Invertebrate Pathology*. 3: 322-320.
- Silva, F.B., Monteiro, A.S., Del Sarto, R.P., Marra, B.M., Días, S.C., Figueira, E.L., Oliveira, G. R., Rocha, T.L., Souza, D.S., da Silva, M. y Franco, O.L. 2007. Proregion of *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinase: A novel peptide with enhanced selectivity toward endogenous enzymes. *Peptides*. 28: 1292-1298.
- Soto, J. 2008. Caracterización molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y evaluación de su toxicidad sobre el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Tesis de maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN U. Sinaloa
- Tajick, G.M., Asgharzadeh, A., Hadizadeh, A., y Mohammadi, S. M. 2009. A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 4: 152-155.

Tanada, Y., Kaya, H. 1993. Insect Pathology, Academic Press. Fungal Infections San Diego, California. USA. pp. 318-366.

Todorova, S. I., Côté, J. C., Martel, P., y Coderre, O. 1994. Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical test, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Chrysomellidae) and *Coleomegilla maculate lengi* (Col: Coccinellidae) larvae. Entomophaga. 39: 159-169.

Vélez, P., Posada, F.J., Marín, P., Bustillo, A.E., González, M.T.y Osorio, E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Colombia, Cenicafé, Boletín Técnico no. 17. 37 p.

Sitios de internet

<http://www.eluniversal.com.mx/articulos/39081.html>

<http://www.searchuu.com/ebook/GORGOJO>

<http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>

<http://www.ipb.csic.es/servicios/Proteomica/precipitacioacuten-con-metanol-cloroformo.html>

<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0027s/x0027s00.htm>

<http://www.sp2000.org/>

