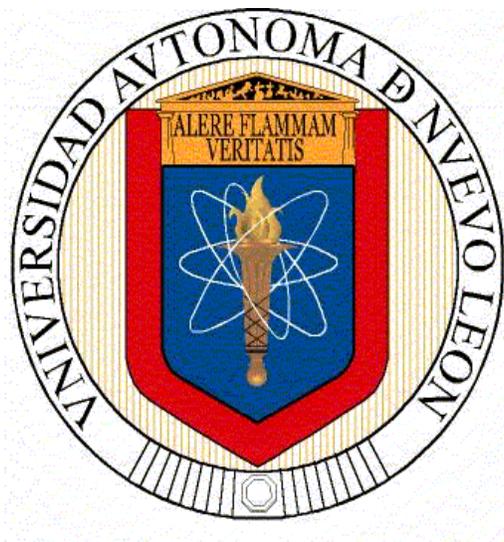


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO Y EFECTIVIDAD DE *Beauveria bassiana* VILLEMIN
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA CUCARACHA URBANA
***Periplaneta americana* L.**

Por

GABRIELA DAMAS BUENROSTRO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Agosto, 2012

**AISLAMIENTO Y EFECTIVIDAD DE *Beauveria bassiana* VILLEMIN
 PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA CUCARACHA URBANA
 Periplaneta americana L.**

Comité de Tesis

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de la tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Secretario

Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado
1^{er} Vocal

Dr. Raúl Torres Zapata
2^o Vocal

Dra. Magdalena Iracheta Cárdenas
3er. Vocal

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1. INSECTO PLAGA: <i>Periplaneta americana</i> L.	7
2.1.1 Taxonomía	7
2.1.2 Ciclo de vida	7
2.1.3 Importancia en Salud Pública	9
2.1.4 Control químico	10
2.1.5 Control biológico	10
2.1.5.1 Hongos entomopatógenos	11
2.1.6 Respuesta inmune de <i>P. americana</i>	12
2.2. CONTROL BIOLÓGICO POR <i>Beauveria Bassiana</i>	14
2.2.1 Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	14
2.2.2 Diversidad y variabilidad genética de <i>B. bassiana</i>	15
2.2.3 Ciclo infectivo	17
2.2.3.1 Adhesión	18
2.2.3.2 Germinación	19
2.2.3.3 Formación de apresorio	19
2.2.3.4 Enzimas hidrolíticas	19
2.2.3.5 Toxinas	20
2.2.3.6 Esporulación	21
2.2.4 Evasión del sistema inmune del insecto	22
2.2.5 Fermentación de <i>B. bassiana</i>	24
2.2.6 Adyuvantes	27
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVO GENERAL	30
4.1 Objetivos particulares	30
5. METODOLOGÍA	31
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO	31
5.1.1 Establecimiento de la colonia de insectos	31
5.1.2 Aislamiento y cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuillemin	31
5.2 EXPERIMENTOS DE <i>B. bassiana</i>	34
5.2.1 Fermentación sólida	34
5.2.2 Fermentación líquida	34
5.2.2.1 Conidios sumergidos y blastosporas (CS+B)	35
5.2.2.2 Sobrenadante filtrado (SF)	35

5.3 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS Y EXPERIMENTOS DE <i>B. bassiana</i>	36
5.3.1 Actividad insecticida	37
5.3.2 Pruebas de viabilidad	38
5.3.2.1 Técnica de número más probable (Unidades formadoras de colonias)	38
5.3.2.2 Porcentaje de germinación	39
5.3.2.3 Actividad celular por el método colorimétrico de reducción del MTT	40
5.4 EVALUACIÓN DE METABOLITOS EN PRODUCTOS FERMENTADOS	41
5.4.1 Liofilización de los tratamientos/experimentos	42
5.4.2 Susceptibilidad de microorganismos a los metabolitos	42
5.4.2.1 Método de difusión en agar	42
5.4.3 Detección de Beauvericina (BEA) por cromatografía en capa fina	43
5.5 TIPIFICACIÓN MOLECULAR	44
5.5.1 Extracción de ADN	44
5.5.2 Determinación de variabilidad entre tratamientos de <i>B. bassiana</i> mediante RAPD	45
5.5.3 Variabilidad entre tratamientos de <i>B. bassiana</i> por análisis de espaciadores internos de transcritos (ITS)	46
5.5.3.1 Amplificación de la región ITS	46
5.5.3.2 Restricción de los productos de PCR	46
5.5.3.3 Purificación de ADN (Productos de la amplificación de la región ITS)	47
5.6 RESPUESTA INMUNE HUMORAL	47
5.6.1 Actividad fenoloxidasa (PO)	47
5.7 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS	48
6. RESULTADOS	50
6.1 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS/ EXPERIMENTOS DE <i>Beauveria bassiana</i>	50
6.1.1 Selección de tratamientos	50
6.1.2 Evaluación del experimento con conidios aéreos (CA)	51
6.1.3 Actividad insecticida (AI)	51
6.1.4 Pruebas de viabilidad	53
6.2 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DESPUÉS DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA	54
6.2.1 Conidios sumergidos y blastosporas (CS+B)	54

6.2.1.1	<i>Actividad insecticida (AI)</i>	54
6.2.1.2	<i>Pruebas de viabilidad</i>	55
6.2.2	Sobrenadante filtrado (SF)	57
6.2.2.1	<i>Actividad insecticida (AI)</i>	57
6.2.2.2	<i>Actividad antimicrobiana del sobrenadante</i>	59
6.2.2.3	<i>Detección de Beauvericina (BEA) por cromatografía en capa fina</i>	61
6.2	FERMENTACIÓN LÍQUIDA USANDO ÁCIDO BÓRICO COMO ADYUVANTE	61
6.3.1	Cinética de crecimiento	62
6.3.2	Evaluación del experimento de CS+B agregando H ₃ BO ₄	64
6.3.2.1	<i>Actividad insecticida (AI)</i>	64
6.3.2.2	<i>Pruebas de viabilidad</i>	66
6.3.3	Evaluación del experimento con sobrenadante filtrado (SF) agregando H ₃ BO ₄	66
6.3.3.1	<i>Actividad insecticida (AI)</i>	66
6.4	ACTIVIDAD INSECTICIDA ENTRE EXPERIMENTOS Y TRATAMIENTOS	67
6.4.1	Actividad insecticida entre experimentos/tratamientos con y sin H ₃ BO ₄	68
6.4.1.1	<i>Actividad Insecticida contra Ninfas tardías</i>	70
6.4.1.2	<i>Actividad Insecticida contra Hembra</i>	70
6.4.1.3	<i>Actividad Insecticida contra Adultos machos</i>	71
6.5	TIPIFICACIÓN MOLECULAR	73
6.5.1	Extracción de ADN total y mitocondrial (ADNmt)	74
6.5.2	Variabilidad de los tratamientos de <i>Beauveria bassiana</i> mediante RAPD	74
6.5.3	Variabilidad entre cepas/aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> mediante el análisis de espaciadores internos transcritos (ITS)	78
6.5.3.1	<i>Amplificación de la región ITS</i>	78
6.5.4	Secuenciación de la región de DNA-ITS	78
6.6	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DEL INSECTO	79
6.6.1	Actividad innata de fenoloxidasa (PO) en <i>Periplaneta americana</i>	79
6.6.2	Actividad fenoloxidasa (PO) de <i>P. americana</i> expuesta a <i>Beauveria bassiana</i>	80
6.6.2.1	<i>Actividad fenoloxidasa de ninfas tardías</i>	81
6.6.2.2	<i>Actividad fenoloxidasa de hembras</i>	82
6.6.2.2	<i>Actividad fenoloxidasa de machos</i>	82
6.7	CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE <i>B.</i>	84

<i>bassiana</i> Y LA ACTIVIDAD FENOLOXIDASA DE <i>P. americana</i>	
6.7.1 Correlación en ninfas tardías	86
6.7.2 Correlación en hembras	86
6.7.3 Correlación en machos	87
7. DISCUSIÓN	88
8. CONCLUSIONES	104
9. LITERATURA CONSULTADA	105
Anexo 1	132

N°	Lista de tablas	Página
1	Taxonomía de <i>P. americana</i>	8
2	Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	15
3	Evaluación de la actividad insecticida y viabilidad del experimento con conidios aéreos de los tratamientos de <i>B. bassiana</i>	51
4	Evaluación del experimento de producción de <i>B. bassiana</i> consistente en conidios sumergidos y blastosporas (CS +B) de los cuatro tratamientos, obtenidos a partir del producto final de la fermentación líquida	55
5	Prueba de susceptibilidad de microorganismos mediante la prueba por difusión en placa a los tratamientos de <i>Beauveria bassiana</i> filtrados a partir del fermentado líquido final	59
6	Diferencias en la viabilidad durante la cinética de crecimiento de los tratamientos de <i>B. bassiana</i> fermentados con diferentes concentraciones de ácido bórico (H ₃ BO ₄) durante 13 días	63
7	Actividad insecticida del producto final de la fermentación líquida (CS+B) con H ₃ BO ₄ de los tratamientos de <i>Beauveria bassiana</i>	65
8	Evaluación de la viabilidad de los tratamientos de <i>B. bassiana</i> del producto final de la fermentación líquida con H ₃ BO ₄	66
9	Matriz de diferencias en la actividad insecticida (% de mortalidad) de los experimentos de producción de <i>B. bassiana</i> por fermentación sólida (conidios aéreos, CA), o fermentación líquida (conidios sumergidos + blastosporas, CS+B), ó 100 µL del sobrenadante filtrado (SF), sobre <i>Periplaneta americana</i> en fase de ninfas tardías, hembras y machos	69
10	Secuencias de los cebadores utilizados en el análisis RAPD, número total de bandas generadas (monomórficas y polimórficas) y el porcentaje de polimorfismo obtenido para cada iniciador	76
11	Matriz de distancias derivado del análisis RAPD de los aislamientos de <i>B. bassiana</i> obtenida del método Jaccard y UPGMA	77
12	Actividad fenoloxidasa (PO) innata (formación de dopacromo-DO detectada a una longitud de onda de 490 nm) en ninfas, hembras y machos de <i>Periplaneta americana</i>	80
13	Actividad insecticida de los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i> expuestos a 1 x 10 ⁶ conidios/mL producidos por fermentación sólida (conidios aéreos, CA), o líquida (conidio + blastosporas sumergidas, CS+B), ó 100 µL de sobrenadante filtrado (SF), contra ninfas tardías, hembras y machos de <i>Periplaneta americana</i> y su correlación con la actividad fenoloxidasa	83
14	Correlación de la actividad insecticida de los experimentos de producción de <i>Beauveria bassiana</i> y la actividad fenoloxidasa en <i>Periplaneta americana</i> en ninfas tardías, hembras y machos	86

N°	Lista de figuras	Página
1	Diferentes etapas de desarrollo de <i>Periplaneta americana</i>	9
2	Región ITS del DNA	17
3	Ciclo de vida de <i>B. bassiana</i>	18
4	Sitios de acción de las proteasas	24
5	Colonia establecida de <i>P. americana</i>	32
6	Aislamientos C3, C4, C5 y C6 de <i>B. bassiana</i> provenientes de insectos colectados en su ambiente natural.	33
7	Fermentación en cultivo líquido de los tratamientos seleccionados del hongo <i>B. bassiana</i>	35
8	Proceso de filtración llevado a cabo en cada uno de los tratamientos después de finalizado el tiempo de fermentación	36
9	Colonias observadas de la cuenta viable de <i>B. bassiana</i> sobre un sustrato sólido (PDA)	39
10	Conidios con presencia de tubo germinativo al observar las muestras directamente al microscopio (40x)	40
11	Técnica de actividad celular usando el cambio de color por la reducción de la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT).	41
12	Porcentaje de mortalidad de <i>Periplaneta americana</i> expuesta a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i> del experimento con conidios aéreos	52
13	Porcentaje de mortalidad de <i>Periplaneta americana</i> expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i> del experimento de conidios sumergidos + blastosporas	56
14	Porcentaje de mortalidad de <i>Periplaneta americana</i> expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i> del experimento con sobrenadante filtrado	58
15	Bioensayo de evaluación de toxicidad del sobrenadante (Filtrado) mediante el método de difusión en pozo en agar a bacterias sensibles a las micotoxinas de <i>B. bassiana</i>	60
16	Valor de <i>Rf</i> del estándar de Beauvericina	62
17	Cinética de crecimiento de los tratamientos de <i>B. bassiana</i> fermentados con diferentes concentraciones de ácido bórico (H_3BO_4) durante 13 días	64
18	Mortalidad de <i>Periplaneta americana</i> expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i> a partir del producto final de la fermentación líquida y posteriormente filtrados agregando H_3BO_4 .	68
19	Mortalidad de <i>Periplaneta americana</i> en fase de ninfas tardías expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i>	71

20	Mortalidad de <i>Periplaneta americana</i> en fase de adultos hembras expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i>	72
21	Mortalidad de <i>Periplaneta americana</i> en fase de adultos machos expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i>	73
22	Productos de amplificación de ADN usando los cebadores OP de la serie A (10,11 Y 15), B (08), AB (18) y D (13)	75
23	Dendograma derivado del análisis RAPD de los aislamientos de <i>B. bassiana</i>	77
24	Productos de amplificación de ADN-ITS de los aislamientos de <i>B. bassiana</i>	78
25	Actividad fenoloxidasa (PO) innata en <i>Periplaneta americana</i> en estados ninfales y adultos (hembras y machos)	79
26	Actividad fenoloxidasa (PO) en ninfas tardías de <i>Periplaneta americana</i> expuestas a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i>	81
27	Actividad fenoloxidasa (PO) en hembras de <i>Periplaneta americana</i> expuestas a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i>	84
28	Actividad fenoloxidasa (PO) en machos de <i>Periplaneta americana</i> expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de <i>Beauveria bassiana</i>	85

RESUMEN

La cucaracha urbana *Periplaneta americana* L. es un vector mecánico de muchos patógenos microbianos de humanos. Su principal control es por insecticidas químicos y en menor grado por bioinsecticidas, incluyendo hongos entomopatógenos. En el presente trabajo, evaluamos la patogenicidad de cuatro tratamientos del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin, dos cepas comerciales (C1 y C2) y dos aislamientos de insectos infectados colectados en Nuevo León, México (C4 y C6). Para determinar su actividad insecticida contra la cucaracha, los cuatro se produjeron y evaluaron como conidios aéreos (CA) producidos por fermentación sólida, o conidios en sumersión + blastosporas (CS+B) y sobrenadante filtrado (SF), producidos por fermentación líquida estos productos de fermentación fueron evaluados como tres experimentos por separado. La actividad de fenoloxidasa (PO) en insectos es un mecanismo de defensa de tipo inmediata contra patógenos. En una evaluación preliminar entre insectos sin tratar observamos que los estadíos ninfales tardíos, las hembras y los machos presentaban mayor activación de PO, así que se evaluaron las diferencias en entre estas variables (ninfas tardías, hembras y machos de *P. americana*), antes y después de exponerlas a los diferentes tratamientos y experimentos descritos. Observamos que la actividad insecticida era dependiente del tratamiento y propágulo, así como de la toxicidad de los metabolitos presentes en el sobrenadante, y era diferente para cada variable, donde la susceptibilidad de las hembras fue mayor que para los machos y esta fue a su vez mayor que en ninfas tardías, mientras que entre experimentos fue mayor con CS+B seguido por SF y menor con CA. En general, de las variables estudiadas, las ninfas tardías fueron las menos susceptibles, el tratamiento C4 fue el más virulento y el experimento SC+B el más patogénico. Sólo un experimento con CA y el tratamiento C4, mostró mortalidad mayor al 40%, y únicamente contra hembras; contra ninfas, el experimento con CA no mostró diferencias al compararlo contra el control sin tratar. También se observó una relación inversamente proporcional entre virulencia y actividad de PO. El análisis de correlación de Pearson reveló una asociación significativa entre el aumento de la mortalidad en *B. bassiana* y la reducción de la actividad de PO, donde se observó que en ninfas tardías y machos tratados con CS+B y CA existía una correlación negativa al comparar la mortalidad y la actividad PO.

Además, la variabilidad genética de las cepas y aislamientos se definió y agrupó en patrones de banda, mediante el análisis RAPD y por la secuenciación de la región ITS. Se discute el papel que juega la fuente de *B. bassiana* y si se aplican CS+B o SF en lugar de CA, con la virulencia contra *P. americana* y la activación de la PO por el insecto.

ABSTRACT

The urban cockroach *Periplaneta americana* L. is a mechanical vector of many human microbial pathogens. Its main control is by chemical insecticides and to a lesser extent by bio-insecticides, including entomopathogenic fungi. In the present study we evaluated the pathogenicity of four treatments of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin, two commercial strains (C1 and C2) and two isolates from infected insects collected in Nuevo Leon, Mexico (C4 and C6). To determine their insecticidal activity against cockroaches, the four treatments were produced and assessed as aerial conidia (AC) produced by solid fermentation, or submerged conidia + blastospores (SC + B) and filtered supernatant (FS), produced by fermentation liquid. The phenoloxidase activity (PO) is an innate defense mechanism against arthropods pathogens. In a preliminary assay testing untreated insects, it was observed that late instar nymphs, females and males showed greater PO activity. Based on this, we evaluated the differences between these variables (late instar nymphs, females and males of *P. americana*), before and after exposing them to the different treatments and experiments, described above. We noticed that the insecticidal activity was dependent on the treatment and propagule, as well as the toxicity of metabolites in the supernatant. In addition, insecticidal activity was different among variables, where the susceptibility of females was greater than that of males and late instar nymphs, whereas CS + B susceptibility was greater than that of SF and CA. Among variables, late instar nymphs were the least susceptible, C4 treatment was the most virulent, and SC+B was the most pathogenic. Only the experiment with AC and C4 treatment showed mortality higher than 40% against females; whereas no differences with AC against nymphs were observed as compared with untreated control. We also observed an inverse relationship between virulence and PO activity. Pearson correlation analysis revealed a significant association between increased mortality by *B. bassiana* and the reduction of PO activity by *P. americana*, which showed a negative correlation among late instar nymphs and males treated with CS + B and AC, when comparing mortality and PO activity. Additionally, in assessing the genetic variability among *B. bassiana*, strains and isolates were grouped in band patterns using RAPD analysis and sequencing of the ITS region. We discuss the role of *B. bassiana* source and whether the virulence against *P. americana* could be improved by CS+ B or FS instead of CA, and the activation of PO by the insect.

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la sobrepoblación mundial, el crecimiento de las grandes ciudades ha sido un factor determinante en una mal planeada urbanización, carente de drenaje y servicios de agua inadecuados, lo que ha fortalecido el desarrollo de organismos patógenos para humanos (Tompkins *et al.*, 2011). Los insectos, juegan un papel trascendental ya que se sabe que algunos de ellos son transmisores de microorganismos patógenos que causan enfermedades (Tachbele *et al.*, 2006). Estos insectos vectores presentan una rápida adaptación al ambiente habitado por humanos, los cuales se establecen y aparecen en nuevas áreas, siendo responsables de epidemias históricas como malaria, fiebre amarilla, tifus, entre otras (Lounibos, 2002). Algunas cucarachas, especialmente de las especies de *Blatella germanica* L. y *Periplaneta americana* L., son transmisores mecánicos de microorganismos patógenos a humanos. Así mismo, se ha asociado a la cucaracha americana *P. americana* con la transmisión de protozoarios y bacterias enteropatógenas tales como *Salmonella* spp., y algunos estudios han mostrado que estos microorganismos pueden sobrevivir hasta 10 meses en el tracto digestivos de estos insectos (Fathpour *et al.*, 2003; Graczyk *et al.*, 2005; Zarchi y Vatani, 2008). Recientemente, se ha reportado a las cucarachas como potenciales acarreadores de patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., en alimentos contaminados (Blazar *et al.*, 2011). Otros estudios han encontrado hasta un 93% de poblaciones bacterianas en el exoesqueleto de *P. americana* (Pechal *et al.*, 2007), lo que facilita el riesgo de transmisión de patógenos en lugares de alto riesgo, como hospitales (Fathpour *et al.*, 2003, Zarchi y Vatani, 2008). Sin embargo, se ha encontrado que las bacterias que se encuentran al interior del tracto digestivo de las cucarachas son más patogénicas que las que se encuentran al exterior (Fakoorziba *et al.*, 2010).

Los bioinsecticidas a base de hongos como *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok,n, se han empleado en el control de plagas agrícolas e insectos vectores de interés en Salud Pública, incluyendo a los órdenes Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Tisanoptera y Ortoptera. Los insecticidas químicos son el primer recurso para el control de cucarachas, no obstante se ha visto que los hongos entomopatógenos antes mencionados proveen un método de control adecuado (Stimac y

Pereira, 2006; Zimmermann, 2007). Desafortunadamente, las pruebas de campo no han mostrado un eficiente control de los entomopatógenos contra *P. americana* (Milner y Pereira, 2007).

Por otro lado, se ha visto que las cucarachas tienen un sistema inmune bien desarrollado contra infecciones y esta podría ser una de las razones que limitan la eficacia de los bioinsecticidas (Elliot y Hart, 2010). La mayoría de los productos a base de *B. bassiana* contienen conidios producidos por fermentación sólida, seguida por productos que contienen hifas combinadas con conidios, y los menos usados son productos que contienen blastosporas y conidios sumergidos, producidos por fermentación líquida (de Faria y Wraight, 2007).

La patogenicidad de *B. bassiana* está relacionada con varios factores. La caracterización de algunas toxinas y enzimas fúngicas, ha sido esencial para entender y demostrar el modo de acción del entomopatógeno. Aunque las cualidades de las conidios de germinación, esporulación y crecimiento hifal no son consideradas por muchos como un factor de virulencia propiamente dicho, ya que ésta se presenta como parte del desarrollo del hongo, se ha visto que la cantidad de esporas y la viabilidad de éstas se encuentran directamente relacionadas con el tipo de aislamiento, difiriendo en la virulencia (Kassa et al., 2008). En un estudio reciente se ha comprobado que un solo gen (*Bbslt2*) es esencial y juega un papel importante en la conidiación, viabilidad, integridad de la pared celular y la virulencia de *B. bassiana* (Lou et al., 2012). Otra parte importante de la diferencia en susceptibilidad de *B. bassiana* está dada por el origen de aislamientos. El potencial de aislamientos nativos como agentes de control ha sido comparable en virulencia a aislamientos comerciales de *B. bassiana* (GHA). La caracterización genética entre aislamientos nativos, en comparación con aislamientos comerciales, es importante para conocer el origen y naturaleza de *B. bassiana* para el control de plagas (Castrillo et al., 2010). Otros factores tales como la actividad de inhibidores de proteasas, que son parte del sistema inmune de los insectos, contribuyen en las diferencias en la susceptibilidad (Schmid-Hempel, 2005; Vilcinskas y Götz, 1993).

La primera línea de defensa de los insectos es el integumento. Una vez que un microorganismo se introduce, se activan tanto la respuesta celular (hemocitos) y/o humoral (péptidos antimicrobianos) innatas del insecto (Gillespie et al., 1997). En la respuesta

celular, los hemocitos son estimulados, activando a su vez la zimoenzima pro-fenoloxidasa (PPO) en fenoloxidasa (PO) (Fisher y Brady, 1983). La actividad PO es considerada la primera línea de defensa y no sólo se ha encontrado en la hemolinfa, sino también en el integumento, la cual, en conjunto con la enzima ácido aromático-L-amino descarboxilasa (DOPA), forma parte de la cascada de la producción de melanina (Hiruma y Riddiford, 2009). Esto podría ser una evidencia de que el mecanismo de defensa de los insectos podría ayudar en la desintoxicación de las toxinas producidas por los hongos, y ésta relación entre la producción de metabolitos y la respuesta inmune, puede ayudar a entender el por qué en la diferencia de patogenicidad de los aislamientos producidos en diferentes métodos y medios de cultivo (Mustafa y Kaur, 2010; Vey y Butt, 2001).

La actividad PO a través de las diferentes etapas del ciclo de vida de las cucarachas y su relación a la infección del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, podría ayudar a esclarecer la respuesta inmune humoral de *P. americana*. La producción de diferentes propágulos de *B. bassiana* mediante fermentación sólida (conidios aéreas) o fermentación líquida (conidios sumergidos + blastosporas/metabolitos), podría afectar la actividad de PO, y esto podría explicar las diferencias en la susceptibilidad de *P. americana* después de ser expuestas a *B. bassiana*.

En el presente estudio, nosotros reportamos las diferencias en la actividad de PO entre adultos hembras y machos, así como en ninfas tardías de *P. americana*, antes y después de exponerlas a varios tipos de propágulos producidos por fermentación sólida o líquida, de cuatro aislamientos de *B. bassiana* (2 comerciales y 2 nativos). Además, observamos que la actividad insecticida es dependiente del aislamiento y propágulo, así como de la toxicidad de los metabolitos producidos durante la fermentación líquida, y que éstas características fisiológicas están relacionadas con la variabilidad genética del entomopatógeno.

2. ANTECEDENTES

Las cucarachas representan una de las principales plagas urbanas a nivel mundial por ser transmisores mecánicos de microorganismos patógenos, además de inducir reacciones alérgicas a individuos susceptibles. Se conocen más de 45 patógenos que pueden transmitir a través de patas, heces y regurgitamientos (Salehzadeh *et al.*, 2007). Para su control se aplican pesticidas químicos, pero se ha comprobado el desarrollo de resistencia a éstos, por lo que se dificulta su control, además de ser tóxicos al hombre, al ambiente e insectos no blanco (Pai *et al.*, 2005). El control con químicos inorgánicos, en su mayoría desecadores, es adecuado y poco tóxico, pero de baja residualidad (Cochran, 1989). El uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas urbanas ha sido enfocado a aquellas especies de importancia dentro de Salud Pública. Se ha demostrado que las cucarachas son susceptibles a dos especies de hongos principalmente, *B. bassiana* e *Isarea (Paecilomyces) farinosus* (Zukowski y Bajan, 1997; Zimmermann, 2008). *B. bassiana* se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregulares (Gillespie, 1988), es la especie más estudiada, dentro de su grupo, y se ha reportado su uso para el control de cucarachas de la especie *B. germanica*, donde se utilizan esporas y el hongo germinado. Existe actualmente una patente de un producto a base de *B. bassiana* que consiste en estaciones de contacto donde la cucaracha se infecta al pasar por ellas (Stimac y Pereira, 1997), pero es necesario realizar investigación enfocada al control de *P. americana*. A pesar de que el uso de *B. bassiana* ha dado resultados satisfactorios para el control de este tipo de plagas, la desventaja de que el hongo ocasiona una muerte lenta y quizá, desagradable a la vista del consumidor, ya que el insecto infectado presenta una apariencia blancuzca-algodonosa, típica del micelio del hongo, así como su vida de anaquel corta, hace difícil su comercialización y aceptación por la sociedad, por lo que es necesario implementar nuevas alternativas para alentar el control biológico de esta plaga, incrementando la velocidad de muerte del insecto, tratando de mejorar la efectividad de los hongos entomopatógenos. Zukowski y Bajan (1997) reportaron que la combinación de insecticidas fúngicos a base de esporas de *B. bassiana* e *I. farinosus*, logró reducir el número de la población de *B.*

germanica, manejando diferentes tiempos de aplicación entre cada especie de hongos entomopatógenos. Derivado de las características infectivas de los hongos entomopatógenos, y en particular de *B. bassiana*, quienes presentan un amplio espectro de actividad, además de que se tienen reportes diversos de su producción y formulación necesaria para lograr un bioinsecticida competitivo, se han desarrollado nuevos productos con una mayor efectividad y vida de anaquel, e incluso combinándolos con otros agentes bioinsecticidas no tóxicos, que sean capaces de competir con productos químicos de uso común contra insectos plaga urbanas como las cucarachas (Zukowski y Bajan, 1996; Smith *et al.*, 1997a; -1997b).

2.1. INSECTO PLAGA: *Periplaneta americana* L.

2.1.1 Taxonomía

La cucaracha americana se encuentra dentro de las cinco especies de cucarachas más comunes en hogares: *Blatta orientalis* L., *Blattella germanica* L., *Periplaneta americana* L., *P. fuliginosa* (Serville), y *Supella longipalpa* (F.) (Moore *et al.*, 1983). Dentro del género *Periplaneta* se incluyen 47 especies, de las cuales ninguna es endémica de América, sino que han sido introducidas por el hombre (Bell y Adiyodi 1981). Dentro de estas especies, *P. americana* se encuentra ampliamente distribuida en toda América, incluyendo México. La taxonomía de esta especie se muestra en la Tabla 1.

2.1.2 Ciclo de vida

Las cucarachas son omnívoras ya que se alimentan de una gran variedad de materiales, preferentemente que contengan almidón y azúcares, que es una de las tantas ventajas que le ha dado ese grado tan alto de sobrevivencia (Kells *et al.*, 1999; Appel,

1998). Es un insecto hemimetábolo, de metamorfosis incompleta en fases juveniles llamadas ninfas (Salecker y Boeckh, 1994). La cucaracha adulta es ovípara y coloca sus huevecillos en compartimientos llamados ootecas (Bell y Adiyodi, 1981) (Fig. 1).

Tabla 1. TAXONOMÍA DE *P. americana*

Reino	Animal
Filum	Artrópodo
Subfilum	Hexapodo
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota ó insecto alado
Infraclase	Neoptera ó insecto con alas plegadas
Orden	Dictyoptera
Suborden	Blattaria
Superfamilia	Blattoidea
Familia	Blattidae
Subfamilia	Blattinae
Género	<i>Periplaneta</i> Burmeister, 1838
Especie	<i>Periplaneta americana</i> (Linnaeus, 1758)

http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=102406
Taxonomic Serial No.: 102406

La **ooteca** es producida una semana después de su apareamiento y contiene de 14 a 16 huevecillos, aproximadamente. Las hembras seleccionan un sustrato específico, rico en carbohidratos, así como humedad suficiente para la ovoposición y embriogénesis (Bell y Adiyodi 1981; Schal *et al.*, 1984). Se ha reportado que la embriogénesis dura alrededor de 31 días (Salecker y Boeckh, 1994), tiempo en el cual eclosionan los huevos.

Una vez que han emergido las cucarachas de las ootecas, lo hacen en estado de **ninfa**, el cual es considerado la primera fase. Se han reportado hasta 14 fases de ninfas antes del adulto, teniendo un promedio de 9 fases, cuyo cambio de fase es marcado por la escisión. El tiempo que tardan las ninfas en madurar en adultos, se ha visto que es hasta de 600 días, tiempo en el cual son altamente activas en alimentación y en beber agua (Bell y Adiyodi, 1981).

La fasa **adulta** del insecto puede sobrevivir hasta un año, y las hembras pueden producir hasta 150 huevos en su vida. Los factores de humedad y temperaturas son críticos

para su sobrevivencia. Se ha observado que las hembras prefieren sitios de alta humedad y temperatura para colocar sus huevos (Bell y Adiyodi, 1981).

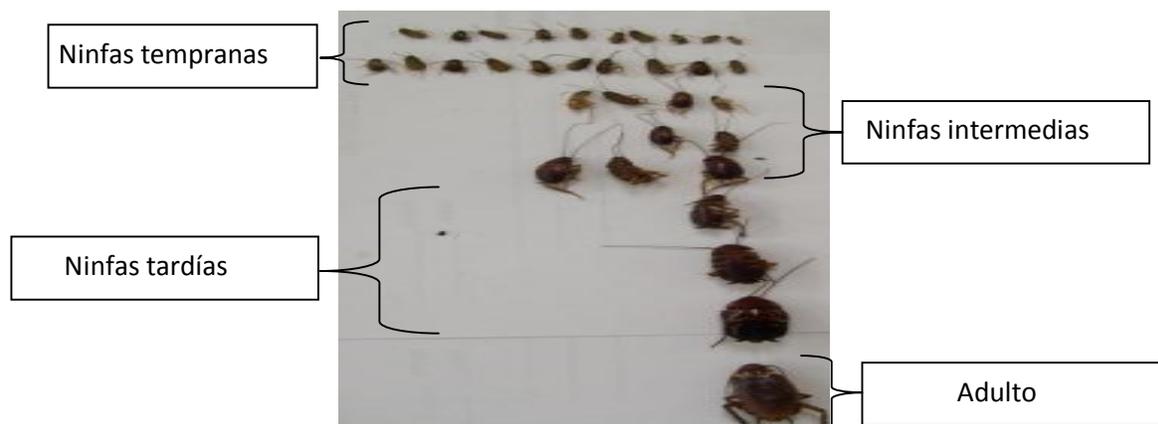


Fig.1. Diferentes etapas de desarrollo de *Periplaneta americana*.

2.1.3 Importancia en Salud Pública

Las cucarachas son importantes transmisores mecánicos de importancia en Salud Pública, por ser portadoras de microorganismos patógenos para el hombre (Fotedar *et al.*, 1989; Tاتفeng *et al.*, 2005; Ulewicz y Zawistowski, 1973). Las especies de mayor importancia en el continente americano son *P. americana* y *B. germánica* (L) (Dictyoptera: Blattidae) (Appel, 1986; Hsiu-Hua *et al.*, 2005). Las cucarachas pueden transmitir agentes patógenos como bacterias, hongos, protozoarios, helmintos y virus de manera mecánica, causando disenterías, gastroenteritis y neumonías, entre otras enfermedades (Graczyk *et al.*, 2005; Elgderi *et al.*, 2006). Además, se ha relacionado las reacciones de tipo alérgicas en humanos con la presencia de heces fecales, saliva, cutícula y huevos de las cucarachas en individuos susceptibles (Jeanson y Deneubourg, 2006). En México, la cucaracha americana *P. americana* está ampliamente distribuida como plaga urbana; es una de las más comunes en casas habitación, hoteles, restaurantes y edificios, al igual que en otras partes del mundo (Fotedar *et al.*, 1991; Salehzadeh *et al.*, 2007).

2.1.4 Control químico

El uso del control químico es el primer recurso contra este tipo de plagas urbanas. Sin embargo, se dificulta su uso debido al potencial desarrollo de resistencia de estos insectos a los insecticidas químicos de uso común (Pai *et al.*, 2005; Pridgeon *et al.*, 2002). Entre los ingredientes empleados, se pueden mencionar los elaborados a base de químicos orgánicos, como la hidrametilona, sulfluramidas y abamectina, por lo que su uso queda limitado hasta que las especies de cucarachas ya no sean susceptibles a este tipo de control (Wei *et al.*, 2005; Laupraset *et al.*, 2010). El alto grado de toxicidad, así como los efectos perjudiciales al ambiente y la rápida aparición de resistencia, ha abierto el panorama al uso de nuevas alternativas menos nocivas.

2.1.5 Control biológico

El control biológico representa una alternativa más para el manejo integrado de insectos plaga. Este tipo de control se basa en la utilización de organismos vivos o sus productos, con capacidad de infectar o intoxicar al insecto blanco e inducir la muerte, o alterar su metabolismo para afectar su longevidad y/o reproducción (Hoffmann y Frodsham, 1993). Como microorganismos entomopatógenos para el control de cucarachas se han reportado principalmente hongos, entre los que destacan *B. bassiana* (Waseem *et al.*, 2004; -2005; Zukowski y Bajan, 1996), *M. anisopliae* (Quesada-Moraga *et al.*, 2004), *I. farinosus* (Zukowski y Bajan, 1997), *Moniliformis moniliformis* (Moore *et al.*, 1994) y especies de *Aspergillus* (Kulshrestha y Pathak, 1997) y la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Lee *et al.*, 1984; Zukowski, 1993). En su conjunto, esta información representa una alternativa de biocontrol sobre plagas de insectos de importancia en salud, agricultura y post-cosecha (Zukowski, 1994; -1995). Una de las mayores ventajas del uso de los entomopatógenos, es que son seguros para la salud e inducen resistencia en menor grado comparado con los químicos; además que en el caso de algunos, se puede dar la transmisión de insecto a insecto (auto-diseminación del agente de biocontrol) (Goettel y Roberts, 1992).

Debido a que las cucarachas son insectos sociales, su control con empleo de entomopatógenos le confiere una gran ventaja, ya que a diferencia de los químicos, donde no existe tal transmisión, la dispersión de los microorganismos puede permanecer por un tiempo prolongado, ampliando el periodo de control y por ende, podría permitir aplicar un producto más caro, pero requerir de menos aplicaciones para obtener resultados similares (Jeanson y Deneubourg, 2006). Otra ventaja se podría dar si las dosis que se utilizan son relativamente bajas (Stamets, 2003). Sin embargo, el uso de este tipo de control presenta también desventajas tales como a) mayor tiempo para causar la muerte, b) costos elevados para su producción, y c) diferencias en la susceptibilidad en diferentes fases de desarrollo; o bien verse afectado por factores ambientales como radiación solar, humedad, temperatura, lavado por lluvia o tener una vida de anaquel menor a la de los químicos (Zurek *et al.*, 2003; García-Gutiérrez *et al.*, 2007).

2.1.5.1 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son de los más ampliamente utilizados, ya que a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo (Stamets, 2003). Estos microorganismos pueden infectar a los insectos directamente, a través de la penetración de la cutícula, y ejercen múltiples mecanismos de acción, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia (Samson *et al.*, 1988). Sin embargo, estos hongos pueden producir metabolitos secundarios que tienen capacidad bioactiva, es decir que pueden producir una respuesta tóxica en diferentes organismos (Gupta *et al.*, 1995). De los géneros más utilizados podemos encontrar a *Aschersonia*, *Akanthomyces*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Paicelomyces*, *Verticillium* y *Zoophthora* (Tanada y Kaya, 1993; Zimmermann, 2008). La mayoría son patógenos obligados o facultativos y algunos son simbióticos; entre ellos existen especies que son específicas de su hospedero, mientras que otros como *B. bassiana* y *M. anisopliae* han demostrado tener más de 100 hospederos.

2.1.6 Respuesta inmune de *P. americana*

Los insectos pueden deshacerse rápidamente de infecciones microbianas produciendo una variedad de moléculas inducidas por el sistema inmune, incluyendo péptidos y polipéptidos antibacterianos y anti fúngicos. Esto es especialmente cierto para cucarachas. Se ha mencionado que son éstos insectos los que presentan el sistema inmunológico mejor desarrollado (Chernysh, 2002; Kawasaki *et al.*, 1996).

En un estudio realizado con el escarabajo *Zophobas atratus*, se observó en la hemolinfa la aparición de la actividad de un antibacterial potente de este coleóptero en un ensayo de crecimiento de inhibición en placa. De la hemolinfa se aislaron tres péptidos (a-c), lo que probablemente explicaba ésta actividad. Entre ellos, el péptido *a* era bactericida contra las bacterias gram negativas, mientras que los péptidos *b* y *c*, contra las gram positivas (Bullet *et al.*, 1991). Para el caso de las cucarachas, los primeros reportados fueron péptidos que se unían a lipopolisacáridos, similares a la respuesta inmune humoral, a nivel de hemocele (Jomori *et al.*, 1991; Jomori y Natori, 1992). Estos péptidos, con capacidad de unirse a lipopolisacáridos, se reportaron en diferentes insectos y posteriormente se denominaron péptidos antimicrobianos (PAM) (Sun *et al.*, 1990, Chernysh *et al.*, 2002). Dentro de los PAMs reportados en las cucarachas, el más conocido es la lectina, producida en el hemocele (Kubo y Natori, 1987; Y-Zhu *et al.*, 2006). Posteriormente, se encontró que este PAM estaba involucrado en la regeneración de las patas en la cucaracha (Kubo *et al.*, 1990). Esto permitió suponer que juega un papel muy importante en la curación después de la infección por agentes patogénicos que causan problemas a nivel de cutícula (Demark y Bennett, 1989). Posteriormente se encontró un péptido muy pequeño de 10 kD, que ayudaba a incrementar la actividad regenerativa (Kitabayashi *et al.*, 1998). En cuanto a respuesta celular, en forma generalizada se ha reportado a los hemocitos como los responsables de regular el sistema inmunitario en insectos (Brayner *et al.*, 2007). Su actividad está relacionada con la producción de profenol-oxidasa (PPO), y su relación con algunos PAM, como la defensina (Hillyer y Christensen, 2005). Otras proteínas relacionadas en la respuesta inmune es la 5-hydroxytryptamina y la octopamina, que se ha visto que mejoran el efecto de la fagocitosis

la y formación de nódulos por parte de los hemocitos en la cucaracha *P. americana* (Baines *et al.*, 1992).

Tratando de entender el por qué en algunas ocasiones se tienen diferencias en la susceptibilidad de algunos insectos a los entomopatógenos, se ha relacionado la inactivación de las toxinas por medio de actividad enzimática (Oppert, 2006). Por el contrario, se ha reportado que la presencia de microorganismos, habitantes comunes en el intestino, como especies de *enterococcus* y *enterobacter*, contribuyen a la activación de las mismas (Broderick, 2006). También se ha reportado que algunos entomopatógenos son capaces de producir péptidos que ayudan a neutralizar al sistema inmunitario celular de los insectos (Asgari *et al.*, 1998). Así mismo, se observó que la cucaracha adulta de *P. americana* presenta una respuesta adaptativa del tipo humoral, mostrando especificidad cuando se inmunizan con ciertas proteínas, y que la inmunización con microorganismos atenuados, como *Pseudomonas aeruginosa*, inducen mayor protección contra infecciones de esta misma bacteria (Faulhaber y Karp, 1992). Se ha correlacionado la susceptibilidad de *P. americana* a infecciones por entomopatógenos con el estado de desarrollo de las cucarachas y a la producción de enzimas como parte de la respuesta del sistema humoral. Aunque los antecedentes de este tipo de estudios en *P. americana* datan de más de 40 años, es importante destacar la relación entre la disminución del complejo de proteínas del sistema inmune humoral y la fase del insecto, donde este complejo disminuye en ninfas tempranas y adultos viejos (Rheins y Karp, 1985). Recientemente se ha visto que estos componentes ayudan en la respuesta inmune de los insectos contra bacterias, hongos y virus (Iwanaga y Lee, 2005). Dentro de este complejo de proteínas se encuentra la fenoloxidasa (PO), como parte de la cascada de melanización en el sistema inmune de artrópodos, y se ha encontrado en la hemolinfa y cutícula en forma inactiva, llamada profenoloxidasa (PPO) (Ashida y Brey, 1998). La PPO se activa partir de la de la oxidación por efecto de la L-DOPA (3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina) en PO (Söderhäll y Cerenius, 1998). La forma activa de PPO, la PO, también es conocida como tirosinasa, y es catalizadora de dos reacciones sucesivas; la primera es la hidroxilación de monofenoles a *O*-difenol, y la segunda es la oxidación de *O*-difenol a *O*-quinina (Sugumaran, 2002). La producción de los intermediarios de quinonas tóxicas y *O*-quinonas por PO, es el paso inicial de la cascada bioquímica de la biosíntesis de melanización, y es importante en la

esclerotización cuticular, cicatrización de heridas, y en la encapsulación de cuerpos extraños como parte de la defensa inmune (Cerenius y Söderhäll, 2002). Desde tiempo atrás, se reportó que la PO es una enzima altamente activa en la cutícula y en la hemolinfa, antes de la muda de *P. americana*, y se vuelve menos activa durante y después de la ecdisis (Mills *et al.*, 1968). Para la determinación de la actividad *in vitro* de la PPO a partir de la hemolinfa de *P. americana*, se han usado sustratos como alcoholes y/o L-DOPA que oxiden la proenzima a PO y difenoles (Fisher y Brady, 1983; Huxham *et al.*, 1989).

Por todo lo anterior, es importante tener la información completa que nos ayude no sólo a evaluar el potencial de un bioinsecticida para el control de cucarachas urbanas, sino que es necesario también entender el mecanismo de acción del patógeno, la respuesta inmunológica del insecto y el papel que juega los microorganismos en la respuesta inmune.

2.2. CONTROL BIOLÓGICO POR *Beauveria Bassiana*

2.2.1 Taxonomía de *Beauveria bassiana*

B. bassiana es un hongo anamórfico que produce conidios hialinos esféricos, que se ha reportado como patógeno de artrópodos. Anteriormente se había clasificado dentro del género *Beauveria* Vuill., junto con tres especies de importancia agrícola, *B. bassiana*, *B. brongniartii* y *B. alba* (Hoog, 1972). Vuillemin (1912) clasificó a *Beauveria* dentro de la familia Verticillaceae. Filogenéticamente se ha evidenciado que *Beauveria* está asociado con la familia Cordycipitaceae del orden Hypocreales. Así mismo, se ha reportado que *B. bassiana* y *B. brongniartii* están ligados en desarrollo y filogenéticamente a las especies *Cordyceps* (Rehner *et al.*, 2011). *B. bassiana* representa la parte asexual, mientras que *Cordyceps bassiana* la parte sexual (Rehner y Buckley, 2005). La taxonomía se describe en la Tabla 2.

2.2.2 Diversidad y variabilidad genética de *B. bassiana*

Se ha comprobado que existe una gran diversidad entre aislamientos de *Beauveria* spp. mediante técnicas moleculares (St Leger *et al.*, 1992). Así mismo, el uso de las herramientas genéticas ha ayudado en la determinación de la variabilidad genética de *B. bassiana*. Las técnicas de RFLP de los *internal transcribed spacer* (ITS) del DNA, al igual que las técnicas usando los marcadores *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD), los *cDNA-amplified fragment length polymorphism* (AFLPS) e *inter-simple sequence repeat* (ISSR), son útiles para diferenciar entre especies de *Beauveria*, además de diferenciar polimorfismos y diversidad genética entre aislamientos de una misma especie (Glare y Inwood, 1998; Padmavathi *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2007; Aquino de Muro *et al.*, 2006; Estrada *et al.*, 2005).

Tabla 2. TAXONOMÍA DE *Beauveria bassiana*¹

Reino	Fungi
Sub-reino	Dikarya
Filum	Ascomycota
Sub-filum	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Sub-clase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	Cordyceps
Especie	<i>Beauveria bassiana</i> (Vuillemin, 1912)

¹NCBI: <http://www.uniprot.org/taxonomy/475271>

En un estudio entre aislamientos de *B. bassiana*, de distintas regiones mediante la técnica *fingerprinter* y RAPD, se encontró que cada aislamiento tenía una huella dactilar única. Los autores reportaron que los distintos aislamientos de *B. bassiana* contenían el

mismo número de cromosomas (5 a 8), pero no mostraban morfología ni virulencia distinta (Padmavathi *et al.*, 2003).

El uso de RAPD-DNA en el estudio de variabilidad genética también permite conocer el origen y ecología de poblaciones de *B. bassiana*. En un estudio se demostró que ciertos genotipos de *B. bassiana* nativos del suelo tienen la capacidad para infectar al picudo acuático del arroz, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel, mientras que otros no, a partir de la comparación entre aislamientos de *B. bassiana* de insectos de campo y de aislamientos del suelo mediante esta técnica (Urtz y Rice, 1997). Se ha demostrado que las técnicas moleculares RAPD y RFLP, son útiles para diferenciar entre aislamientos patógenos de determinada especie de insectos (Dalzoto *et al.*, 2006). Un ejemplo de esto se reportó al determinar diferencias en el patrón genético entre los aislamientos de *B. bassiana* obtenidos de lepidópteros (Pyralidae) y coleópteros (Curculionidae, Chrysomelidae y Scolytidae) de varias localidades, mostrando una relación entre la población y especie hospedera (Maurer *et al.*, 1997). Sin embargo, Coates *et al.* (2001), mediante RFLP-PCR de la región ITS, no encontraron correlación entre el haplotipo y origen, con el rango de hospederos examinados. Algunos otros marcadores genéticos como ISSR son utilizados para estudios de poblaciones genéticas, epidemiológicos y ecológicos de hongos entomopatógenos (Wang *et al.*, 2005), como la superposición de nichos que ocupa *B. bassiana* por temporada (Ormond *et al.*, 2010). Mediante la expresión genética por la técnica cDNA-AFLPS se ha tratado de encontrar patrones que expliquen el amplio rango de hospederos de *B. bassiana* en su fase saprofita, mediante la fermentación con diferentes cutículas de insectos, tratando de establecer un serotipo genético (Khan *et al.*, 2007).

Se ha visto que con la secuenciación de la región ITS del DNA se puede determinar la variación entre aislamientos de *B. bassiana* (Kouvelis *et al.*, 2008), y mediante el RFLP-PCR de esta región, comprobar la mutación del DNA (Coates *et al.*, 2001). Los cambios en las secuencias ribosomales de los ITS es a nivel nucleotídico, lo cual nos puede permitir una comparación a nivel inter e intra específico en hongos (Neuvéglise *et al.*, 1994; Buscott *et al.*, 1996). La región ribosomal ITS comprende los espacios ITS 1 e ITS 2, los cuales flanquean la región que codifica para la subunidad 5.8S (White *et al.*, 1990) (Fig. 2). Para este tipo de estudio, existen cebadores universales previamente reportados, que amplifican

la región completa inter-transcrita ribosomal del DNA en ascomicetos y basidiomicetos (Gardes y Bruns, 1993).

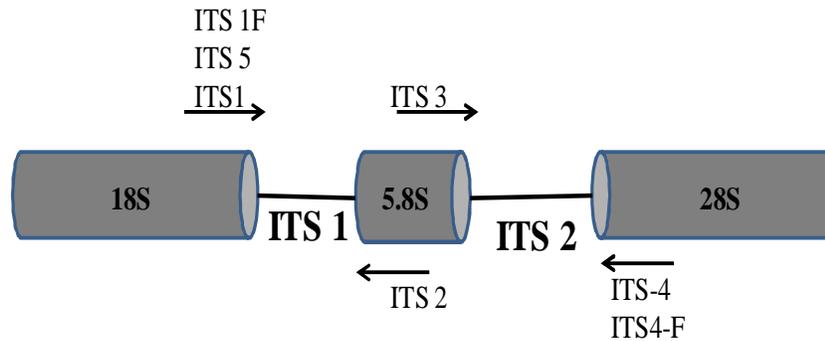


Fig. 2. Región ITS del DNA

2.2.3 Ciclo infeccioso

Las fases más susceptibles a la infección por hongos, son las fases inmaduras (larvarias o ninfas); sin embargo, se ha reportado que en algunas especies, son las fases maduras o adultos los de mayor susceptibilidad. Los estados de huevo y pupa no son infectados comúnmente por los hongos (Tanada y Kaya, 1993). En todos los casos la unidad infectiva es la espora (reproducción sexual) o el conidio (reproducción asexual). Los factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia en el proceso infeccioso. Las esporas tienen requerimientos específicos de agua y temperatura, así como de otros factores ambientales que en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno, que en su mayoría son glicoproteínas (Tanada y Kaya, 1993). El ciclo infeccioso general de los hongos entomopatógenos comprende la infección de los insectos con esporas, la adhesión y germinación de la espora, la producción de toxinas y esporulación (Fig. 3).



Fig. 3. Ciclo de vida de *B. bassiana*

Las interacciones hidrofóbicas, la formación de apresorio y la producción de mucosa por el hongo están involucradas en la adhesión a la cutícula. Las proteasas extracelulares producidas por *B. bassiana* solubiliza proteínas, la cual asiste en la penetración y posterior crecimiento dentro del insecto (Bidochka *et al.*, 1997).

2.2.3.1 Adhesión

Para llevar a cabo la invasión del hospedero es necesario la adherencia de la pared celular de la espora fúngica con la cutícula, donde además de la activación de los receptores patogénicos, participan la presencia de iones divalentes como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} que reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión (Barnes y Moore, 1997; Kulshrestha y Pathak, 1997; Wessels, 1999).

Las conidios de *B. bassiana* pueden sobrevivir y ser infectivos en distintos tipos de ambientes, gracias a que pueden modificar su metabolismo, bajarlo en condiciones nutrimentales bajas, o activarse y salir de su estado de dormancia, iniciando la formación del tubo germinativo (Smith y Grula, 1981).

2.2.3.2 Germinación

Para el proceso de germinación, los factores de humedad, temperatura y condiciones nutricionales están íntimamente relacionadas, es así como la germinación de la espora se ve favorecida por una humedad alta (70%) (Mendoza, 1992). Se ha reportado que los conidios son invasivos y patógenos a altas temperaturas (Ramoska, 1984). Aunque se conoce que la temperatura entre 25-32°C y humedad de 97-100%, la germinación es rápida y a 35°C ocurre un crecimiento vegetativo mayor en *B. bassiana*, lo cual es importante en las infecciones fúngicas. No sólo estos factores influyen en la micosis de insectos, sino también se incluyen factores como la edad y sexo del insecto, los cuales tienen un papel importante entre la interacción patógeno-hospedero (James *et al.*, 1998). También se ha reportado una diferencia intra-específica en la velocidad de la germinación, dependiente del tipo de aislamiento de *B. bassiana*, sin importar la temperatura y humedad (Hywel-Jones y Gillespie, 1990).

2.2.3.3 Formación de apresorio

El conidio o espora, produce un tubo germinativo y un apresorio, que rompe las áreas membranosas esclerosadas, el apresorio se fija a la cutícula y el tubo germinativo ejerce cierta presión dando inicio a la penetración hacia el interior del insecto (Monzon, 2001). La penetración de la cutícula ocurre 24 h después de la inoculación (Wasti y Hartmann, 1975). A pesar que la penetración a través de la cutícula es la más común, los hongos pueden utilizar otras vías de entradas como la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de los insectos (Charnley, 1984).

2.2.3.4 Enzimas hidrolíticas

La infección es el resultado de la combinación de un proceso químico y uno físico. En el primero, ocurre la degradación de la cutícula mediante la acción enzimática, principalmente por proteasas, aminopeptidasas, lipasas y quitinasas (esterasas y N-acetilglucosamidasa) (Suresh y Chandrasekaran, 1999). En su conjunto, estas enzimas actúan en

la degradación de la cutícula, aunque se sabe que el nivel de producción de las enzimas varía entre aislamientos. Se reportó el efecto combinado cuando se observó que algunas enzimas proteolíticas atacan la molécula de quitina, seguido por la acción de la quitinasa (Smith *et al.*, 1985). Así mismo, en otro estudio se pudo comprobar que la liberación de quitinasa es dependiente del sustrato, debido a que la producción de quitinasa varió durante el proceso infectivo, donde fueron bajos los niveles de enzima en la parte inicial de la infección y penetración sobre la cutícula del insecto, en comparación a los altos niveles reportados después de la acción proteolítica de las mismas (St Leger *et al.*, 1996).

2.2.3.5 Toxinas

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en gemación; *B. bassiana* produce blastosporas como parte del crecimiento vegetativo. De igual manera se producen toxinas y enzimas; sin embargo, algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, por lo que matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por destrucción física (Jeffs *et al.*, 1997). El crecimiento del hongo en el hemocele, la colonización de los diferentes órganos se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpigi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráquea. Cuando las toxinas causan la muerte del insecto, ésta es debida a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Ferron, 1978).

A este respecto, existen diversas especies de hongos que poseen la habilidad de producir gran variedad de moléculas orgánicas de bajo peso molecular, muchos de los cuales han demostrado poseer actividad biológica sobre otros organismos, tal como actividad insecticida e inmunosupresora, por lo que dichos metabolitos son considerados bioactivos. Entre estas se pueden mencionar a la oosporeina, tenellina, bassianina, ácido oxálico, ácido fusárico, ácido dipicolínico, paecolomicinas, leucinostinas, efraeptinas, beauvericinas, beauverólidos, destruxinas, eniantinas, ciclosporinas, pyridovericina y pyridomacrolidina (Gillespie y Claydon, 1989; Khachatourians, 1996; Takahashi *et al.*, 1998). La actividad biológica y propiedades bioquímicas sugieren que estos componentes se producen durante la micosis de *B. bassiana* (Mazet *et al.*, 1994). Más recientemente se

ha estimado que existen más de 300,000 micotoxinas potenciales para el control de insectos plaga (Strasser *et al.*, 2011).

La beauvericina (BEA) es un hexadepsipéptido cíclico análogo de las eniantinas y es producido como metabolito secundario por *B. bassiana* y por otros organismos (Gupta *et al.*, 1991; Logrieco *et al.*, 1998). Fue una de las primeras toxinas reportadas en extractos fúngicos (Hamill *et al.*, 1969). La BEA es una de las principales micotoxinas encontradas en extractos miceliales de *B. bassiana* (Gupta *et al.*, 1995) y es producida *in vivo* dentro del hemocele una vez que las conidios penetran la cutícula del insecto (Shafiq *et al.*, 2012). Se ha reportado que la BEA tiene actividad insecticida, antimicrobial, antiviral y citotóxica; estas características lo hacen un agente potencial como pesticida y antibiótico (Wang y Xu, 2012). En cultivos sumergidos, la capacidad de *B. bassiana* para producir BEA varía según el aislamiento, posiblemente debido a la producción de otros productos secundarios (Peczynska-Czoch *et al.*, 1991). Mediante el fraccionamiento por cromatografía se ha logrado identificar BEA a partir de extractos crudos de hongos entomopatógenos (Nilanonta *et al.*, 2000).

El uso de técnicas cromatográficas [de intercambio de iones, de capa fina (TLC), líquida de gases (HPLC)], y espectroscopía de masas (EM)], ha ayudado a la detección de BEA en alimentos, cultivos de microorganismos e insectos (Logrieco *et al.*, 1998; Mazet *et al.*, 1994; Monti *et al.*, 2000; Plattner y Nelson, 1994; Ritieni *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2009; Thakur y Smith, 1997). Además de la presencia de BEA, es importante comprobar su actividad biológica. Tanto la actividad insecticida que tiene la BEA, así como la actividad antibacteriana han sido empleadas para este fin (Xu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). La técnica de difusión en agar ha sido útil para comparar la sensibilidad de bacterias a la micotoxina BEA (Castlebury *et al.*, 1999), lo cual indirectamente podría medir y asumir la presencia de la micotoxina.

2.2.3.6 Esporulación

Durante la fase de esporulación las hifas comienzan a emerger por los espiráculos, ano y boca a través de las áreas más débiles (regiones intersegmentales), si la disponibilidad de agua es adecuada, los hongos empiezan a producir estructuras infectivas. Si las

condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá cuando lleguen las condiciones favorables. La fluctuación de humedad y temperatura pueden intervenir en el proceso de la esporulación (Fargues y Luz, 1998). Se ha observado que existen diferencias entre aislamientos de *B. bassiana* en cuanto a rango de hospederos, crecimiento y esporulación (Feng *et al.*, 1990). Se han propuesto diferentes patrones de esporulación *in vivo* entre diferentes aislamientos de *B. bassiana*. Un estudio con la termita *Coptotermes formosanus* (Shiraki), reveló una diferencia en el tiempo de la esporulación, formando un grupo de alta esporulación a los 11 días, y uno de rápida esporulación al 2do y 3er día post-infección (Sun *et al.*, 2002).

2.2.4 Evasión del sistema inmune del insecto

Los procesos conocidos durante la infección de los hongos entomopatógenos, como el daño mecánico, la adquisición de nutrientes y los metabolitos secundarios producidos durante el crecimiento fúngico una vez que el hongo penetra a través de la cutícula, pueden estar involucrados en proporcionar especificidad al huésped o conducir la muerte del insecto (Bidochka *et al.*, 1997). La actividad mecánica durante la penetración de las hifas, seguido del crecimiento filamentosos y de la formación de blastosporas dentro del fluido, causa daño en el integumento, el cual es considerado un factor en la patogénesis ya que permite la entrada de otros organismos invasores como bacterias, causando una septicemia (Vey y Fargues, 1977). Así mismo, los metabolitos producidos por hongos entomopatógenos post- infección, como enzimas hidrolíticas, pueden inmuno-suprimir al insecto, disminuyendo la capacidad fagocitaria de los hemocitos (Pendland *et al.*, 1993). En un estudio, con *Spodoptera exigua* (Hübner) expuesta a *B. bassiana*, se observó que la producción de metabolitos secundarios retardaban la formación de nódulos por parte de hemocitos (Pendland *et al.*, 1995). También se ha visto que *B. bassiana* inhibe la biosíntesis de péptidos exocelulares por parte de hemocitos (Mazet y Boucias, 1996). Así mismo, se observó *in vitro* que los plasmocitos disminuyeron la capacidad de fagocitar blastosporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, después de ser sometidos a dosis sub-letales

de metabolitos secundarios (péptidos cíclicos). Lo cual hizo asumir que la producción de metabolitos por parte de entomopatógenos altera las reacciones celulares de reconocimiento y defensa en los hospederos (Vilcinskas *et al.*, 1997a). En un estudio similar con plasmocitos también se observaron cambios morfológicos y alteraciones en citoesqueleto de los hemocitos, causados principalmente por destruxinas producidas por *M. anisopliae* (Vilcinskas *et al.*, 1997b). La invasión de células fúngicas puede interferir con el sistema inmune del insecto, a través de la liberación de proteasas que afectan la reacción de respuesta celular (Griesch y Vilcinskas, 1998). Esto ha sido comprobado al observar una reducción de hemocitos por la presencia de blastosporas de *M. anisopliae* (Ouedraogo *et al.*, 2003).

De igual forma, los hongos entomopatógenos pueden evadir la respuesta inmune humoral de los insectos. Algunas toxinas fúngicas están ligadas directa e indirectamente con la actividad de PO. Por ejemplo, se ha encontrado la producción de ácidos dipicolínicos (DPA) en algunos hongos como *Cordyceps militaris*, que inhiben la producción de PPO (Watanabe *et al.*, 2002). Así mismo, se observó que la mezcla de las destruxinas A y B producidas por *M. anisopliae* reducen la producción de laminarina, la cual es una proteína que a su vez activa las células asociadas a la producción de PPO y por ende de PO (Huxham *et al.*, 1989).

Se han observado discrepancias en la actividad de PO en infecciones con *B. bassiana*. A este respecto, se ha reportado un incremento en la actividad de PO en *Melanoplus sanguinipes* (Fabricius) y *S. exigua* infectadas con *B. bassiana* (Gillespie y Khachatourians, 1992; Hung y Boucias, 1996). Durante el crecimiento vegetativo de *B. bassiana* se producen metabolitos que afectan la respuesta inmune y esos componentes pueden causar la reducción de hemocitos y el incremento en suero de PO (Boucias *et al.*, 1995). No obstante, Aoki y Yanase (1970) reportaron una reducción en la actividad de PO en larvas de *Bombyx mori* L. después de la infección con *B. bassiana*. Así mismo, en la hemolinfa de *Galleria mellonella* L. se ha reportado una reducción en la actividad de PO entre los insectos infectados con *B. bassiana* (Slepneva *et al.*, 2003). Las proteasas producidas por los hongos durante la infección presentan un amplio sitio de acción que va desde la cutícula hasta el hemocele de los insectos (Fig. 4), justificando el interés por estas enzimas en la

evaluación como agente potencial de control de insectos plagas comercialmente (Harrison y Bonning, 2010).

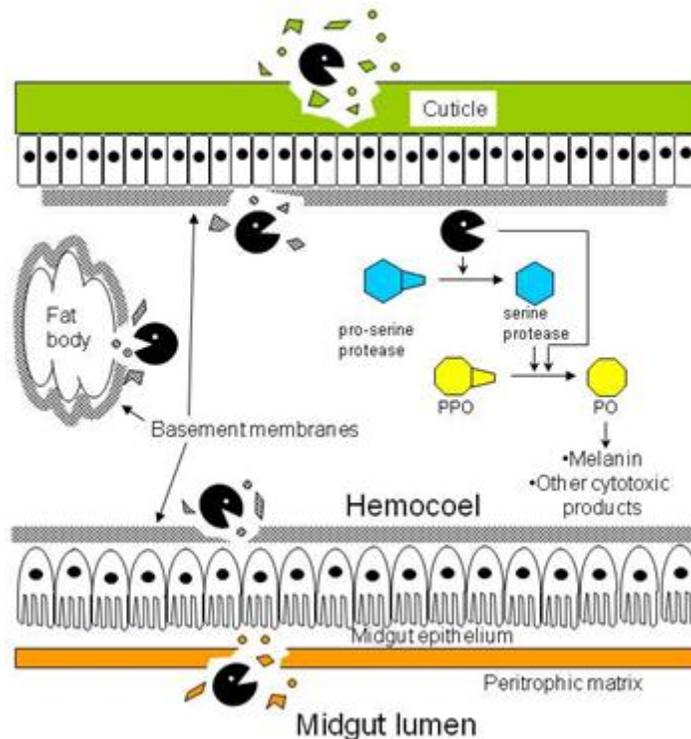


Fig. 4. Sitios de acción de las proteasas (Tomado de Harrison y Bonning, 2010).

Debido a todo esto, es importante evaluar el mecanismo de infección y el modo de acción de los hongos entomopatógenos, así como la producción de metabolitos, que pudieran en un momento dado mejorar y potencializar el uso de estos biopesticidas comercialmente.

2.2.5 Fermentación de *B. bassiana*

Los hongos entomopatógenos son una alternativa al uso de insecticidas químicos y ofrecen un gran número de beneficios, tales como crecer en una variedad de sustratos, alta virulencia, amplio espectro de hospederos, penetración de la cutícula, seguros al hombre y

animales y al ambiente (McCoy, 1990). Es importante señalar, que el mecanismo de infección y el modo de acción de los hongos entomopatógenos, deben de considerarse al momento de producir un bioinsecticida, ya que para que tenga éxito comercial (capaz de competir con un producto químico en efectividad y precio) (Appel, 2003; Appel y Benson, 1995; García-Gutiérrez *et al.*, 2007). Para propósitos de producción de agentes de biocontrol para aplicación en la agricultura, en el proceso de producción a nivel de laboratorio, se busca proveer a los microorganismos de un balance óptimo tanto de macro como micro-elementos, para obtener un desarrollo con el máximo potencial de biocontrol y eficiencia económica (Bartlett y Jaronski, 1988; Jackson *et al.*, 2003). Para el caso de los hongos, es muy importante evaluar el requerimiento y la combinación entre los nutrientes ya reportados con la proporción del extracto de levadura y/o sales de nitrógeno (Wraight *et al.*, 2001). En el escalamiento de la producción se puede proceder por fermentación en sustrato líquido y sólido. Para la primera opción, la combinación de nutrientes y condiciones óptimas de fermentación (agitación/oxígeno disuelto, pH, temperatura, etc.), se pueden determinar mediante cinéticas de crecimiento (Jackson y Bothast, 1990), combinadas con ensayos de actividad insecticida, ya que un buen crecimiento no garantiza la infectividad del hongo (Stamets, 2003). Para el caso de fermentación sólida, se pueden evaluar granos de cereales como centeno, cebada y trigo, y comparar su efectividad y costo frente al obtenido con arroz, soporte que se emplea con mayor frecuencia para este propósito (Mendoza, 1992; Wraight *et al.*, 2001). El grano quebrado, humedecido y estéril, se inocula con el agente de biocontrol y se mantiene en aireación y asepsia, y al igual que con la fermentación líquida, se obtiene la curva de crecimiento (Gomez-Flores *et al.*, 1995), adecuado para bacterias y hongos (Wraight *et al.*, 2001).

Se ha visto que para cada hongo y cepa, los valores óptimos son diferentes. La habilidad de *B. bassiana* de crecer y producir conidios en medios artificiales es una de las ventajas de este hongo (Bidochka *et al.*, 2000). Se ha observado que el tipo de aislamiento, el tipo de producción, así como la incorporación de aditivos y condiciones óptimas de cultivo pueden mejorar la esporulación y viabilidad de los conidios de *B. bassiana* (Kassa *et al.*, 2008). Este hongo entomopatógeno tiene una gran versatilidad en nutrientes, lo que lo hace un hongo que puede sobrevivir e infectar en diferentes tipos de ambientes. La germinación ocurre cuando hay una fuente de carbono como glucosa, N-acetilglucosamina,

quitina, almidón, lanolina, aceite crudo y algunos ácidos grasos de cadena larga. Las fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas son útiles en el crecimiento (Smith y Grula, 1981). La adición de fosfato y extracto de levadura mejora en la producción de quitinas (Suresh y Chandrasekaran, 1999). Se ha reportado que una fuente de carbón y nitrógeno en el crecimiento semilíquido de *B. bassiana* mejora la producción de proteasas (Bidochka y Khachatourians, 1987).

Inicialmente, *B. bassiana* coloniza al insecto hospedero durante la fase vegetativa fr crecimiento, por medio de propágulos llamados blastosporas y células hifales tipo levaduriforme, las cuales son comunes en cultivos artificiales líquidos, pero no en medios sólidos. Se ha reportado la producción de tres tipos de células *in vitro* usadas como propágulos infecciosos de *B. bassiana*: conidios aéreos (cultivos sólidos), conidios sumergidos y blastosporas (cultivos líquidos) las cuales presentan diferentes propiedades morfológicas, bioquímicas y de virulencia (Cho *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado la presencia de cuerpos hifales (tipo levaduriforme) en medios sólidos (agar MacConkey) que son efectivos como inóculo de *B. bassiana* contra artrópodos (Alves *et al.*, 2002). En base a la producción de conidios, el uso de medios sólidos artificiales agar dextrosa papa (PDA) y arroz cocido), es útil para la selección de aislamientos de *B. bassiana* con actividad insecticida (Almeida *et al.*, 1997). Por lo tanto, la producción óptima de conidios no solamente depende del tipo de aislamiento, sino del substrato sólido. Se ha reconocido que el medio de cultivo comercial PDA ofrece una óptima producción de conidios de *B. bassiana* (Kamp y Bidochka, 2002).

Muchos entomopatógenos producen toxinas en cultivos líquidos. De igual forma, *B. bassiana* produce toxinas que son péptidos cíclicos tales como beauvericina, beauverólidos y basianólidos (Gillespie y Claydon, 1989). Sin embargo, se ha reportado la producción de otras proteínas por *B. bassiana*, especialmente proteínas tipo proteasas, en cultivos líquidos que contenían glucosa, almidón, licor de maíz, CaCO₃ y NaCl (Ku era y Sam-í áková, 1968). La síntesis y producción de proteasas extracelulares por parte de *B. bassiana* en cultivos líquidos está relacionada con las fuentes de nitrógeno y carbono (Bidochka y Khachatourians, 1988). Así mismo, se ha visto que las fuentes de carbón y nitrógeno se relacionan a las propiedades de adhesión de las blastosporas (Lane *et al.*, 1991).

La producción de hongos filamentosos por fermentación en cultivos líquidos ha permitido la comercialización de agentes de biocontrol microbianos (Jackson *et al.*, 1996). El crecimiento de hongos filamentosos en medio líquido tiene como desventaja el que tienden a formar ómicelasö, donde las hifas que quedan dentro pueden perder su viabilidad por falta de alimento y/o oxígeno. Es por esto la importancia de una aeración y nutrición adecuada durante la producción del mismo.

2.2.6 Adyuvantes

Existen varios tipos de adyuvantes que mejoran la germinación de las esporas, como es el caso del aceite de maíz sin refinar, que mejora la actividad, y reduce los requerimientos de humedad necesarios para su germinación (Fernández y Juncosa, 2002). Además, es necesario tomar en cuenta las propias características del microorganismo y su relación con los componentes de la formulación (vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos) y el ambiente de almacenamiento (Appel *et al.*, 2004). Se ha observado la interacción entre insecticidas sintéticos y el hongo *M. anisopliae* en larvas de *Anomala cuprea* Hope, donde el efecto sinergista se atribuye al debilitamiento del sistema inmune de las larvas debido al estrés causado por el insecticida, lo cual facilita la infección del hongo (Hiromori y Nishigaki, 2001). Los insecticidas químicos de origen inorgánico pueden proveer un tipo de control adicional, ya que son considerados ligeramente tóxicos, y son menos costosos que los orgánicos (Zurek *et al.*, 2003). Dentro de los químicos inorgánicos, se encuentran el ácido bórico, el sílice y la tierra de diatomeas, que tienen la característica de ser desecadores que inducen la degradación de los lípidos presentes en la cutícula y exoesqueleto del insecto, lo cual permite la deshidratación del mismo (Waseem *et al.*, 2004; -2005). El ácido bórico se ha empleado con éxito para el control de cucarachas y otros insectos plaga de importancia agrícola desde principios del siglo pasado; sin embargo, su uso se ha limitado en países como EUA, debido a las cantidades máximas permitidas en casas habitación y en cultivos para consumo humano, a pesar que se considera un producto ligeramente tóxico (Zurek *et al.*, 2003). El efecto del ácido bórico sobre los insectos es principalmente de forma mecánica, ya que funciona como abrasivo. Se ha reportado que el

consumo del ácido bórico por parte de los insectos, puede ejercer efecto directo sobre el estomago e incluso afectar al sistema nervioso (EPA, 1993). A pH 5.0, este ácido, al igual que el ácido sórbico a pH 3.0, se comportan como potenciadores, al menos para el caso de los baculovirus. Las observaciones realizadas indican que únicamente actúan como factores de estrés fisiológico en los insectos, lo que facilita su acción en combinación con agentes entomopatógenos (Caballero *et al.*, 2001). Específicamente, la efectividad de este compuesto inorgánico sobre *B. germanica* depende de la concentración del ingrediente activo, el atrayente (hormonal o alimenticio), la combinación de compuestos sinergistas y la humedad (Wraight *et al.*, 2001). Es por esto que su empleo en formulaciones debe ser la óptima, para potenciar la eficiencia y lograr la meta propuesta. En estos dos últimos puntos, se ha reportado que la combinación con sílice y un ambiente de humedad alta, influyen directamente sobre el control efectivo sobre esta especie de cucaracha (Appel *et al.*, 2004). Otro ejemplo de químico inorgánico es la tierra de diatomeas. Este es un material inerte, que contiene minerales tales como manganeso, magnesio, hierro, titanio, calcio y silicatos entre otros. Su aplicación en agricultura ha dado resultados en el control de plagas tales como escarabajos, ácaros y polillas, ya sea aplicándolo sólo en forma de polvo, o en combinación con agentes químicos o biológicos. Por ejemplo, se ha reportado que su uso mejoró la eficacia de *B. bassiana*, en el control de la polilla *Tribolium castaneum* (Herbst), escarabajo plaga de los granos almacenados (Waseem *et al.*, 2004).

3. HIPOTÉISIS

Existen diferencias de la actividad insecticida entre cepas y aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre *Periplaneta americana*, derivadas de factores intrínsecos (variabilidad genética y producción de toxinas bajo diferentes condiciones de crecimiento) o extrínsecos (fase larvaria y/o sexo y respuesta inmune del insecto).

4. OBJETIVO GENERAL

Aislar y seleccionar aislamientos de *Beauveria bassiana* comparando su actividad insecticida entre estos y contra cepas comerciales para el biocontrol de *Periplaneta americana*, y determinar si las diferencias en dicha actividad son derivadas de factores intrínsecos (variabilidad genética y producción de toxinas bajo diferentes condiciones de crecimiento) o extrínsecos (fase larvaria y/o sexo y respuesta inmune innata del insecto).

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 4.1.1 Obtener aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* a partir de la cucaracha urbana *Periplaneta americana*.
- 4.1.2 Seleccionar aislamientos de *B. bassiana* en base a su efectividad (porcentaje de mortalidad) sobre la cucaracha urbana.
- 4.1.3 Evaluar la producción de metabolitos bioactivos (por ej., Beauvericina) en los aislamientos seleccionados de *B. bassiana*.
- 4.1.4 Potenciar la efectividad de los aislamientos de *B. bassiana* sobre *P. americana* con el uso de adyuvantes inorgánicos
- 4.1.5 Determinar la respuesta inmune innata mediante la medición de la actividad fenoloxidasa en las fases ninfales y adultos de *P. americana*.
- 4.1.6 Medir el efecto inmunológico del entomopatógeno en *P. americana* después de la infección.
- 4.1.7 Determinar la variabilidad genética entre los aislamientos contra cepas comerciales de *B. bassiana*, mediante el análisis RAPD.
- 4.1.8 Secuenciar la región ITS ribosomal del DNA que mostraron diferencias en los patrones polimórficos (RAPD) entre los distintos aislamientos contra patrones reportados de cepas de *B. bassiana*.

5. METODOLOGÍA

En el presente estudio se evaluó la efectividad de aislados de *Beauveria bassiana* contra *Periplaneta americana* (L.). El diseño experimental que se planteó se muestra en el Anexo 1.

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1 Establecimiento de la colonia de insectos

Las colonias de *Periplaneta americana* L. se establecieron a partir de cucarachas recolectadas en su hábitat natural. Las colectas se hicieron alrededor del campus de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en las cuales se determinó la especie de *P. americana* mediante la descripción taxonómica según Clunie (2004). Cada 6 meses se llevaron a cabo las colectas para fortalecer y evitar homocigamia dentro de la colonia. Antes de introducir a la colonia las cucarachas recolectadas, fueron mantenidas en cuarentena, durante 40 días para descartar cualquier individuo enfermo o parasitado. La cría se estableció en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, en la cual los insectos se colocaron dentro de una caja de plástico hermética (48x90) con papel absorbente, bajo condiciones controladas de 25 ± 4 °C, una humedad relativa del 65-75%, y un fotoperíodo de 12 h luz:oscuridad (Fig. 5). La dieta de los insectos, tanto de ninfas y adultos, consistió en croquetas para mascotas (Purina, Nestlé México, SA de CV, México, DF) y agua. Para realizar los ensayos de actividad insecticida y fenoloxidasa, se utilizaron cucarachas de la colonia previamente establecida.

5.1.2 Aislamiento y cultivo de *Beauveria bassiana* (Báls.) Vuillemin

De los tratamientos de *B. bassiana* utilizados en el presente estudio, dos cepas fueron proporcionadas por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato,

CESAVEG (Bb-Chc-LBIH-28 y GHA), a las cuales se les nombra en el presente estudio como C1 y C2, respectivamente, y fueron usadas como cepas de referencia.



Fig. 5. Colonia establecida de *P. americana*.

Estas cepas se producen y formulan como polvo humectable, para su uso dentro de programas fitosanitarios para el control de plagas agrícolas (<http://www.cesaveg.org.mx/html/pboletines.htm>). Para eliminar el efecto de la formulación, las cepas C1 y C2 se cultivaron en agar dextrosa papa (PDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e incubaron a 25 ± 4 °C. Posteriormente, a partir de conidios individuales se hicieron crecer en placas con PDA para obtener cultivos monospóricos, según lo descrito por Choi *et al.* (1999).

Además de las cepas de *B. bassiana* proporcionadas por el CESAVEG, se probaron cuatro aislamientos más (C3, C4, C5 y C6), provenientes de insectos de *P. americana* colectados en su ambiente natural. Todos se identificaron como *B. bassiana* en base a las características morfológicas de acuerdo, con Humber (2007) (Fig. 6). Los aislamientos de *B. bassiana* provenientes de insectos colectados, se realizaron a partir de insectos adultos de *P. americana* que presentaban síndromes visibles de enfermedad como aletargamiento y comportamiento diurno de actividad (las cucarachas tiene hábitos nocturnos), o bien, que hayan muerto en el período de cuarentena. Los muestreos se realizaron externa e internamente del cuerpo del insecto. Antes de tomar las muestras internas mediante punción abdominal con un asa bacteriológica, los insectos se lavaron y desinfectaron externamente con alcohol al 70% y solución de buffer de fosfato estéril (PBS; 1.48 g de

Na_2HPO_4 , 0.43 g de NaH_2PO_4 y 7.20 g de NaCl) más un surfactante de polisorbato 20 al 0.1% v/v (Tween 20®; Promega Co. US (PBSt)).



Fig. 6. Aislamientos C3, C4, C5 y C6 de *B. bassiana* provenientes de insectos colectados en su ambiente natural. Las flechas indican la presencia del micelio aéreo.

Las muestras se inocularon en PDA y se incubaron a 28°C , hasta tener un crecimiento y producción de conidios que permitieran su identificación. A partir de las muestras de las que se logró aislar *B. bassiana*, se generaron cultivos monospóricos para la evaluación de las mismas. Se seleccionaron aquéllos aislamientos con mayor potencial como bioinsecticida de acuerdo a su actividad insecticida, medida como porcentaje de mortalidad de cucaracha urbana. Para fines de conservación, los aislamientos se almacenaron como cultivos monospóricos a $-20^\circ \pm 4^\circ\text{C}$. Para esto se inocularon en PDA a 28°C , una vez que el micelio cubrió el 85-90% de la superficie del agar, se seccionó en cuadros de 2 mm y grupos de 4-5 cuadritos de 2 mm^2 se transfirieron a viales estériles con glicerol al 20%. Para cada prueba y repetición realizada se utilizó un nuevo vial, esto para evitar variabilidad genética entre cada prueba que pudiera resultar de la resiembra del hongo.

5.2 EXPERIMENTOS DE *B. bassiana*

Los experimentos evaluados en el presente estudio fueron los resultados de la producción de las cepas y aislamientos de *B. bassiana*, considerados como tratamientos:

- a) Conidios aéreos (CA), obtenidos por producción en fermentación sólida
- b) Conidios sumergidos más blastosporas (CS+B), obtenidos por producción en fermentación líquida y
- c) Sobrenadante filtrado (SF), obtenidos por producción en fermentación líquida, estos dos últimos del producto de la fermentación por 13 días (producto final del proceso). Los productos de estos experimentos (CA, CS+B o SF) se transfirieron a viales de 1 mL estéril y fueron congelados a -20 °C, hasta su uso.

5.2.1 Fermentación sólida

Para la fermentación en sustrato sólido se emplearon cultivos monóporicos de cada uno de los tratamientos, los cuales se inocularon en PDA e incubaron a 25 ± 4 °C, hasta alcanzar el 85-90% del crecimiento micelial (Fig. 7). Posteriormente se llevó a cabo el cosechado de conidios aéreos.

Para obtener los conidios del experimento CA, se agregó 1-mL de solución salina al 0.85% p/v (NaCl_2) más un surfactante de polisorbato 20 al 0.1% v/v (Tween 20®; Promega Co. US), sobre el micelio de cada uno de los tratamientos. Posteriormente, se colectó el contenido en 10 mL de la misma solución, después de un raspado superficial con un asa Driblasky. El número y la concentración de conidios/mL se calcularon mediante el conteo en un hematocitómetro (cámara de Neubauer; Hausser Scientific, Horsham, PA.).

5.2.2 Fermentación líquida

Se evaluó el método de producción de conidios sumergidos y blastosporas mediante fermentación en cultivo líquido de los cuatro tratamientos seleccionados de *B. bassiana* (Fig. 7). El medio de cultivo consistió en caldo Sabouraud (SB) y extracto de levadura al

1.0 % p/v como fuente de nitrógeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a un pH = 6.8, seleccionados en base de mantener la efectividad del entomopatógeno (Churchill, 1982); ésta fue la primera evaluación de los tratamientos. Adicionalmente, se agregó ácido bórico (H_3BO_4 ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como adyuvante a pH= 5, lo que generó una segunda evaluación de los tratamientos.

5.2.2.1 Conidios sumergidos y blastosporas (CS+B)

Este experimento se realizó con el producto final de la fermentación líquida. A pesar de que en este experimento se incluyen conidios y blastosporas, fue en base al número de conidios que se realizó el ajuste de concentración para su evaluación. Se tomaron muestras directamente del producto, se realizó una dilución 1:100 usando como diluyente solución salina (NaCl) al 0.85% + Tween 20® al 0.1 % para contabilizar los conidios en una cámara de Neubauer, ajustado el número de los mismos según la necesidad del ensayo.



Fig. 7. Fermentación en cultivo líquido de los tratamientos seleccionados del hongo *B. bassiana*. El medio de cultivo consistió en caldo Sabouraud.

5.2.2.2 Sobrenadante filtrado (SF)

Los filtrados de cada uno de los tratamientos se obtuvieron después de finalizado el tiempo de fermentación, en el cual el producto final se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min para separar el micelio + blastosporas del sobrenadante. Posteriormente, se llevó a

cabo una filtración a través de tres pasos: en el primero, se realizó una pre-filtración del sobrenadante a través de una gasa estéril de 7.5 X 5 cm (Protec®; Gmbh & Co. KG), lo cual nos permitió separar el exceso de micelio del hongo; en el segundo paso, el pre-filtrado se pasó a través de papel filtro #1 (Whatman Inc., Piscataway, NJ); y como tercer paso, el producto previamente filtrado se sometió a un proceso final de filtración al vacío, usando filtros de acetato-celulosa de 0.22 μm (Corning Gilbert Inc., Glandale AZ) para excluir en su totalidad las conidios y blastosporas, lo cual nos permitió evaluar los metabolitos producidos durante la fermentación.



Fig. 8. Proceso de filtración llevado a cabo en cada uno de los tratamientos después de finalizado el tiempo de fermentación.

5.3 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS Y EXPERIMENTOS DE *B. bassiana*

La evaluación de los tratamientos de *B. bassiana* se enfocó principalmente en la actividad insecticida y viabilidad de conidios, lo cual se consideró como punto de partida para la selección de tratamientos efectivos contra *P. americana* (C1, C2, C4 y C6). Una vez seleccionados, se llevó a cabo el proceso de fermentación líquida anteriormente

descrito, donde para los tratamientos del experimento CS+B se estimaron los mismos parámetros de actividad insecticida y viabilidad que los producidos con el experimento CA. Para el experimento de SF, además de la actividad insecticida se evaluó la susceptibilidad que presentan algunas bacterias a ciertos metabolitos producidos durante la fermentación de *B. bassiana* mediante un ensayo tipo antibiograma, que se realiza para determinar la susceptibilidad o resistencia de una bacteria a un compuesto antibiótico, así como una cromatografía de capa fina, para la detección de los mismos, principalmente la presencia de la micotoxina beauvericina.

5.3.1 Actividad insecticida

La evaluación de la actividad insecticida se realizó por medio de la determinación del porcentaje de mortalidad en tres condiciones del insecto (consideradas como variables): ninfas tardías, hembras y machos de *P. americana*. Cada evaluación se realizó por separado, para determinar la variable del insecto más susceptible. El bioensayo se realizó con los insectos de la colonia previamente establecida. Para facilitar su manipulación, las cucarachas se inmovilizaron al colocarlas previamente y durante 20 min a 4°C para facilitar la aplicación tópica de cada tratamiento. Cada tratamiento de los diferentes experimentos se aplicó directamente sobre la región abdominal del insecto, usando 100 µL de una dosis a concentración de 1×10^6 conidios/mL (Pachamuthu *et al.*, 1999). Los controles consistieron de PBSt (para compararlo con el experimento de CA) o medio de fermentación líquida sin inocular (para compararlo con los experimentos CS+B y SF). Posteriormente, las cucarachas tratadas fueron colocadas en recipientes de plástico de un litro con papel absorbente, alimento y agua durante 7 días, bajo las mismas condiciones de incubación utilizadas para la colonia de insectos. Los productos de cada experimento se evaluaron por triplicado usando 12 cucarachas por repetición. Con los valores registrados de mortalidad se obtuvo el porcentaje de mortalidad del recuento de insectos vivos y muertos después de ser expuestos a cada tratamiento de todos los experimentos.

Asimismo se realizó un análisis microbiológico de los insectos muertos después de la exposición de los insectos a los tratamientos de *B. bassiana* para verificar que la muerte se

debió a la infección del entomopatógeno, ya que no todos los insectos presentaban micosis expuesta. Para esto, se tomaron muestras por punción con un asa bacteriológica de la parte abdominal de los insectos muertos, previamente lavados externamente con etanol al 70% y enjuagados con PBS estéril. Las muestras se inocularon sobre agar nutritivo (AN; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y PDA, y las placas se incubaron a 28 °C durante 5-7 d, para verificar el crecimiento de *B. bassiana*. Los insectos sobrevivientes expuestos a los tratamientos de *B. bassiana* fueron almacenados a -20°C para su posterior estudio de actividad fenoloxidasas (PO).

5.3.2 Pruebas de viabilidad

La viabilidad se determinó en los diferentes tratamientos y experimentos, mediante las técnicas de número más probable por unidades formadoras de colonias (UFC), porcentaje de germinación (% de germinación) y actividad celular por la técnica colorimétrica de reducción del MTT (sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Stentelaire *et al.*, 2001).

5.3.2.1 Técnica de número más probable (Unidades formadoras de colonias)

La cuenta viable de hongos se basa en el fundamento de que al crecer sobre un sustrato sólido, como los medios sugeridos para el crecimiento de hongos como PDA o agar Sabouraud (Sigma-Aldrich), cada conidio vivo o fragmento de micelio germinará y crecerá hasta formar una colonia visible a simple vista (García y Uruburu, 2000) (Fig. 9). Para llevar a cabo esta técnica, se tomó una alícuota de 1 mL de cada tratamiento, partiendo de una concentración de 1×10^6 conidios/mL. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 (1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3 conidios/mL) usando como diluyente PBS. Una vez obtenidas las diluciones, se agregó 1-mL de cada una en placas Petri, además se añadieron 70 μ L de antibiótico (penicilina-estreptomicina 3 μ g/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Posteriormente se agregó PDA, para permitir una dispersión por difusión de los conidios al agitar en forma de 8 el agar antes de solidificar. El conteo de colonias se realizó después de

7 días de incubación a 28°C. Para estimar el número de UFC, se tomaron en cuenta solamente las placas que entraban en un rango de 20 a 300 colonias. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada tratamiento.



Fig. 9. Colonias observadas de la cuenta viable de *B. bassiana* sobre un sustrato sólido (PDA)

5.3.2.2 Porcentaje de germinación

La prueba de germinación es una técnica ampliamente utilizada con hongos entomopatógenos. Para determinar la viabilidad por germinación de los experimentos de CA, se inoculó 100 μ L a una concentración a 1×10^6 conidios/mL de cada tratamiento en 250 mL de medio de germinación (caldo Sabouraud, sacarosa y extracto de levadura, ambos al 0.5 %). Posteriormente, se incubaron en agitación constante a 150 rpm a $25 \pm 4^\circ\text{C}$, durante 16 h. Para obtener el porcentaje de conidios germinados se tomaron alícuotas a partir de las 2 h y hasta completar un ciclo de 12 h de incubación. Se tomaron como viables aquéllos conidios que tenían presencia de tubo germinativo al observar las muestras directamente al microscopio. El porcentaje de germinación se obtuvo del recuento de un total de 100 conidios en cuatro campos (número conidios germinados/número total de conidios examinadas). Todas las pruebas de germinación se hicieron por triplicado en cada experimento.

5.3.2.3 Actividad celular por el método colorimétrico de reducción del MTT

La técnica de viabilidad por actividad usando la reducción de la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Gomez-Flores *et al.* (1995).



Fig. 10. Conidios con presencia de tubo germinativo al observar las muestras directamente al microscopio (40x).

En esta prueba se determinó la viabilidad de los experimentos CA y CS+B. La incubación del experimento con CA se realizó de acuerdo a la metodología descrita para las pruebas de germinación; sin embargo, en el experimento CS+B se tomaron alícuotas a partir de las 72 h de incubación hasta el día 13, tiempo en que finalizó la fermentación líquida. Para llevar a cabo la prueba de viabilidad por reducción de MTT, en ambos experimentos se tomaron alícuotas de 500 μ L de cada tratamiento x experimento y se colocaron en tubos para micro-centrifugación de 1.7 mL (Eppendorf Co., USA), a los cuales se les agregaron 50 μ L de MTT y se dejaron incubar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 4 h. Posteriormente, se agregó buffer de lisis (dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% y dimetil-formamida (DMF) al 50%; pH 4.7) y se dejó incubar por 12 h. Finalmente, se midió la absorbancia de la reacción de reducción por espectrofotometría a 570 nm. Para lograrlo, en una placa para ELISA de 96 pozos (Fig. 11), se agregaron 100 μ L de cada experimento (3 pozos/experimento) y se realizó la lectura a una absorbancia de 570 nm (SpectraLab Scientific Inc. Perkin-Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 20).

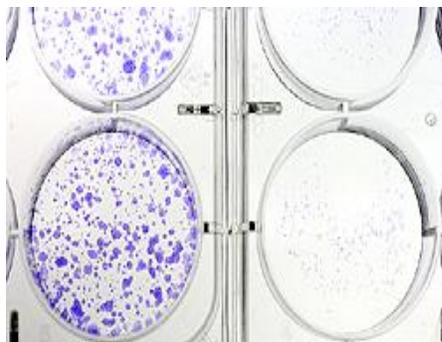


Fig. 11. Técnica de actividad celular usando el cambio de color por la reducción de la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-.2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT).

5.4 EVALUACIÓN DE METABOLITOS EN PRODUCTOS FERMENTADOS

Como se mencionó antes, parte de la patología de los hongos entomopatógenos a insectos está mediada por la producción de toxinas. Esta parte del trabajo se enfocó en la evaluación de los productos fermentados y la detección de metabolitos, entre ellos beauvericina (BEA), y su relación con el posible incremento de la actividad insecticida de *B. bassiana* después de la fermentación.

La evaluación de metabolitos se realizó en el sobrenadante filtrados después de la fermentación en cultivo líquido de los cuatro tratamientos seleccionados del hongo *B. bassiana*. Se tomaron muestras a los días 7, 9 y 11 de fermentación. Los procesos de fermentación y filtración de los tratamientos fue exactamente al descrito anteriormente, para obtener la mayor concentración de metabolitos, principalmente BEA (Buchawaldt y Jensen 1991; Jegorov et al. 1998; Kershaw et al. 1999). Para fines comparativos se utilizó un estándar de BEA comercial ($C_{45}H_{57}N_3O_9$, masa molecular 784 y 97% de pureza; Sigma-Aldrich) como control positivo, tanto en el antibiograma, como en la cromatografía de capa fina.

5.4.1 Liofilización de los tratamientos/experimentos

Una vez obtenido el producto filtrado, se llevo a cabo la liofilización de los mismos para concentrar los metabolitos. Para acelerar el proceso de congelación de las muestras se utilizaron ciclos de congelación-sublimación para eliminar el agua libre contenida en los filtrados. Para esto, se repartieron los filtrados (20 mL) en frascos de vidrio de 30 mL. Posteriormente, en un recipiente de acero inoxidable se congelaron las muestras usando una mezcla de etanol al 70% (v/v) y hielo CO₂. Posteriormente, se colocaron en un liofilizador (Labconco Corp, Kanas, MI) bajo condiciones de 0.200 mBarr de vacío y la colección a -49°C. Una vez obtenidos, los productos liofilizados se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.4.2 Susceptibilidad de microorganismos a los metabolitos

Se ha reportado que *B. bassiana* produce metabolitos con efecto antimicrobiano producidos durante la fermentación (Strasser *et al.*, 2000), por lo que en el presente trabajo, se determinó la actividad antibacteriana de los liofilizados contra cinco cepas bacterianas mediante el método de difusión en pozo en agar (Torres *et al.*, 2006). Los microorganismos utilizados para los ensayos fueron: dos Gram (+): *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes*, y tres Gram (-): *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Shigella* sp. Todos los cultivos bacterianos fueron donados por el Depto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, los cuales provenían ya activados en caldo infusión cerebro corazón (ICC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); y se conservaron a 4°C en ICC en tubos con tapón de rosca, con resiembras periódicas cada 3 meses. El inóculo de las cepas bacterianas utilizado en los ensayos fue ajustado a 1.5×10^8 células/mL.

5.4.2.1 Método de difusión en agar

En este estudio se evaluaron los sobrenadantes filtrados y liofilizados mencionados anteriormente. Los cuales se re-suspendieron en PBS estéril a un volumen de 1-mL. La técnica de difusión en pozo se realizó de la siguiente manera: 300 µL de las diferentes cepas activadas se sembraron sobre la superficie del agar por extensión con un asa de

Driglalsky. Para *B. subtilis* se utilizó agar nutritivo y para *L. monocytogenes* agar soya triptíca (Bioxon, Becton, Dickinson and Co., NJ); y en el caso de *E. coli* y *S.e. typhi* se utilizó agar Mueller-Hinton (Bioxon Becton Dickinson and Co.). Después de 5 min de inoculado, se hicieron pozos sobre el agar, marcando un círculo con la parte posterior de una pipeta Pasteur (5mm diámetro) y retirando la porción interior del círculo para formar el pozo, y a cada pozo se añadieron 100 µL de cada tratamiento y experimento liofilizado a probar. El estándar de BEA fue re-suspendido a una concentración de 500 µg/mL, en dos vehículos diferentes: PBS y en una solución de metanol 55.56% y 44.4 % de agua. Como controles negativos se añadieron los vehículos empleados en pozos separados al mismo volumen de los liofilizados. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h para *B. subtilis*, *E. coli*, *S. e. Typhi* y *Shigella* sp. y a las 48 h para *L. monocytogenes*. Después del tiempo de incubación se examinó cada placa. La susceptibilidad de las bacterias se determinó por la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

5.4.3 Detección de Beauvericina (BEA) por cromatografía en capa fina

La detección de metabolitos secundarios en hongos por medio de la cromatografía en capa fina (*thin layer chromatography*, TLC) ha sido ampliamente descrito y utilizado para este propósito (Kargius y Makinait, 2005; Kargius *et al.*, 2005). En el presente estudio, se evaluó la presencia o ausencia de toxinas, principalmente BEA de cada uno de los aislados, mediante la técnica de TLC, después del proceso anteriormente descrito de fermentación, filtración y posterior liofilización. Las muestras liofilizadas provenientes de los días 7, 9 y 11, se eligieron para llevar a cabo la TLC. Los liofilizados, así como el estándar de BEA, se re-suspendieron en una solución metanol-agua (55.55 - 44.4 %). Una vez realizadas las diluciones, se agregaron 10 µL de cada uno de los tratamientos, incluyendo el estándar, sobre pequeños puntos previamente marcados, sobre las placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (20x20; 0.25 mm), con una separación de 5 mm entre cada tratamiento. El eluyente utilizado para esta prueba fue una mezcla de acetato: metanol: agua (100:5:1). Las cromatoplasmas se colocaron dentro de cámaras de elución de vidrio a temperatura ambiente.

Una vez que el eluente recorrió la placa hasta 1-cm antes del final de la cromatoplasca, se dejaron al exterior para la evaporación del eluente. Las placas se revelaron con vaporizaciones de yodo para comparar la presencia/ausencia de manchas indicativas de micotoxinas. En base a la posición de las manchas se obtuvo el factor de retención (Rf), mediante la fórmula:

$$Rf = \text{distancia recorrida por el compuesto} / \text{distancia recorrida por el disolvente}$$

5.5 TIPIFICACIÓN MOLECULAR

Las técnicas mayormente utilizadas para observar la diversidad genética entre cepas de hongos entomopatógenos, son aquellas donde se utilizan marcadores específicos que registran cambios nucleotídicos o patrones diferentes entre cepas. Dentro de ellas se encuentra los RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) y la amplificación de las secuencias ribosomales nucleares y su análisis de los espaciadores internos transcritos (ITS: ITS-1, ITS2 y 5.8s) por medio de PCR-RFLP (Williams *et al.*, 1990; Neuvéglise *et al.*, 1994; Buscott *et al.*, 1996; Iturralde, 2005). El objetivo en este punto del trabajo fue el de evaluar la diversidad genética mediante RAPD y PCR-RFLP entre los tratamientos de *B. bassiana* evaluados con capacidad de infectar a *P. americana*.

5.5.1 Extracción de ADN

Los tratamientos se cultivaron en placas Petri a 27°C por 5 días en medio PDA. Posteriormente se re-aislaron cultivos monoespóricos, tal como se describió anteriormente. Una vez obtenidos los cultivos, se inocularon los aislados en medio líquido Sabouraud y extracto de levadura al 1%, a una concentración de 1×10^6 conidios/mL. Se incubaron por 72 h a 27°C y 150 rpm, para producir micelio. Posteriormente, el micelio se maceró con un buffer de suspensión compuesto por: 100 mM Tris; 1,4 M NaCl₂; 20 mM EDTA; 1% polivinilpirrolidona y 2% del surfactante catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) para ayudar a la dispersión homogénea de la muestra, ajustado a un pH= 8,0; a

cada muestra se le agregaron 8 μ L de proteinasa K. La mezcla se incubó a 65°C durante 60 min y se homogeneizó a intervalos de 10 min. Después las muestras se enfriaron en hielo y se mezclaron con cloroformo isoamílico (24:1), y se centrifugaron a 5.000 rpm por 15 min, para la separación de fases; esta etapa se realizó dos veces. Se recuperó el sobrenadante acuoso y se le agregó isopropanol a igual volumen del sobrenadante recuperado, y se incubaron a -20°C por toda la noche para precipitar el ADN. El pellet de ADN se colectó mediante centrifugación, se lavó con alcohol 70% y alcohol absoluto 90% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se diluyó en buffer Tris- EDTA (TE) pH 8,0 al 1x compuesto por: 10 mM Tris Cl (pH 7.4) y 10.6 g. 1 mM EDTA (pH 7.4) para preparar 1-L a 10x. El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría, usando un nano-espectrofotómetro Nanolytik® NanoSpec Cube Micro Biophotometer (DNA A₂₆₀).

5.5.2 Determinación de variabilidad entre tratamientos de *B. bassiana* mediante RAPD

El ADN se amplificó mediante la técnica RAPD-PCR (Williams *et al.*, 1990). Para esta prueba se utilizaron los partidores de las series OPA-A, OPA-B y OPA-AB (Operon Technologies, CA, USA). Las condiciones de amplificación de los RAPDs fueron de 45 ciclos de 1-min a 94°C, 1-min a 45°C y 2 min a 72°C, con un ciclo final de 5 min a 72°C (termociclador Techne, touchgene Gradient). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 μ L que contenían 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 mM del partidore, 1x de buffer de amplificación de PCR, 1-mM de MgCl₂, 1-U *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Life Tech.©) y 100 ng de ADN molde en agua ultrapura. Las reacciones se realizaron por triplicado para determinar la consistencia de los patrones. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa (1%) en el buffer 1-x TAE (40 mM Tris acetato, 0.5 mM EDTA, pH =8,0) a 100 V (fuente de poder Thermo Fisher Scientific Inc.). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y posteriormente se visualizaron bajo la luz ultravioleta (fotodocumentador UVP (luz UV) para su posterior evaluación.

5.5.3 Variabilidad entre tratamientos de *B. bassiana* por análisis de espaciadores internos de transcritos (ITS)

5.5.3.1 Amplificación de la región ITS

Se utilizaron los partidores universales ITS 1, ITS 2, ITS 3, ITS 4 e ITS 5 para amplificar ADN de los tratamientos mediante PCR (White *et al.*, 1990). La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ L, la cual contenía 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mM de los partidores ITS (1 ϕ 2 ϕ) y (4 ϕ 5 ϕ), 10x de buffer amplificación de PCR, 0,25 mM de MgCl₂, 1 U *Taq* ADN polimerasa y 25 μ g de ADN molde. La amplificación se realizó en el termociclador, donde el programa incluyó un ciclo inicial de 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 s 94°C, 40 s 57°C y 2 min a 72°C y una extensión final de 5 min. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa (1%) en el buffer 1x TAE (40 mM Tris acetato, 0.5 mM EDTA, pH 8,0) a 100 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y posteriormente se visualizaron bajo la luz ultravioleta (fotodocumentador UVP, luz UV) para su posterior evaluación.

5.5.3.2 Restricción de los productos de PCR

La restricción de los productos de PCR se realizó de acuerdo a protocolos de los distribuidores usando las siguientes enzimas endonucleasas: *Alu* I, *Eco* RI, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I (Invitrogen, Life Tech.©). La reacción de digestión se realizó bajo las siguientes condiciones: 8 μ L de ADN amplificado, 1 μ L de 10x buffer específico de enzima y 5 unidades de enzima de restricción. La incubación fue a 37°C en un tiempo adecuado a la enzima de restricción. Los fragmentos generados por la restricción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en buffer 1x TAE a 100 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos bajo la luz UV. Las reacciones se realizaron por triplicado para determinar la consistencia de los patrones.

5.5.3.3 Purificación de ADN (Productos de la amplificación de la región ITS)

La purificación de ADN proveniente de los productos de PCR se realizó de acuerdo al protocolo de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Este sistema puede purificar fragmentos de ADN de 100 bp hasta 10 kb directamente del producto de la amplificación de PCR con un 95% de confianza. Posteriormente, las muestras de ADN purificado se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación, del Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos, MX. Posteriormente se validaron las secuencias en el software Bioedit 7.0.9.

5.6 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

5.6.1 Actividad fenoloxidasa (PO)

Con el fin de relacionar la respuesta inmune de las diferentes variables de *P. americana* con su susceptibilidad a *B. bassiana*, se evaluó la actividad innata de PO de ninfas, hembras y machos de los insectos mediante la medición en el cambio de absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro por la oxidación del sustrato DL-dihidroxifenilalanina (L-DOPA; Sigma-Aldrich) por la activación de la enzima PO. Posteriormente, siguiendo la metodología descrita para la exposición de los insectos a los tratamientos/experimentos de *B. bassiana*, se les determinó la respuesta inmunológica humoral en tres variables: ninfas tardías, hembras y machos. Los insectos sobrevivientes expuestos en bioensayos de laboratorio, se esterilizaron de la superficie con etanol al 70% y se enjuagaron en agua estéril. Posteriormente se mantuvieron a -20°C hasta sacrificarlos. Los insectos se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL en los cuales se maceraron usando pistilos estériles. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 10 min, para precipitar los tejidos y obtener el sobrenadante, todo esto a una temperatura de 4°C.

Una vez obtenido el sobrenadante de la hemolinfa de cada una de las muestras de los individuos en las diferentes fases de desarrollo, se removieron los hemocitos por

centrifugación a 14000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante del plasma, se tomaron 10 μ L y se mezclaron con 150 μ L de L-DOPA a 10 mM en PBS, a pH 6.5, a 25 °C en placas de 96 pozos y se midió el cambio de absorbancia a 490 nm usando un lector de microplacas (multimodo DTX detector 880, Beckman Coulter Inc., Austria). Se realizaron curvas de la oxidación del sustrato (L-DOPA) por la activación de la enzima PO. Los valores se obtuvieron contra tiempo (5, 10 y 15 min) para compararlos con los obtenidos de los insectos tratados con los diferentes aislados/tratamientos (Wang *et al.*, 2007). Se utilizaron hasta seis cucarachas en el estudio de ninfas iniciales, para ninfas intermedias se usaron de tres a cuatro, y para ninfas tardías o adultos sólo una cucaracha. Como control negativo se usó PBS más el sustrato. Todas las pruebas se hicieron por triplicado

5.6 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Todos los tratamientos y bioensayos se realizaron por triplicado. De los datos obtenidos de los parámetros de mortalidad, viabilidad y susceptibilidad de microorganismos a los liofilizados se obtuvo la media para cada repetición, las cuales fueron analizadas mediante el análisis de varianza (ANOVA), incluyendo una prueba *posthoc* Tukey HDS; así como una prueba de *t* de Student de una sola vía y paríada, cuando se evaluaron menos de 3 tratamientos. Para determinar la correlación entre la AI y la actividad PO se usó el análisis de correlación de Pearson. Las diferencias se delimitaron a una significancia de $P \leq 0.05$. Para las pruebas moleculares, la evaluación del polimorfismo genético se realizó a partir de los productos de amplificación generados de los iniciadores utilizados. Los productos de la PCR de la técnica de RAPD se reportaron tomando las bandas más intensas como presentes (1), o como ausentes (0), en cada análisis genotípico. Los datos fueron registrados en matrices binarias. Se construyó una matriz de similitud generada mediante el modelo matemático o índice de Jaccard (J) y un análisis de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average) que se empleó para la construcción del dendrograma, ya que dicha plataforma permite analizar y comparar diferencias genéticas aplicado a poblaciones de la misma especie. En todos los casos se usó el programa

estadístico computacional para Windows, SPSS Statistics 17.0 (2007). Excepto para la alineación de secuencias, donde se utilizó el programa BioEdit © (1997-2011).

RESULTADOS

6.1 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS/ EXPERIMENTOS DE *Beauveria bassiana*

6.1.1 Selección de tratamientos

Además de los aislamientos de *B. bassiana* proporcionados por el CESAVEG (C1 y C2), se logró obtener cuatro aislamientos más (C3, C4, C5 y C6) provenientes de insectos colectados en su ambiente natural. Una vez que fueron identificados como *B. bassiana* en base a las características morfológicas, se llevó a cabo la evaluación preliminar de los tratamientos de *B. bassiana* como conidios aéreas (CA) obtenidas de la fermentación sólida con el fin de seleccionar aquéllos con efectividad sobre *P. americana*. Los aislamientos seleccionados por su mayor actividad, se fermentaron a través de 13 días, los cuales se usó el producto total de fermentación, el cual fue el experimento de conidios sumergidos más blastosporas (CS+B), así como el producto filtrado libre de conidios y blastosporas, experimento denominado sobrenadante filtrado (SF).

Los bioensayos de actividad insecticida, medido como porcentaje de mortalidad, mostraron diferencias significativas en cuanto a mortalidad entre ninfas y adultos expuestos a los tratamientos de *B. bassiana* ($P\leq 0.05$). Se verificó que la mortalidad de los experimentos con CA y CS+B fueran debidas a los tratamientos de *B. bassiana*, observando el crecimiento de *B. bassiana* sobre agar nutritivo o PDA, el cual fue inoculado con una muestra tomada de la región interna abdominal, en los casos que no mostraron micelio aéreo, o del micelio propio, de los insectos muertos después de ser tratados. Las placas inoculadas con muestras de cucarachas expuestas al control y/o al experimento con SF, no mostraron crecimiento de *B. bassiana*.

6.1.2 Evaluación del experimento con conidios aéreos (CA)

Se realizó la evaluación selectiva de los tratamientos: las cepas C1 y C2 (CESAVEG), y los aislamientos C3, C4, C5 y C6 (UANL) a partir de los productos de los experimentos consistiendo en conidios aéreos (CA) proveniente de cultivos monoespóricos. Se probó la

efectividad de los CA sobre *P. americana*, comparando los parámetros de porcentaje de mortalidad como indicativo de la actividad insecticida (AI) y viabilidad para llevar a cabo la selección.

6.1.3 Actividad insecticida (AI)

Se probó la actividad insecticida en base al porcentaje de mortalidad de las variables evaluadas: ninfas tardías, hembras y machos. La evaluación preliminar de AI nos permitió discriminar a los tratamientos C3 y C5, por su nula efectividad en cualquier fase evaluada del insecto (Fig. 12).

Tabla 3. Evaluación de la actividad insecticida y viabilidad del experimento con conidios aéreos de los tratamientos de *B. bassiana*¹

Clave	Pruebas de viabilidad		
	Germinación (%) ± ES	UFC (x10 ⁷) ± ES	MTT* (Abs) ± ES
Control	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 c	0.025 ± 0.001 c
C1	39.33 ± 4.25 b	1.75 ± 1.48 b	0.390 ± 0.01 ab
C2	81.66 ± 1.76 a	3.00 ± 0.00 a	0.404 ± 0.01 a
C3	15.33 ± 0.88 c	1.67 ± 1.53 b	0.373 ± 0.00 ab
C4	88.66 ± 2.02 a	3.00 ± 0.00 a	0.429 ± 0.01 a
C5	20.66 ± 3.17 c	1.40 ± 1.32 b	0.336 ± 0.01 b
C6	88.33 ± 2.40 a	3.00 ± 0.00 a	0.427 ± 0.03 a

¹UFC= Unidades formadoras de colonias; MTT= Absorbancia a 570 nm de la reacción de oxidación del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT); ES =error estándar de la media. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias a $P \leq 0.05$ basados en la prueba de *Post Hoc* Tukey HDS del análisis de varianzas ANOVA (SPSS Statistics 17.0, 2007). Los valores representan la media de tres repeticiones.

*Control= PBS+Tween 20 ®.

**Control= insectos tratados con PBS+Tween 20 ®

Los resultados mostraron diferencias en los valores de mortalidad, demostrando la AI. En general, las ninfas tardías fueron menos susceptibles a los tratamientos de *B. bassiana*, observándose valores del 12.23, 10.57 y 2.10% de mortalidad para C4, C6 y C2,

respectivamente; mientras que C1 no presentó AI y no fue diferente al control sin tratar. Por lo contrario, *P. americana* fue más susceptible a los tratamientos en adultos, donde C4 fue significativamente mayor, mostrando un % de mortalidad comparado con los tratamientos C1, C2 y C6 ($F = 75.21$; $df = 4,12$; $P < 0.001$).

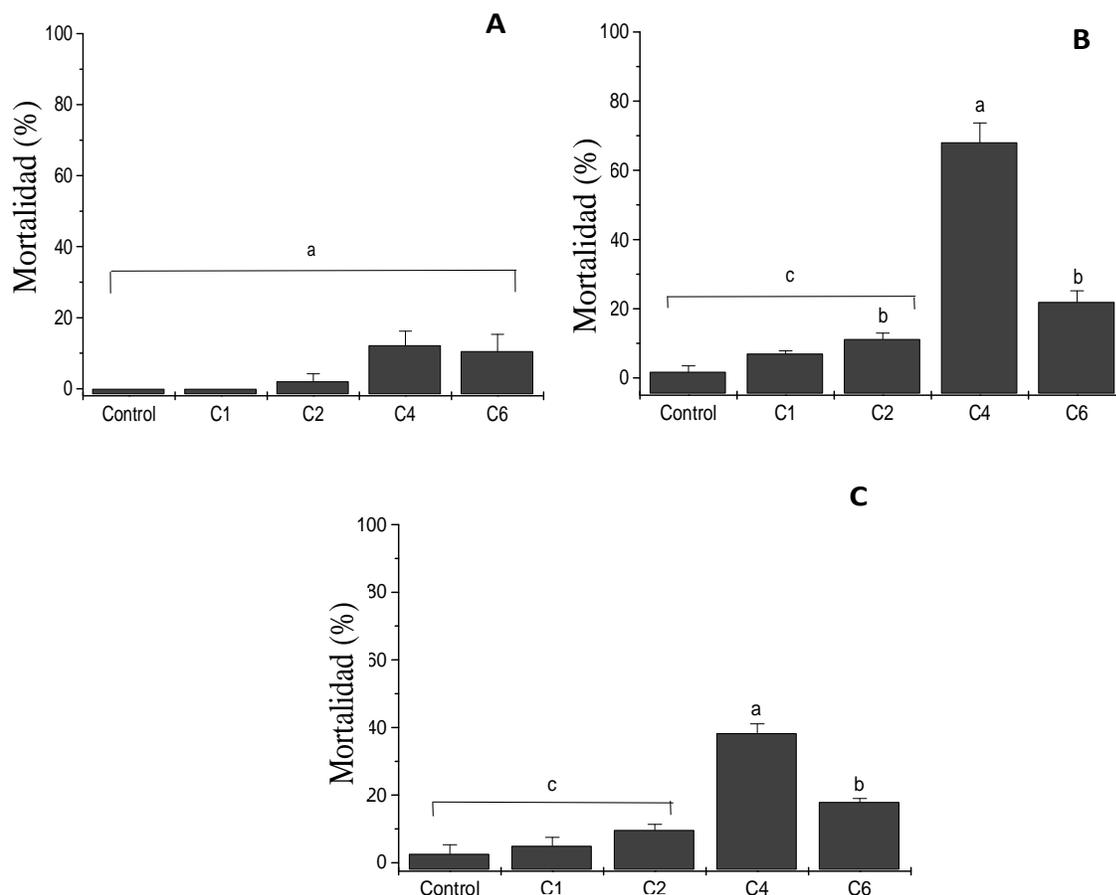


Fig.12. Porcentaje de mortalidad de *Periplaneta americana* expuesta a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* del experimento con conidios aéreos. A) Mortalidad de ninfas tardías; B) Mortalidad de hembras; C) Mortalidad de machos. Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

Las hembras fueron más susceptibles que los machos, mostrando porcentajes de mortalidad de hasta el 68.12% para el tratamiento C4, seguido por el tratamiento C6 con un 21.96%, C2 con el 11.24%, y C1 con el 7.01%; mientras que para machos, los valores de mortalidad fueron de 38.33% para C4, 18.00% para C6, 9.67% para C2 y 5% para C1, el cual no fue diferente al control sin tratar (Fig. 12).

6.1.4 Pruebas de viabilidad

El estudio de viabilidad también mostró diferencias entre los tratamientos. En general, los tratamientos C2, C4 y C6 mostraron los mayores valores de viabilidad significativamente diferentes frente a los tratamientos C3 y C5 en las pruebas de viabilidad realizadas: la prueba de porcentaje de germinación ($F = 170.0$; $df = 5,12$; $P < 0.00$) y la prueba de unidades formadoras de colonias (UFC; $F = 109.7$; $df = 5,14$; $P < 0.001$); y diferentes significativamente a C5 en el bioensayo de reducción de MTT ($F = 57.6$; $df = 5,12$; $P < 0.001$); mientras que el tratamiento C1 fue diferente únicamente a los tratamientos C3 y C5 en el porcentaje de germinación, mediante la prueba de Tukey ($P > 0.05$). En la prueba de germinación, los valores de viabilidad después de 12h de incubación, fueron tan altos como el 80% para los tratamientos C2, C4 y C6, y tan bajo como 5.33% para el tratamiento C3 (Tabla 3). Así mismo, los valores más altos de la prueba UFC fueron de 3×10^7 UFC para los tratamientos C2, C4 y C6, quienes no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero sí frente a los tratamientos C1, C3 y C5 (1.75 , 1.67 y 1.40×10^7 UFC, respectivamente).

De igual forma, en el bioensayo de actividad medida por reducción del MTT, los tratamientos C2, C4 y C6 presentaron los valores más altos de viabilidad en base a los valores de absorbancia (0.404, 0.429 y 0.427, respectivamente), pero sólo significativamente diferentes al tratamiento C5 (0.336) y similares a los C1 (0.390) y C3 (0.373). Con estos resultados, aunados a los del % de mortalidad, se realizó la elección de los tratamientos C1, C2, C4 y C6 para darles continuidad en las siguientes pruebas.

6.2 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DESPUÉS DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

Una vez seleccionados los tratamientos C1, C2, C4 y C6, se llevó a cabo la fermentación a través de 13 días, donde los tratamientos fueron evaluados como experimentos de producción de conidios sumergidos más blastosporas (CS+B) y sobrenadante filtrado (SF), midiendo los parámetros establecidos (actividad insecticida, viabilidad de conidios/blastosporas y/o actividad/ detección de compuestos o metabolitos secundarios). También se muestra la evaluación de los experimentos CS+B y SF provenientes de la fermentación agregando ácido bórico como adyuvante.

6.2.1 Conidios sumergidos y blastosporas (CS+B)

Se llevó a cabo la evaluación de los tratamientos, donde se les determinó la actividad insecticida (en base al porcentaje de mortalidad), así como la viabilidad del producto final de fermentación.

6.2.1.1 Actividad insecticida (AI)

Para determinar el nivel de susceptibilidad de *P. americana* se evaluaron los tratamientos C1, C2, C4 y C6. Entre ellos se observaron diferencias significativas entre cada variable, ninfas tardías ($F = 4.131$; $df = 4,10$; $P = 0.031$), hembras ($F = 437.579$; $df = 4,10$; $P < 0.001$) y machos ($F = 138.309$; $df = 4,10$; $P < 0.001$). En general, los tratamientos C4 y C6, causaron la más alta mortalidad en todas las variables, mientras que el tratamiento C1 presentó los valores más bajos y no fue significativamente diferente ($P > 0.05$) a los insectos control sin tratar (Fig. 13).

Similar a lo observado con el producto del experimento con CA, los adultos fueron más susceptibles al experimento con SC+B. Las hembras presentaron la mayor susceptibilidad, siendo los tratamientos C4 (95.56 %) y C6 (91.93 %), quienes mostraron los porcentaje de mortalidad significativamente más altos, comparados con observados por los tratamientos C1 (10.85 %) y C2 (32.58 %). Así mismo, los tratamientos C4 y C6 presentaron una AI

significativamente mayor en machos ($P \leq 0.05$), con mortalidades del 87.64 y 82.19%, respectivamente, en comparación a los tratamientos C1 (12.25 %) y C2 (33.17 %). No obstante, a diferencia del experimento con CA, las ninfas tardías tratadas con SC+B presentaron significativamente altos porcentajes de mortalidad (AI), siendo el tratamiento C6 quien presentó el más alto (85.33 %), comparado con C1 (12.33 %) y C2 (62.33%), pero fue similar al tratamiento C4 (74.33 %) (Fig. 13).

Tabla 4. Evaluación del experimento de producción de *Beauveria bassiana* consistente en conidios sumergidos y blastosporas (CS +B) de los cuatro tratamientos, obtenidos a partir del producto final de la fermentación líquida¹

Tratamientos	Pruebas de viabilidad		
	Germinación (%) \pm ES	UFC ($\times 10^5$) \pm ES	MTT (Abs) \pm ES
Control	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d	0.047 \pm 0.001c
C1	23.0 \pm 4.93 c	3.86 \pm 5.45c	0.086 \pm 0.006c
C2	44.0 \pm 4.58 b	8.16 \pm 5.17b	0.140 \pm 0.003b
C4	62.6 \pm 3.17ab	9.96 \pm 1.76ab	0.501 \pm 0.021a
C6	71.0 \pm 4.04a	*1.03 \pm 3.75 a	0.472 \pm 0.004 a

¹UFC= Unidades formadoras de colonias; MTT= Absorbancia a 570 nm de la reacción de oxidación de sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-, 2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias a $P \leq 0.05$ basados en la prueba de *Post Hoc* Tukey HSD del análisis de varianza ANOVA (SPSS Statistics 17.0, 2007).

Los valores representan la media de tres repeticiones.

*= Número de conidios $\times 10^6$.

6.2.1.2 Pruebas de viabilidad

Las pruebas de viabilidad mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en las tres pruebas establecidas, el porcentaje de germinación mostró valores de $F = 25.38$; $df = 3,8$; $P < 0.001$, la viabilidad mediada mediante UFC los valores fueron de

$F = 47.97$, $df = 3,8$; $P < 0.0019$ y para la prueba de actividad celular por reducción del MTT mostró valores de $F = 455.02$; $df = 4,10$; $P < 0.001$. Sin embargo, con la prueba de Tukey se puntualizó que el tratamiento C1 presentaba los valores significativamente más bajos de viabilidad ($P \leq 0.05$), en comparación a los tratamientos C2, C4 y C6, mientras que los tratamientos C4 y C6 mostraron los valores significativamente más altos (Tabla 4).

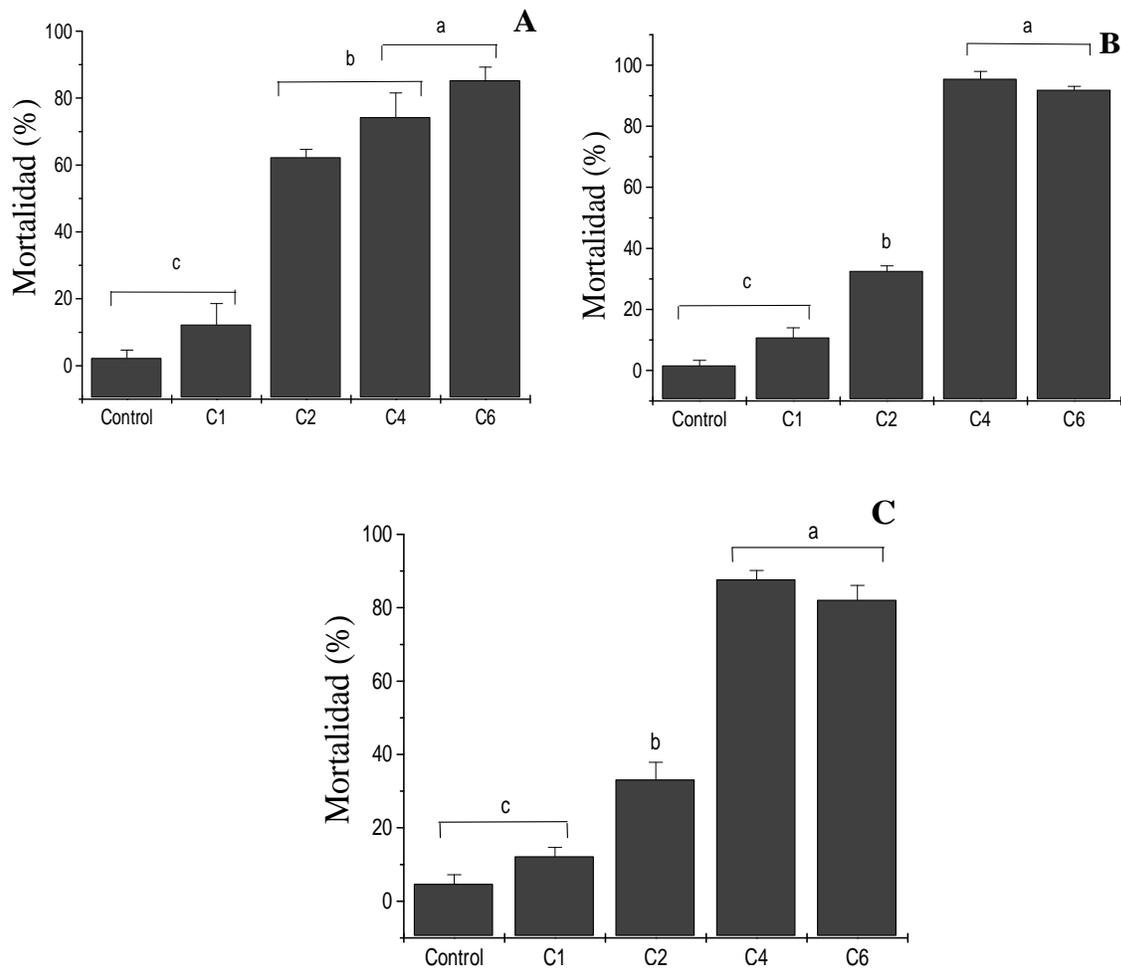


Fig. 13. Porcentaje de mortalidad de *Periplaneta americana* expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* del experimento de conidios sumergidos + blastosporas. A) Mortalidad de ninfas tardías; B) Mortalidad de adultas hembras; C) Mortalidad de adultos machos. Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

Específicamente, el tratamiento C6 presentó el valor más alto de porcentaje de germinación (71.0%) y UFC (1.03×10^6 conidios/mL), significativamente diferente comparado contra C2, que obtuvo en ambas pruebas valores de 44.0% de germinación y 8.16×10^5 conidios/mL, respectivamente ($P \leq 0.05$). El porcentaje de germinación fue mayor para el tratamiento C4, pero sin ser significativamente diferente, ya que mostró valores de 62.6% de germinación y 9.96×10^5 conidios /mL en la prueba de UFC. En la prueba de actividad celular por reducción de MTT, el valor de absorbancia más alto de nuevo se obtuvo con los tratamientos C4 (0.501) y C6 (0.472), quienes fueron significativamente mayores comparados con C1 (0.086) y C2 (0.140) ($P \leq 0.05$).

6.2.2 Sobrenadante filtrado (SF)

Los tratamientos después de la fermentación se sometieron al proceso de filtración, para excluir conidios y blastosporas. A estos tratamientos se les determinó la actividad insecticida (AI) medida por el porcentaje de mortalidad, así como la actividad antibacteriana del filtrado (por medio de un antibiograma) y la detección de metabolitos secundarios de *B. bassiana* que pudieran influir en la AI.

6.2.2.1 Actividad insecticida (AI)

Se evaluó la actividad insecticida, como porcentaje de mortalidad, del experimento SF de los tratamientos C1, C2, C4 y C6 sobre *P. americana*. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos contra ninfas tardías ($F= 13.22$; $df = 4,10$; $P = 0.001$), hembras ($F = 47.08$; $df = 4,10$; $P < 0.001$) y machos ($F= 42.29$ $df = 4,10$; $P < 0.001$). Aunque se observó mortalidad entre las tres variables evaluadas (ninfas tardías, hembras y machos), ésta no fue mayor al 55% (Fig. 14).

El tratamiento C4 mostró los valores más altos de AI; el valor en ninfas tardías y machos fue del 50.00% y en hembras del 55.55%; seguido por el tratamiento C6, donde las ninfas tardías mostraron el 29.16%, en hembras el 48.61%, y para machos el 48.67% de mortalidad.

El tratamiento C2 mostró valores de mortalidad significativamente menores a C4 y C6 en ninfas tardías (16.73 %) y en hembras (18.05%), pero no fue diferente al compararlo con la susceptibilidad de los machos (37.67%) ($P < 0.05$), mientras que el tratamiento C1 nuevamente mostró los valores más bajos de mortalidad, no observando diferencias entre éste y los insectos sin tratar (Fig. 14).

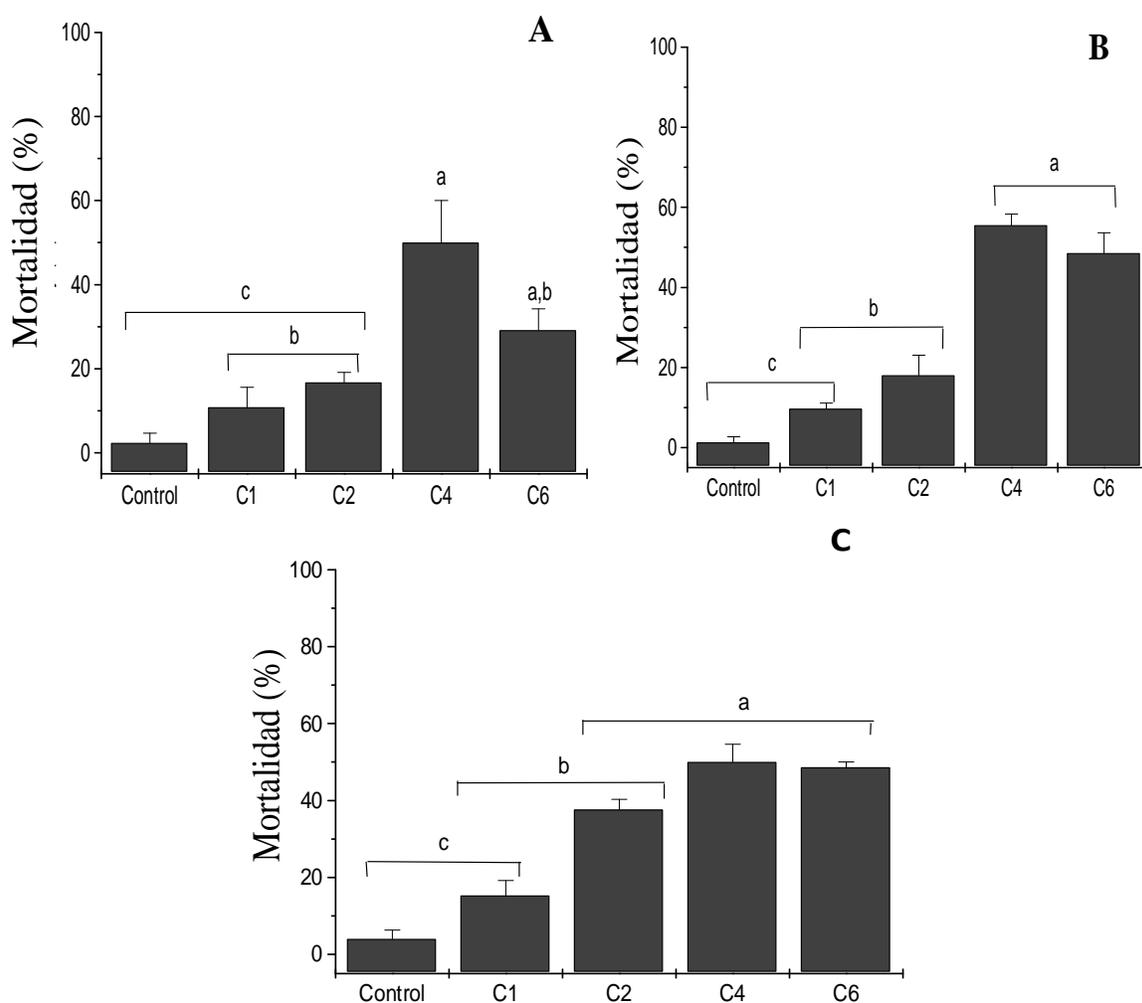


Fig.14. Porcentaje de mortalidad de *Periplaneta americana* expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* del experimento con sobrenadante filtrado.

A) Mortalidad de ninfas tardías; B) Mortalidad de hembras; C) Mortalidad de machos. Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

6.2.2.2 Actividad antimicrobiana del sobrenadante.

Se realizó un antibiograma utilizando las muestras de los filtrados liofilizados y un estándar de beauvericina (BEA) purificada, para determinar la susceptibilidad de bacterias Gram (+) y Gram (-) a los tratamientos de *B. bassiana*. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles utilizados, así como entre los días de fermentación ($P < 0.05$). Así mismo, el estándar de BEA mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en actividad antibacteriana según el vehículo utilizado (metanol o PBSt) entre todas las cepas bacterianas probadas, a excepción de la cepa de *Shigella* sp., donde no se observaron diferencias contra los controles (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba de susceptibilidad de microorganismos mediante la prueba por difusión en placa a los tratamientos de *Beauveria bassiana* filtrados a partir del fermentado líquido final¹

Aislamiento	Halo de inhibición (mm ± ES)					
	Gram (+)		Gram (-)			
	<i>B. subtilis</i>		<i>L. monocystis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. thyphi</i>	<i>Shigella</i> sp.
	*PBS	*Metanol				
Día 7						
C1	6.3 ± 0.3 bc	≥ 15	9.0 ± 1.0 a	NA	0.2 ± 0.2 b	0.0 ± 0.0 a
C2	4.6 ± 0.3 c	≥ 15	7.5 ± 2.5 a,b	NA	0.0 ± 0.0 b	1.0 ± 0.5 a
C4	7.0 ± 0.0 abc	≥ 15	9.5 ± 0.5 a	NA	2.0 ± 0.0 a,b	0.3 ± 0.1a
C6	6.6 ± 0.3 abc	≥ 15	8.5 ± 0.5 a,b	NA	0.2 ± 0.2 b	0.0 ± 0.0 a
Día 9						
C1	5.3 ± 0.3 c	≥ 15	6.5 ± 0.5 a,b	NA	1.2 ± 0.2 a,b	1.5 ± 0.5 a
C2	5.0 ± 0.0 c	≥ 15	8.5 ± 0.5 a,b	NA	0.75 ± 0.2 a,b	1.7 ± 0.5 a
C4	7.0 ± 0.0 abc	≥ 15	11.0 ± 1.0 a	NA	0.0 ± 0.0 b	1.5 ± 0.5 a
C6	6.3 ± 0.3 bc	≥ 15	8.5 ± 0.5 a,b	NA	0.5 ± 0.5 a,b	2.5 ± 0.5 a
Día 13						
C1	6.0 ± 0.0 bc	≥ 15	10.5 ± 1.5 a	NA	1.1 ± 0.9 a,b	1.2 ± 0.7 a
C2	5.3 ± 0.3 c	≥ 15	7.5 ± 0.5 a,b	NA	0.75 ± 0.7 a,b	0.7 ± 0.2 a
C4	9.0 ± 1.7 a	≥ 15	8.0 ± 0.0 a,b	NA	0.0 ± 0.0 b	0.7 ± 0.2 a
C6	8.3 ± 2.1 ab	≥ 15	9.5 ± 0.5 a	NA	0.0 ± 0.0 b	0.5 ± 0.5 a
BEA-OH	**4.0 ± 0 d		**3.5 ± 0.5 b	**2.7	**2.5 ± 0.5 a	1.5 ± 0.05 a
BEA-PBSt = 0.1 ± 0.1	Metanol = 0.1 ± 0.1		PBSt = 0 ± 0			

¹ BEA=estándar de beauvericina (2µg/mL); PBSt= Buffer de fosfatos +Tween 20 ®; ES =error estándar de la media. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias a $P < 0.05$ basados en la prueba de *Post Hoc* Tukey HDS del análisis de varianzas ANOVA (SPSS Statistics 17.0, 2007).

En general, todos los liofilizados mostraron actividad antibacteriana, reflejada como un halo de inhibición para todas las bacterias evaluadas, excepto para *E. coli* que no mostró inhibición para ningún tratamiento, solamente para la BEA comercial usando como vehículo metanol (2.7mm). El tamaño del halo de inhibición varió para cada tratamiento y para cada cepa bacteriana. La mayor susceptibilidad de las bacterias frente a los tratamientos se observó entre las Gram (+), donde la actividad de los controles de BEA-metanol (4.0 mm) y BEA-PBSt (0.1 mm) fueron menores en comparación a los liofilizados. El tratamiento C4, presentó el halo de inhibición mayor para *B. subtilis* al día 11 (9.0 mm), seguido del tratamiento C6 (8.3 mm) usando como vehículo PBSt (Fig. 15).

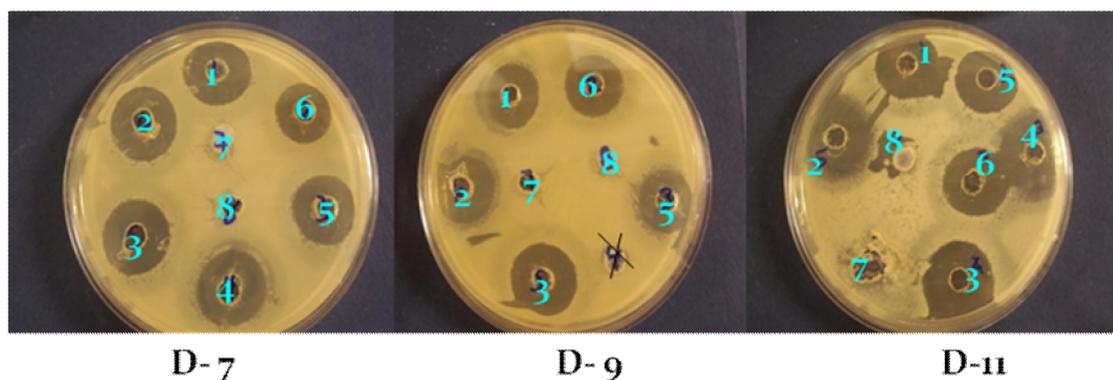


Fig. 15. Bioensayo de evaluación de toxicidad del sobrenadante (Filtrado) mediante el método de difusión en pozo en agar a bacterias sensibles a las micotoxinas de *B. bassiana*. Cepa: *Bacillus subtilis* 2.5×10^6 cel/mL. Inhibidor: Tratamientos de *B. bassiana* 30 μ L/pozo. D 7, 9 y 11= Días de fermentación; 1 y 2 = tratamientos C1 y C2; 3- 6 = tratamientos C3, C4, C5 y C6; 7= solución salina; 8= estándar de Beauvericina

Con *B. subtilis* se llevó a cabo un segundo ensayo en el cual los tratamientos fueron resuspendidos en metanol, encontrándose diferencias significativas entre la actividad dependiente del vehículo, mediante la prueba *t* de Student parida ($P < 0.001$), donde en todos los casos los liofilizados resuspendidos en metanol mostraron halos de inhibición mayores (≥ 15 mm) en comparación a los resuspendidos en PBSt (Tabla 5). Para *L. monocystis* la mayoría de los tratamientos resuspendidos en PBSt, así como el control de BEA-metanol, mostraron una actividad antibacteriana similar; sin embargo, los tratamientos C1, C4 y C6, mostraron valores significativamente mayores dependiendo del día de fermentación ($P \leq 0.05$) en comparación con el control. El tratamiento C1 mostró mayor

actividad durante los días 7 y 13 de fermentación (9.0 y 10.5 mm, respectivamente) en comparación a BEA-metanol (3.5 mm). Así mismo, el tratamiento C4 mostró mayor actividad que el control de BEA-metanol en los días 7 y 9 (9.5 y 8 mm, respectivamente), mientras que el tratamiento C6 obtuvo una actividad significativamente mayor frente al control durante el día 13 (final) de la fermentación líquida (9.5 mm).

Por el contrario, en las bacterias Gram (-) el nivel de susceptibilidad de los microorganismos a los liofilizados y al control BEA-metanol fue menor en comparación a las Gram (+), siendo el control BEA-metanol quien mostró mayor actividad antimicrobiana para *S. e. Typhi* (2.5 mm), mientras que para la cepa de *Shigella sp.* no hubo diferencia entre tratamientos y controles.

6.2.2.3 Detección de Beauvericina (BEA) por cromatografía en capa fina

Se llevó a cabo la detección de metabolitos secundarios entre los tratamientos durante los días 7, 9 y 13 de la fermentación líquida por medio de la cromatografía en capa fina (*thin layer chromatography*, TLC). Mediante esta técnica se observó la ausencia de BEA para todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, la cepa 4 mostró la presencia de un compuesto con características similares a las eniانتinas en cuanto al análisis de migración ($R_f=0.85$), reportada en otros estudios (Fig. 16) (Song *et al.*, 2009).

6.3 FERMENTACIÓN LÍQUIDA USANDO ÁCIDO BÓRICO COMO ADYUVANTE

Se realizó una fermentación líquida de los tratamientos C1, C2, C4 y C6, a nivel matraz (500mL) en medio líquido Sabouraud, usando una fuente de nitrógeno extra, extracto de levadura al 1%. Además, se agregó ácido bórico (H_3BO_4) al 1% como potenciador de la actividad insecticida.

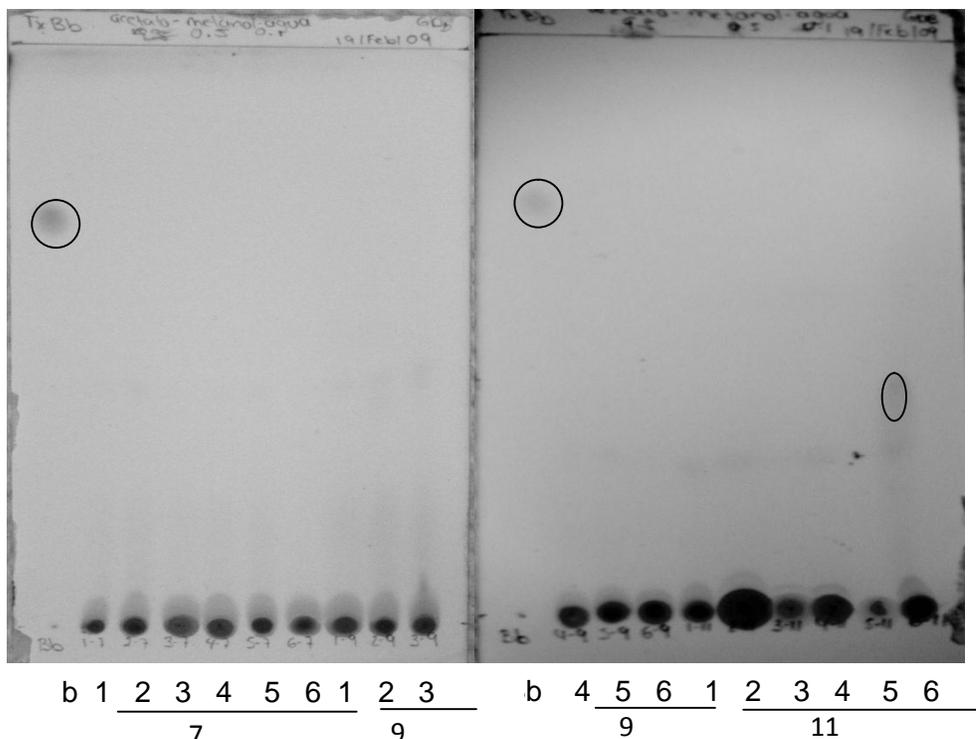


Fig. 16. Valor de R_f del estándar de Beauvericina = 0.76. D 7, 9 y 11= Días de fermentación; 1 y 2 = Cepas del CESAVEG; 3- 6 = tratamientos de *P. americana* en la UANL Bb= estándar de beauvericina

6.3.1 Cinética de crecimiento

La fermentación de los tratamientos, agregando H_3BO_4 como adyuvante, se llevó a cabo durante 13 días, tiempo en el cual se realizó una cinética de crecimiento, usando el método colorimétrico de MTT para determinar la viabilidad de los tratamientos de *B. bassiana*. Se usaron diferentes concentraciones de H_3BO_4 (1, 5, 7 y 10%), para determinar la concentración adecuada del adyuvante. Los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) mediante la prueba de *t*-student en los tratamientos a las diferentes concentraciones del adyuvante durante la fermentación. A mayores concentraciones de H_3BO_4 , el crecimiento de *B. bassiana* en todos los tratamientos fue menor (Tabla 6; Fig. 17).

Tabla 6. Diferencias en la viabilidad durante la cinética de crecimiento de los tratamientos de *B. bassiana* fermentados con diferentes concentraciones de ácido bórico (H₃BO₄) durante 13 días¹

% H ₃ BO ₄	C1 Sin H ₃ BO ₄		C2 Sin H ₃ BO ₄		C4 Sin H ₃ BO ₄		C6 Sin H ₃ BO ₄	
	t	P	t	P	t	P	t	P
1	8.540	< 0.001	5.813	< 0.001	3.946	0.001	2.680	0.016
5	8.521	< 0.001	5.870	< 0.001	13.284	< 0.001	10.745	< 0.001
7	8.580	< 0.001	6.037	< 0.001	13.561	< 0.001	12.094	< 0.001
10	9.879	< 0.001	5.992	< 0.001	14.288	< 0.001	13.895	< 0.001
	C1 + H ₃ BO ₄ 1%		C2 + H ₃ BO ₄ 1%		C4 + H ₃ BO ₄ 1%		C6 + H ₃ BO ₄ 1%	
5	0.454	0.656	3.706	0.002	6.142	< 0.001	4.745	< 0.001
7	1.254	0.227	3.870	0.001	6.286	< 0.001	5.157	< 0.001
10	2.820	0.012	4.117	0.001	6.243	< 0.001	5.579	< 0.001

¹La viabilidad de los tratamientos fue determinada mediante la prueba de MTT. Se realizó una *t*-student parida para determinar diferencias significativas entre las medias a $P \leq 0.05$ usando el programa computacional de SPSS Statistics 17.0 (2007).

Ultimos 2 renglones no se incluye por que en el analisis ANOVA no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$).

En los resultados de fermentación sin H₃BO₄ se observó que en los cuatro tratamientos se mantuvo una significativamente mayor tasa de viabilidad ($P < 0.05$), en comparación a las fermentaciones usando las concentraciones de 1, 5, 7 y 9 % de H₃BO₄, mientras que entre las fermentaciones conteniendo el adyuvante, los datos de viabilidad mostraron que la concentración al 1% fue mayor significativamente ($P < 0.05$) comparada frente a las concentraciones al 5, 7 y 10 %; a excepción del tratamiento C1, donde no hubo diferencia entre la concentración al 1% y las concentraciones de 5 y 7 % de H₃BO₄, pero si frente a la concentración al 10% ($t=2.82$; $P=0.012$) (Tabla 6; Fig. 17).

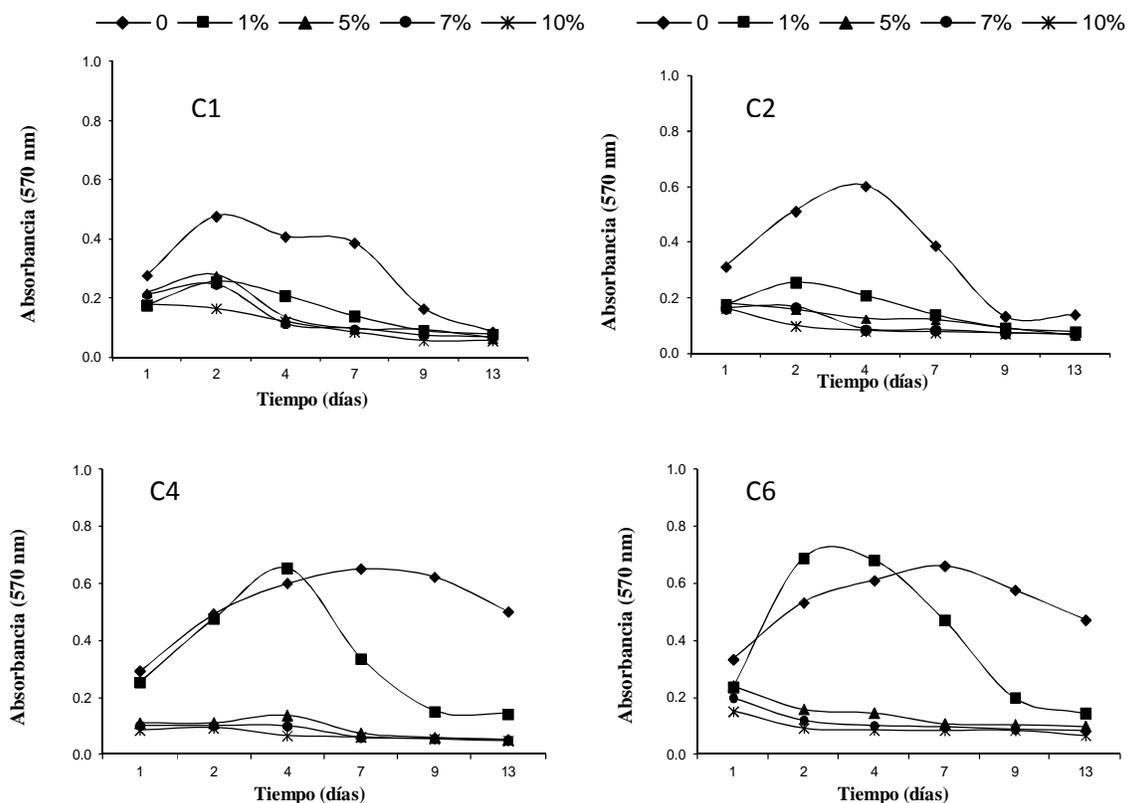


Fig. 17. Cinética de crecimiento de los tratamientos de *B. bassiana* fermentados con diferentes concentraciones de ácido bórico (H_3BO_4) durante 13 días. La viabilidad de los tratamientos fue determinada mediante la prueba de MTT. Se realizó una prueba de *t*-student parida para determinar diferencias significativas entre las medias a $P < 0.05$ (tabla 6), usando el programa computacional de SPSS Statistics 17.0 (2007).

6.3.2 Evaluación del experimento de CS+B agregando H_3BO_4

6.3.2.1 Actividad insecticida (AI)

Cuando se midió el nivel de susceptibilidad de *P. americana* a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 después de la fermentación usando H_3BO_4 como adyuvante, se observaron valores por arriba del 80% de mortalidad. Los tratamientos mostraron diferencias significativas mediante ANOVA entre ninfas ($F = 111.23$; $df = 4, 10$; $P < 0.001$), hembras ($F = 248.42$; $df = 4, 10$; $P < 0.001$) y machos ($F = 832.32$; $df = 4, 10$; $P < 0.001$). Sin embargo, mediante la prueba de Tukey, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en ninguna fase del

insecto probada, pero si entre los tratamientos y el control sin tratar ($P < 0.05$). Similar a lo observado con los experimentos sin H_3BO_4 , los adultos fueron más susceptibles a los tratamientos. Debido a la similitud entre los resultados se realizó un análisis de *t*-student parizada, evaluando las diferencias entre un solo tratamiento y las tres fases del insecto probadas, mostrando diferencias significativas en AI a nivel de $P \leq 0.05$ para los tratamientos C1 y C6 (Tabla 7). Para el tratamiento C1, las ninfas tardías mostraron valores de mortalidad significativamente menores (82.19%) comparadas contra los insectos machos (93.76 %), pero no fue diferente a las hembras (88.83%), mientras que las ninfas tardías tratadas con el tratamiento C6 (87.74%), fue menor significativamente a hembras y machos (98.13y 96.83 %, respectivamente).

Tabla 7. Actividad insecticida del producto final de la fermentación líquida (CS+B) con H_3BO_4 de los tratamientos de *Beauveria bassiana* ¹

<i>P. americana</i>	Porcentaje de mortalidad \pm ES de los tratamientos				
	Control	C1	C2	C4	C6
Ninfas tardías	7.55 \pm 0.48b	82.19 \pm 3.86a*	85.50 \pm 3.92 a	88.11 \pm 4.36a	87.74 \pm 2.42a*
Hembras	2.92 \pm 0.71b	88.83 \pm 3.47a	89.95 \pm 4.41a	98.32 \pm 0.56a	98.13 \pm 1.15a*
Machos	5.53 \pm 1.56b	93.76 \pm 2.13a*	94.72 \pm 0.83a	97.19 \pm 1.13a	96.83 \pm 0.87a*

¹ES =error estándar de la media. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias a $P \leq 0.05$ basados en la prueba de *Post Hoc* Tukey HDS del análisis de varianza ANOVA (SPSS Statistics 17.0, 2007).

6.3.2.2 Pruebas de viabilidad

El estudio de viabilidad mostró diferencias entre los tratamientos mediante el análisis de ANOVA ($P < 0.001$), para las pruebas de MTT ($F= 98.45$; $df= 4,10$; $P < 0.001$) y la prueba UFC ($F= 147.22$; $df= 3,8$; $P < 0.001$), excepto para la prueba de germinación, donde no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación de la viabilidad de los tratamientos de *B. bassiana* del producto final de la fermentación líquida con H₃BO₄

Tratamientos	% de Germinación± ES	UFC (x 10 ⁴) ± ES	MTT (Abs) ± ES
Control	-	-	0.047± 0.001 c
C1	3.33 ± 0.88 a	*1.33 ± 0.33 c	0.079± 0.002 b
C2	9.00 ± 1.15 a	1.20 ± 1.52 c	0.069± 0.005 b
C4	13.66 ± 4.63 a	3.40 ± 2.51 b	0.141± 0.004 a
C6	26.66 ± 9.27 a	7.86 ± 4.80 a	0.145± 0.006 a

¹UFC= Unidades formadoras de colonias; MTT= Absorbancia a 570 nm de la reacción de oxidación de sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT); ES =error estándar de la media. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias a *P* 0.05 basados en la prueba de *Post Hoc* Tukey HDS del análisis de varianza ANOVA (SPSS Statistics 17.0, 2007).

Los valores representan la media de tres repeticiones.

Los tratamientos C4 y C6, mostraron los valores significativamente mayores de viabilidad en las pruebas de UFC y MTT comparados frente a los tratamientos C2 y C1, mediante la prueba de Tukey (*P* 0.05). En la prueba de porcentaje de germinación, el tratamiento C6 mostró el mayor valor de viabilidad (7.86 x 10⁴), seguido del tratamiento C4 (3.40 x 10⁴), y por último los tratamientos C2 y C1 (1.20 x 10⁴ y 1.33 x 10³, respectivamente). Con la prueba de MTT se observó que los tratamientos C6 (0.145) y C4 (0.141), obtuvieron los valores más altos de viabilidad, no diferentes entre ellos, pero si frente a los tratamientos C2 (0.069) y C1 (0.079), quienes mostraron una viabilidad significativamente menor (*P* 0.05).

6.3.3 Evaluación del experimento con sobrenadante filtrado (SF) agregando H₃BO₄

6.3.3.1 Actividad insecticida (AI)

Los valores de porcentajes de mortalidad mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (C1, C2, C4 y C6) para las variables del insecto evaluadas mediante el análisis de ANOVA (*P* < 0.001), obteniéndose valores para ninfas tardías de *F*= 83.12; *df* = 4,10; *P* = 0.001, en hembras de *F* = 137.06; *df* = 4,10; *P* < 0.001 y en machos de *F*= 206.35 *df* =

4,10; $P < 0.001$. En general, las hembras fueron más susceptibles a los tratamientos probados, excepto para el tratamiento C2, donde la mortalidad causada fue mayor para insectos machos, determinado por la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos donde de manera descendente, con el siguiente orden: tratamiento C4, C6, C2 y por último el tratamiento C1, quien no fue diferente al control sin tratar (Fig. 18).

Específicamente, el aislamiento C4 fue significativamente el más alto de los cuatro tratamientos, mostrando valores de mortalidad de 63.33% para ninfas tardías, 75.65% para hembras y 67.74% para machos. El tratamiento C6 también mostró diferencia significativa comparado contra las cepas C2 y C1, donde las ninfas tardías obtuvieron el 46.66 % de mortalidad, las hembras 60.67 % y machos el 55.52 %; no obstante, el tratamiento C2 no fue diferente significativamente al tratamiento C1.

6.4 ACTIVIDAD INSECTICIDA ENTRE EXPERIMENTOS Y TRATAMIENTOS

En esta sección se muestran los resultados de la comparación general de la AI entre todos los experimentos (CA, CS+B y SF) y los tratamientos (C1, C2, C4 y C6), además del comparativo de los experimentos CS+B y SF de los mismos tratamientos al añadirle H_3BO_4 y analizados mediante ANOVA y *Post Hoc* Tukey. Se observó un patrón similar en la mortalidad (AI) entre los experimentos y tratamientos de *B. bassiana*, encontrándose diferencias significativas ($P < 0.001$), entre ninfas tardías ($F= 64.16$; $df 19,39$; $P < 0.001$), hembras ($F= 127.40$; $df 19,40$; $P < 0.001$) y machos ($F= 160.70$; $df 19,40$; $P < 0.001$). El análisis Tukey mostró que el experimento CS+B con H_3BO_4 , alcanzó los valores de mortalidad más altos, mientras que el experimento CA los más bajos (Tabla 9).

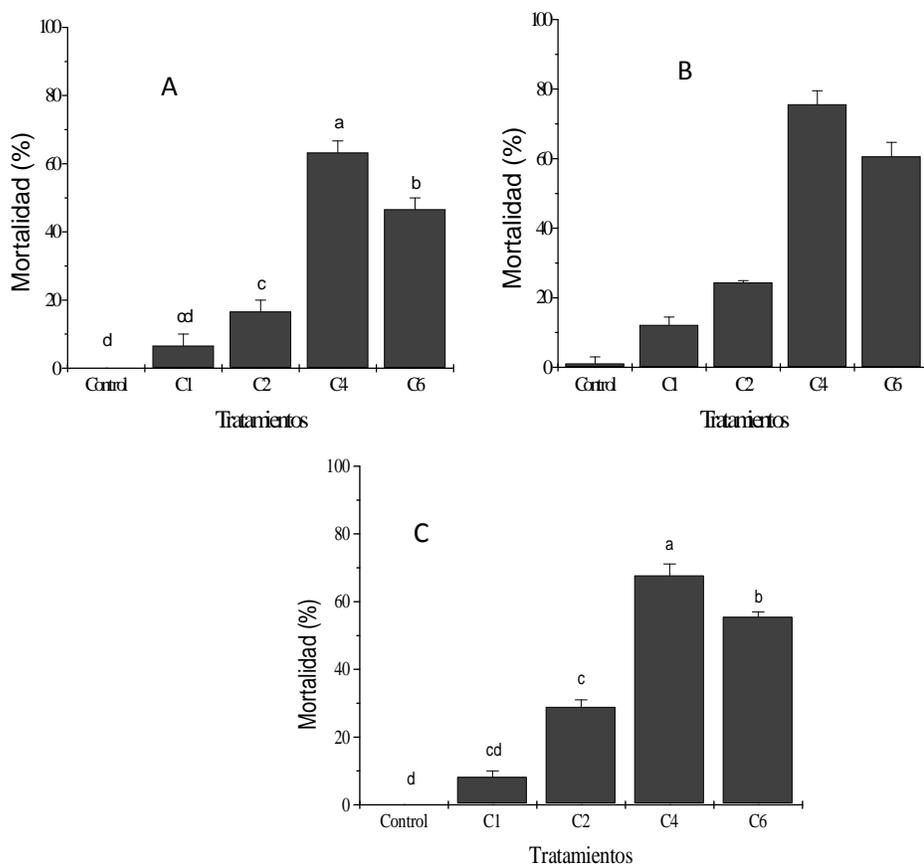


Fig.18. Mortalidad de *Periplaneta americana* expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* a partir del producto final de la fermentación líquida y posteriormente filtrados agregando H_3BO_4 . A) Mortalidad de ninfas tardías; B) Mortalidad de hembras; C) Mortalidad de machos. Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

Además se observó que las cucarachas de cualquiera de las tres variables evaluadas fueron poco susceptibles al tratamiento C1, independientemente del experimento realizado para la producción del entomopatógeno (CA, CS+B o SF).

6.4.1 Actividad insecticida entre experimentos/tratamientos con y sin H_3BO_4

Se realizó el análisis de la actividad insecticida con el fin de comparar la mortalidad (AI) de un mismo experimento/tratamiento con y sin adyuvante. Los resultados de los cuatro tratamientos de *B. bassiana* en *P. americana* en las fases de ninfas tardías y adultos (hembras y machos) se muestran en las figuras 18, 19 y 20.

Tabla 9. Matriz de diferencias en la actividad insecticida (% de mortalidad) de los experimentos de producción de *B. bassiana* por fermentación sólida (conidios aéreos, CA), o fermentación líquida (conidios sumergidos + blastosporas, CS+B), o 100 µL del sobrenadante filtrado (SF), sobre *Periplaneta americana* en fase de ninfas tardías, hembras y machos¹

Tukey <i>P</i> < 0.001	CA				CS+B								SF							
	0				0				H ₃ BO ₄				0				H ₃ BO ₄			
	C1	C2	C4	C6	C1	C2	C4	C6	C1	C2	C4	C6	C1	C2	C4	C6	C1	C2	C4	C6
Ninfas tardías																				
a																				
b																				
c																				
d																				
e																				
f																				
g																				
Hembras																				
a																				
b																				
c																				
d																				
e																				
f																				
g																				
h																				
i																				
Machos																				
a																				
b																				
c																				
d																				
e																				
f																				
g																				
h																				

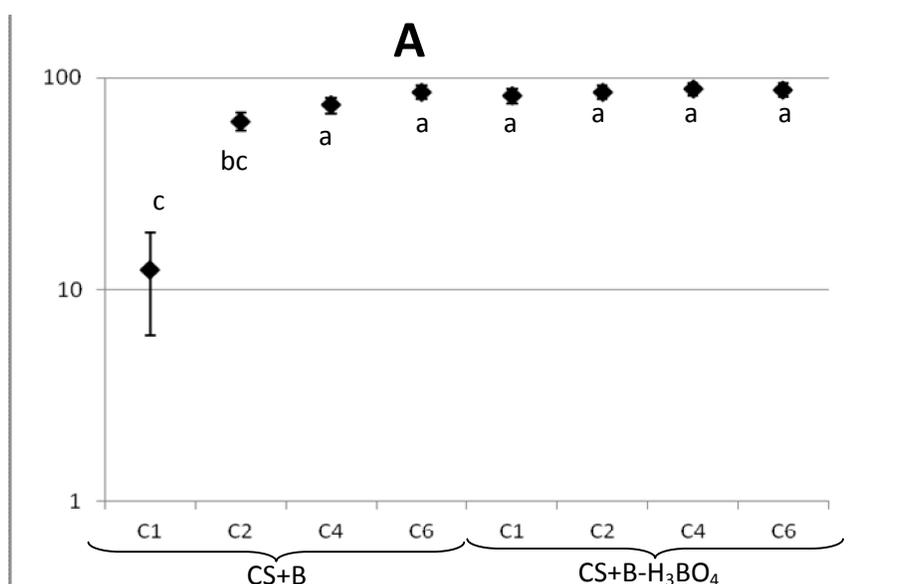
¹Las letras de la columna indican diferencias significativas entre las medias a *P* < 0.001 basados en la prueba de *Post Hoc* Tukey HDS del análisis de varianza ANOVA (SPSS Statistics 17.0, 2007). Los valores de las letras van de forma descendente, iniciando en ãö. Los recuadros en color gris indican el valor alcanzado de la media.

6.4.1.1 Actividad Insecticida contra Ninfas tardías

Al comparar el producto del experimento con CS+B del producto final de la fermentación líquida, no se encontraron diferencias significativas en la IA sobre ninfas tardías entre los tratamientos C4 y C6, al añadirle H_3BO_4 . Sin embargo, para los tratamientos C1 y C2 se incrementó la mortalidad en un 75 y 17%, respectivamente, al añadirle el químico inorgánico durante la fermentación (Fig.19A). En cambio, con el experimento SF, no se observó un incremento de mortalidad entre los mismos tratamientos, al añadirle el adyuvante (Fig.19B).

6.4.1.2 Actividad Insecticida contra Hembras

La diferencia en mortalidad (AI) de los tratamientos del experimento con CS+B mostró el mismo patrón observado por ninfas tardías, donde sólo los tratamientos C1 y C2 mostraron diferencias significativas, incrementando un 87.88 y 63.77% su mortalidad al añadir H_3BO_4 (Fig. 20A). Por el contrario, al agregar el adyuvante en el experimento SF el incremento de la mortalidad se presentó en los tratamientos C4 (26.66%) y C6 (19.87%), pero sólo el C4 fue significativamente mayor (Fig. 20B).



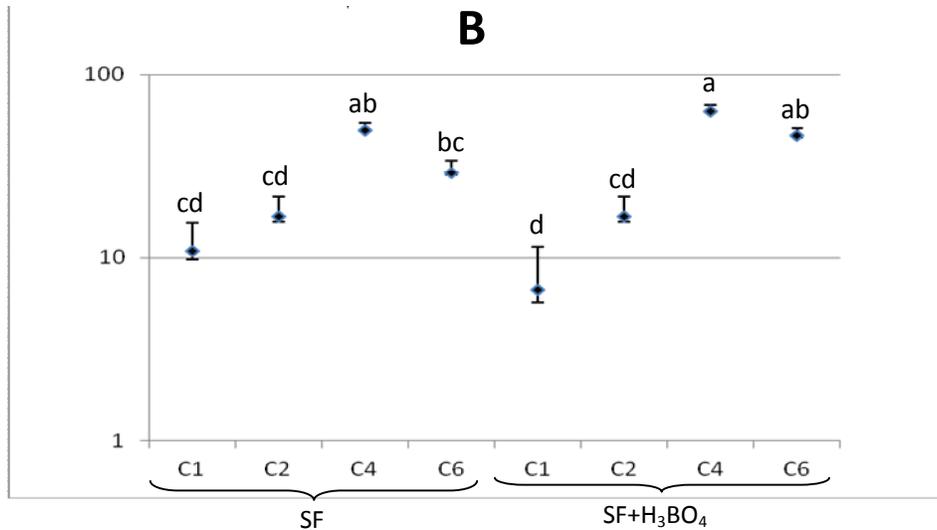


Fig.19. Mortalidad de *Periplaneta americana* en fase de ninfas tardías expuestas a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana*. A) Mortalidad por conidios sumergidos + blastosporas (CS+B); B) Mortalidad por sobrenadante filtrado (SF). Los puntos que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basado en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

6.4.1.3 Actividad Insecticida contra Adultos machos

Los tratamientoss C1, C2 y C6 de los tratamientos CS+B, incrementaron significativamente su AI sobre los adultos machos, al usar el químico inorgánico como adyuvante (86.93, 64.98 y 15.11%, respectivamente) (Fig. 21A), mientras que en el tratamiento SF, sólo el tratamiento C4 fue diferente significativamente, en un 17.74 % más, al añadirle H₃BO₄ (Fig. 21B).

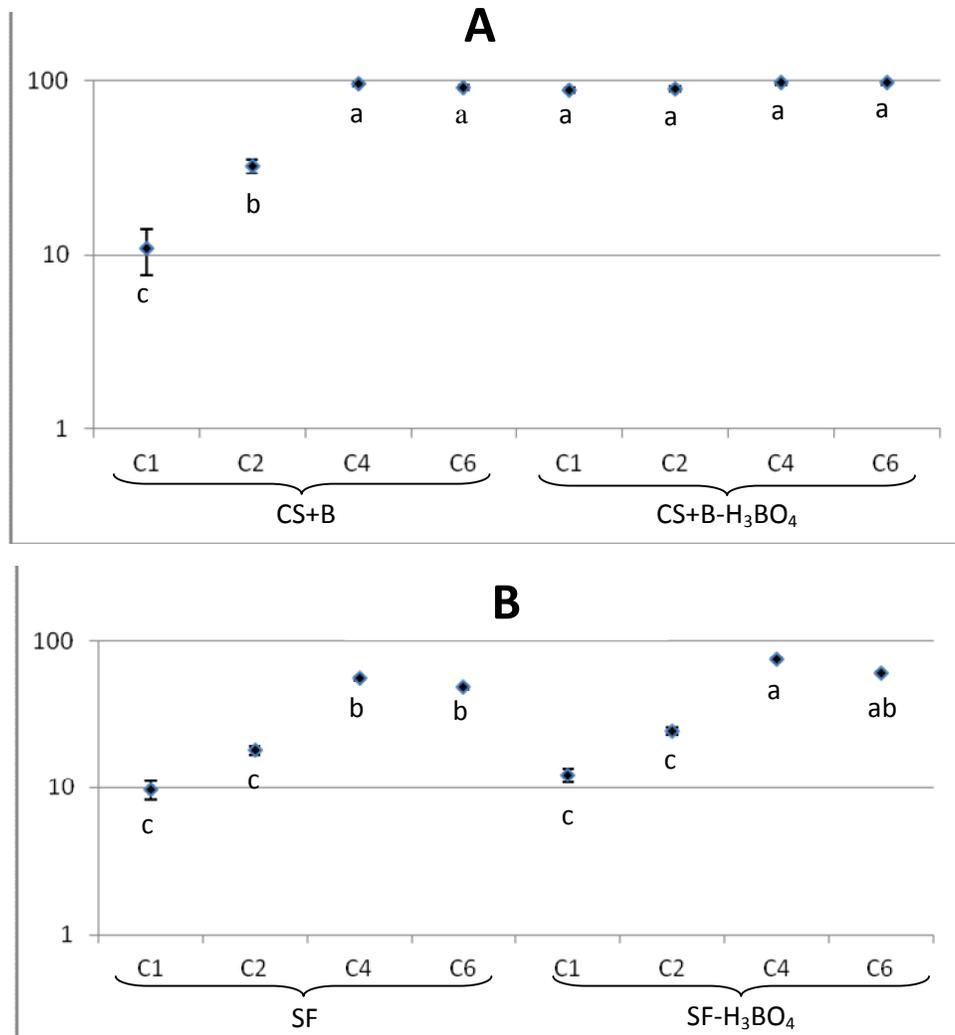


Fig. 20. Mortalidad de *Periplaneta americana* en fase de adultos hembras expuestas a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana*. A) Mortalidad por conidios sumergidos + blastosporas (CS+B); B) Mortalidad por sobrenadante filtrado (SF). Los puntos con diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basado en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

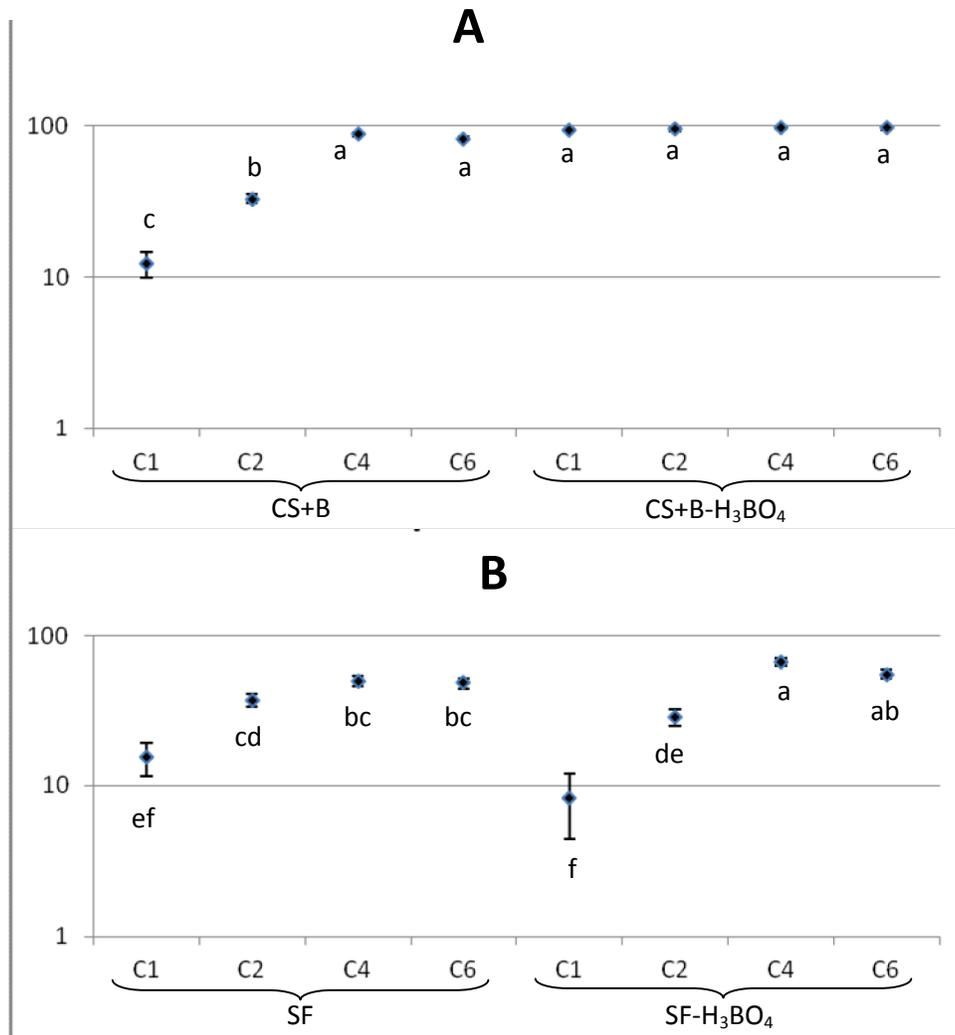


Fig. 21. Mortalidad de *Periplaneta americana* en fase de adultos machos expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana*. A) Mortalidad por conidios sumergidos + blastosporas; B) Mortalidad por sobrenadante filtrado. Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

6.5 TIPIFICACIÓN MOLECULAR

Para el análisis molecular se utilizaron los cuatro tratamientos con mayor actividad insecticida sobre *P. americana*. Se analizó la diversidad genética de las cepas C1 y C2, y los aislamientos C4 y C6 de *B. bassiana* mediante las técnicas moleculares de RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) y análisis de los espaciadores internos transcritos (ITS) mediante PCR-RFLP, así como, la secuenciación a partir del ADN mitocondrial.

6.5.1 Extracción de ADN total y mitocondrial (ADNmt)

Se extrajo el ADN total de los cuatro aislamientos mediante la técnica de purificación salina-cloroformo. Así mismo, mediante la técnica de fenol-cloroformo-álcool isoamílico se extrajo el ADNmt. Posteriormente, se cuantificó el ADN obteniéndose un rendimiento por arriba de 50 g/mL. El ADN de los tratamientos se ajustó a 20 g/μL para su análisis.

6.5.2 Variabilidad de los tratamientos de *Beauveria bassiana* mediante RAPD

Durante el análisis RAPD se usaron 17 cebadores de la serie OP-A, OP-B, OP-AB y OP-D. Un patrón típico de la técnica RAPD fue observado, donde los fragmentos amplificados oscilaron entre 200-2000pb (Fig. 22). La amplificación de los tratamientos mostró que entre las cepas y aislamientos hubo variaciones en el patrón de bandas, donde dominó la presencia de bandas polimórficas (Tabla 10).

La cantidad de bandas producidas por los iniciadores fueron 165, de las cuales 137 fueron polimórficas y 28 monomórficas. La mayoría de los cebadores usados fueron altamente informativos, presentando porcentajes de polimorfismos por arriba del 70%, con excepción de los OPA 11, OPA 14 y OPAB 11 cuyos valores fueron de 42.9, 55.6 y 54.5 %, respectivamente (Tabla 10).

En general, mediante el análisis del coeficiente de Jaccard y el dendograma (UPGMA), se observó agrupamiento entre los aislamientos de *B. bassiana* después del análisis RAPD. El dendograma generado por los datos del RAPD permitió la formación de 2 grupos entre los aislamientos: C1-C2 y C4-C6 (Fig. 23). Los resultados de la matriz de distancias entre los *clusters* mostraron 3 estados de fusión dentro del dendograma. El estado 1, dado entre los aislamientos C4 y C6, denota una mayor similitud con un valor de 0.679 comparado con el estado 2 que indica la fusión de los tratamientos C1 y C2, y el estado 3, correspondiente a la unión de los tratamientos C1 y C4, que obtuvieron valores de 0.439 y 0.326, respectivamente (Tabla 11).

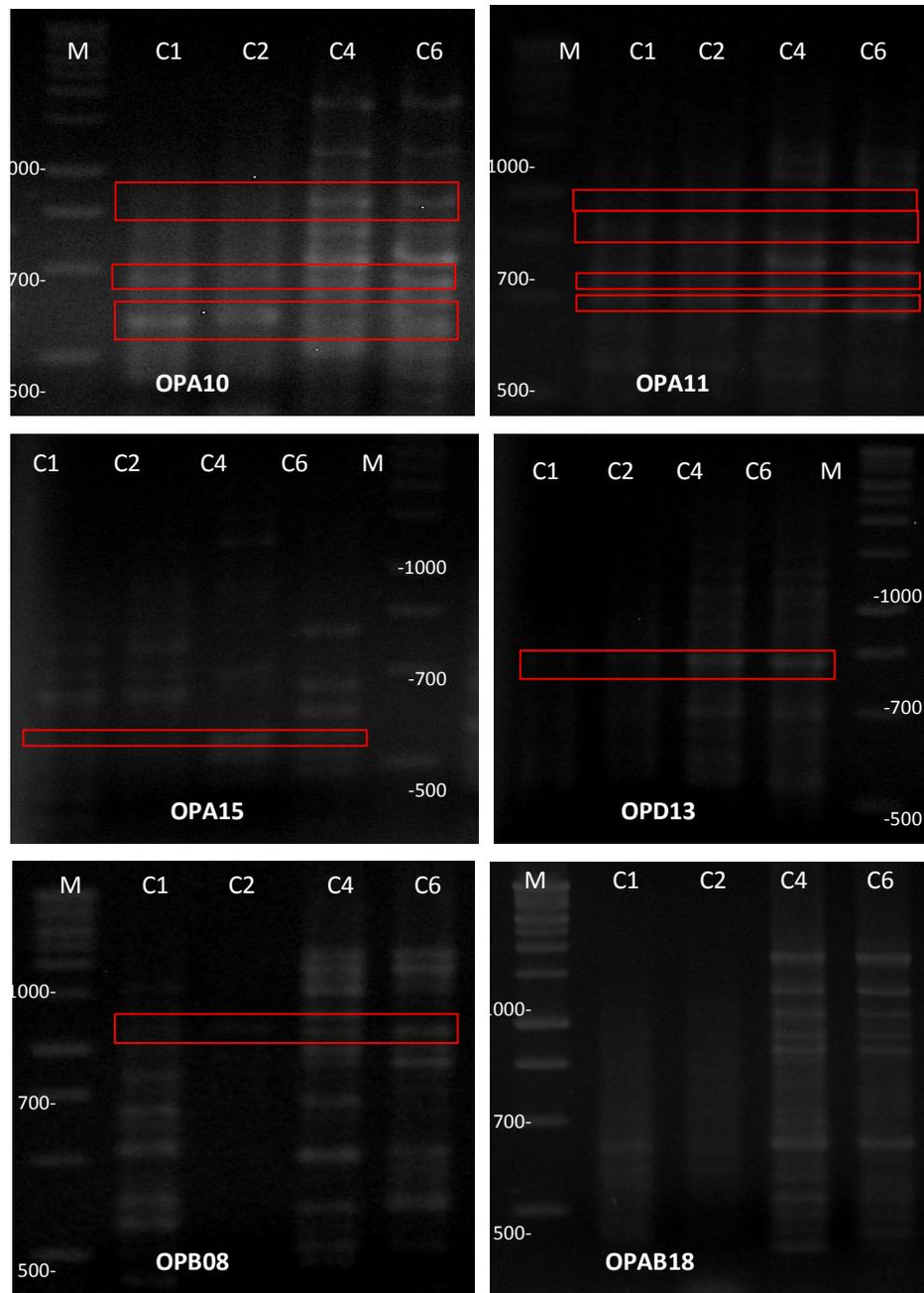


Fig. 22. Productos de amplificación de ADN usando los cebadores OP de la serie A (10,11 Y 15), B (08), AB (18) y D (13), separados por electroforesis en agarosa al 1.4% y teñido con bromuro de etidio. Las líneas corresponden a: M = marcador de peso molecular de 1kb; C1 y C2 a las cepas y C4 y C6 a los aislamientos de *B. bassiana*. Bandas en recuadro rojo, indica la presencia de bandas monomórficas.

Tabla 10. Secuencias de los cebadores utilizados en el análisis RAPD, número total de bandas generadas (monomórficas y polimórficas) y el porcentaje de polimorfismo obtenido para cada iniciador.

Partidor	Secuencia 5' ► 3'	Bandas			% de polimorfismo
		Totales	Monomórficas	Polimórficas	
OPA03	AGTCAGCCAG	8	0	8	100
OPA04	AATCGGGCTG	8	1	7	87.5
OPA10	GTGATCGCAG	11	3	8	72.7
OPA11	CAATCGCCGT	7	4	3	42.9
OPA13	CAGCACCCAC	10	1	9	90.0
OPA14	TCTGTGCTGG	9	4	5	55.6
OPA15	TTCCGAACCC	13	1	12	92.3
OPB02	TGATCCCTGG	15	1	14	93.3
OPB08	GTCCACACGG	8	1	7	87.5
OPB09	TGGGGGACTC	14	0	14	100
OPAB06	GTGGCTTGA	11	0	11	100
OPAB09	GGGCGACTAC	10	2	8	80.0
OPAB11	GTGCGCAATG	11	5	6	54.5
OPAB18	CTGGCGTGTC	8	1	7	87.5
OPD03	GTCGCCGTCA	8	2	6	75.0
OPD13	GGGGTGACGA	8	2	6	75.0
OPD18	GAGAGCCAAC	6	0	6	100
Total		165	28	137	82.0

De igual forma, el análisis de Jaccard mostró una similitud entre las cepas C1-C2 y entre los aislamientos C4-C6. Se observó que entre las cepas C1 y C2 hubo un 43.4% de similitud, mientras que entre los aislamientos C6 y C4 el valor de similitud fue del 67.9 %. Al comparar la similitud entre la cepa C1 con los aislamientos C4 (42.0%) y C6 (41.9%), se observó una mayor relación a la observada con la cepa C2; no obstante, su similitud con los aislamientos C4 y C6 fue del 22.9 y 23.5%, respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Matriz de distancias derivado del análisis RAPD de los aislamientos de *B. bassiana* obtenida del método Jaccard y UPGMA¹

Porcentaje de similaridad de Jaccard				Conglomeración: UPGMA			
C1	C2	C4	C6	Estado	Cluster 1	Cluster 2	Coefficiente
C1	43.4	42.0	41.9	1	C4	C6	0.679
C2		22.9	23.5	2	C1	C2	0.434
C4			67.9	3	C1	C4	0.326

¹El estado de fusión se indica en el dendograma con la misma nomenclatura de números arábigos (1,2 y 3). C1, C2, C4 y C6= aislamientos de *B. bassiana*
 UPGMA= método de agrupamiento no ponderado para grupos pares (por sus siglas en inglés).

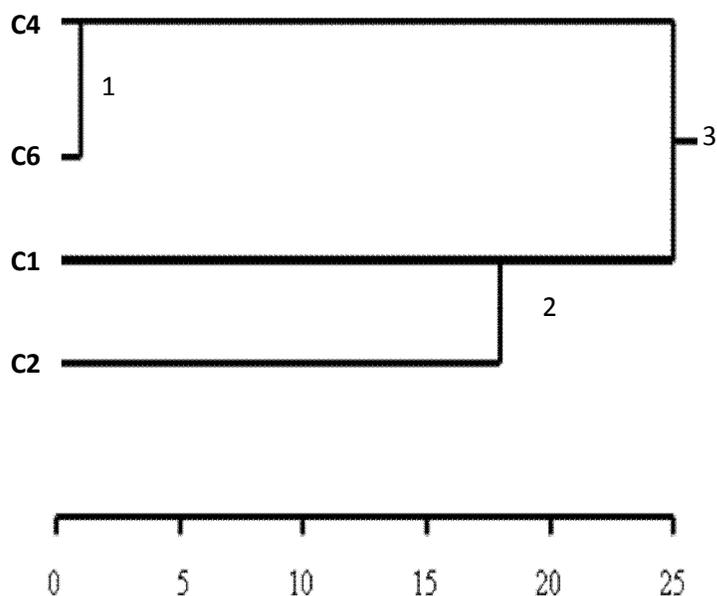


Fig. 23. Dendograma derivado del análisis RAPD de los aislamientos de *B. bassiana*. La distancia genética se obtuvo usando el método *Cluster*: UPGMA. Las cepas de *B. bassiana* se indican como C1 y C2, y los aislamientos como C4 y C6. Los números arábigos 1, 2 y 3 indican los estados de fusión entre ellos.

6.5.3 Variabilidad entre cepas/aislamientos de *Beauveria bassiana* mediante el análisis de espaciadores internos transcritos (ITS)

6.5.3.1 Amplificación de la región ITS

A partir del ADN total se amplificó la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) de los genes rRNA con los iniciadores universales ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990). La amplificación de las regiones ITS de los aislamientos de *B. bassiana* resultaron en productos de 600 pb (Fig. 24).

6.5.4 Secuenciación de la región de DNA-ITS

Se realizó la secuenciación de la región de ADN-ITS (600 pb) y del ADNmt, de los tratamientos de *B. bassiana*. Los resultados de la secuenciación de la región ITS de los tratamientos C1 y C4 mostraron una diferencia del 7% de los 786 nucleótidos secuenciados.

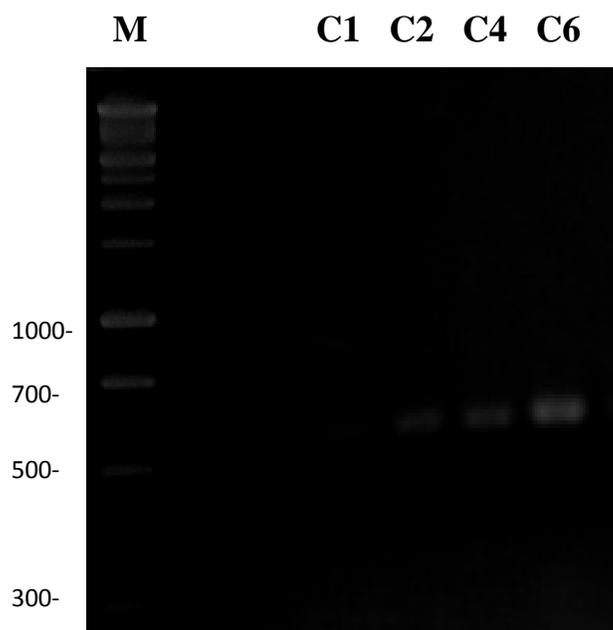


Fig. 24. Productos de amplificación de ADN-ITS de los aislamientos de *B. bassiana*, separados por electroforesis en agarosa al 1.4% y teñido con bromuro de etidio. Las líneas corresponden a: M = marcador de peso molecular 1kb; C1, C2, C4 y C6 = aislamientos de *B. bassiana*.

6.6 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DEL INSECTO

6.6.1 Actividad innata de fenoloxidasa (PO) en *Periplaneta americana*

La evaluación de la actividad innata de fenoloxidasa (PO) (formación de dopacromodol detectada a 490 nm de absorbancia) durante el desarrollo de *P. americana* se muestra en la Fig. 25. El análisis de ANOVA mostró diferencias significativas en la actividad de PO a través de las etapas de ninfas tempranas, medias y tardías, así como entre hembras y machos ($F= 132.49$; $df = 5,12$; $P < 0.001$) (Tabla 12).

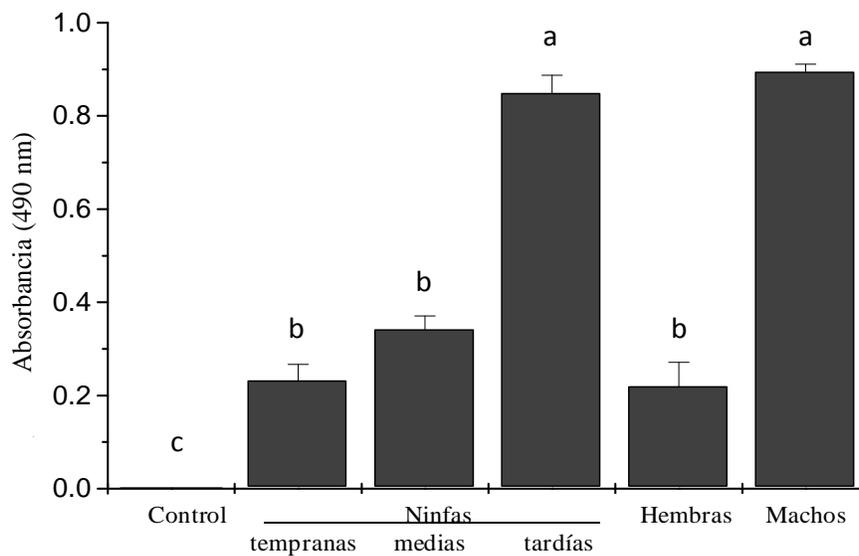


Fig. 25. Actividad fenoloxidasa (PO) innata en *Periplaneta americana* en estados ninfales y adultos (hembras y machos). Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

Las ninfas en etapa temprana obtuvieron los valores más bajos de actividad de PO (0.232), y los adultos machos mostraron los valores más altos (0.889). Se observó que la actividad de PO en hembras fue la más baja (0.218) pero similar a las ninfas en etapa temprana, mientras que las ninfas en etapa tardía fue comparable a los machos (0.849) (Tabla 12). En base a los resultados de actividad innata mediada por actividad PO en *P. americana*, se seleccionaron las etapas de ninfas tardías, hembras y machos con el fin de

comparar diferencias observadas en la actividad insecticida de *B. bassiana* a distintos tratamientos y experimentos, y su correlación con la respuesta inmune del insecto medida como actividad PO.

Se usó PBSt como control en todas la pruebas de actividad PO, el cual fue el vehículo utilizado con todos los tratamientos de *B. bassiana* (conidios, fermentado y filtrados). La absorbancia obtenida del PBSt mostró el valor más bajo (0.02) frente a todos los valores obtenidos en las pruebas de actividad PO en insectos tratados y sin tratar.

Tabla 12. Actividad fenoloxidasa (PO) innata (formación de dopacromo-DO detectada a una longitud de onda de 490 nm) en ninfas, hembras y machos de *Periplaneta americana*.

Actividad de fenoloxidasa DO (490 nm)	
Tratamientos	Mortalidad (%) \pm error estándar
PBS-t	0.020 \pm 0.000 c
Ninfas tempranas	0.232 \pm 0.054 b
Ninfas medias	0.342 \pm 0.038 b
Ninfas tardías	0.849 \pm 0.022 a
Hembras	0.218 \pm 0.029 b
Machos	0.889 \pm 0.011 a

¹Diferentes letras de los valores de las medias indican diferencias significativas a nivel de $P \leq 0.05$, basados en ANOVA, a partir de *Post Hoc* de la prueba comparación múltiple de Tukey HDS (SPSS Statistics 17.0). Los valores de mortalidad representan la media de tres repeticiones.

6.6.2 Actividad fenoloxidasa (PO) de *P. americana* expuesta a *Beauveria bassiana*

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad fenoloxidasa (PO) durante las distintas etapas del desarrollo de *P. americana* (ninfas tardías, hembras y machos) después de ser inoculado con los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *B. bassiana*.

6.6.2.1 Actividad fenoloxidasa de ninfas tardías

En ninfas tardías los resultados mostraron diferencias entre los tratamientos, mediante el ANOVA, en los diferentes tratamientos: CA ($F= 302.07$; $df 5,12$; $P <0.001$), CS+B ($F= 88.19$; $df 5,12$; $P <0.001$) o SF ($F= 51.36$; $df 5,12$; $P <0.001$). Las ninfas expuestas al tratamiento CS+B no mostraron diferencias en la actividad PO entre los tratamientos probados. Sin embargo, la actividad PO fue menor significativamente comparada con el control no expuesto (0.849). En general, la actividad PO en ninfas tratadas con CA fue más alta (Fig. 26A), comparada con los insectos tratados con el tratamiento SF (Fig. 26C).

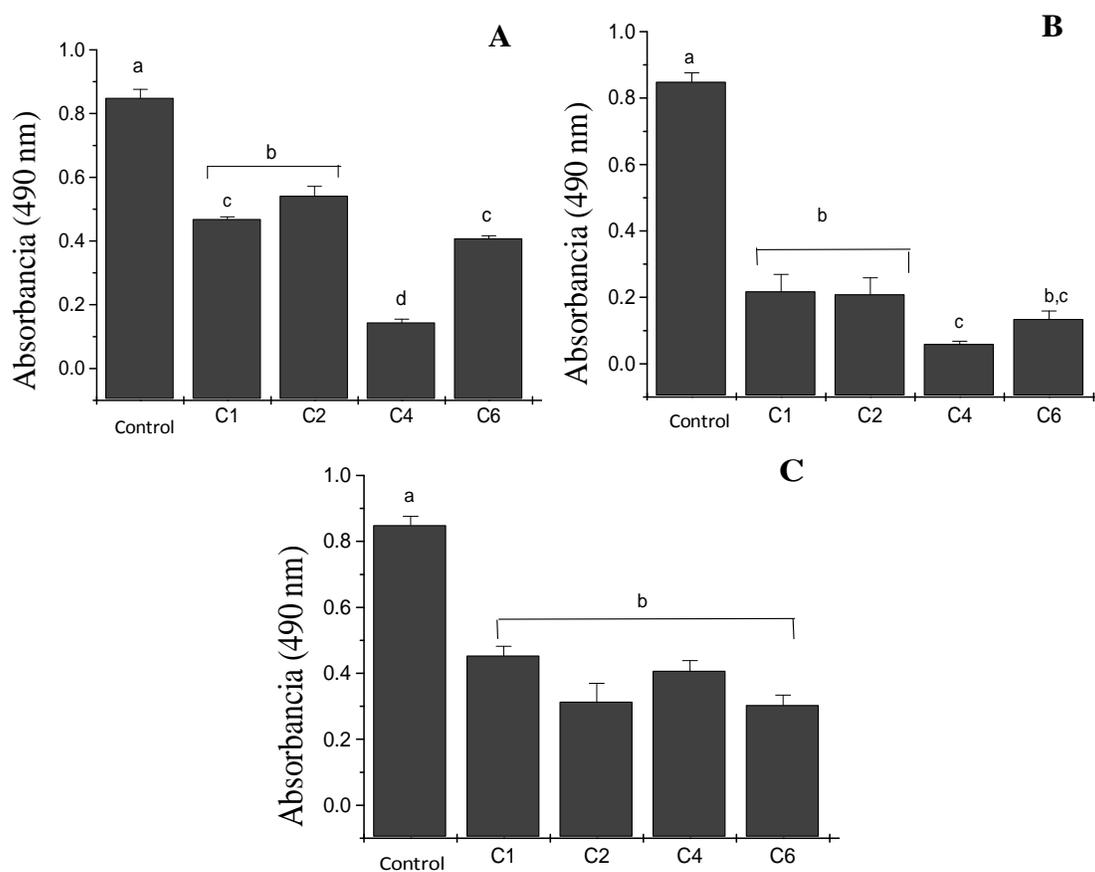


Fig. 26. Actividad fenoloxidasa (PO) en ninfas tardías de *Periplaneta americana* expuestas a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana*. A) Actividad PO después de exponer a conidios aéreas; B) Actividad PO después de exponer a conidios sumergidos+blastosporas; C) Actividad PO después de exponer a sobrenadante filtrado. Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

Los experimentos CA y SF expresaron menor actividad PO en ninfas expuestas al tratamiento C4, mostrando valores de absorbancia de 0.144 y 0.059, respectivamente (Tabla 13). Con el mismo experimento, el tratamiento C6 siguió en escala ascendente en cuanto a valor de absorbancia (0.408 y 0.135, respectivamente), siendo significativamente diferente sólo al tratamiento C4 en el experimento CA (Tukey $P < 0.001$).

6.6.2.2 Actividad fenoloxidasa de hembras

La evaluación de las hembras de *P. americana* mostró diferencias mediante ANOVA entre los tratamientos en los diferentes experimentos con CA ($F= 71.00$; $df 5,12$; $P < 0.001$), CS+B ($F= 13.92$; $df 5,12$; $P < 0.001$) y SF ($F= 73.46$; $df 5,12$; $P < 0.001$). En general, el experimento con CS+B indujo los niveles más bajos de actividad PO en hembras tratadas con C1 (0.211), C4 (0.096) y C6 (0.064), excepto con C2 (0.183), quien fue mayor a los insectos tratados con el experimento SF (C2=0.160) (Tabla 13).

Las hembras tratadas con C1 del experimento CA, mostraron el más alto nivel de actividad PO (0.634) en comparación a todos los experimentos y tratamientos probados en esta variable (Fig. 27).

Al medir la actividad PO en los insectos machos, se encontró diferencia entre los tratamientos de los experimentos CA ($F= 287.58$; $df 5,12$; $P < 0.001$), CS+B ($F= 954.29$; $df 5,12$; $P < 0.001$) y SF ($F= 269.87$; $df 5,12$; $P < 0.001$) mediante ANOVA. En general, el SF de todos los tratamientos produjeron los niveles más altos de PO. Así mismo, las CA del tratamiento C1 (0.673) indujeron una mayor actividad PO, similar al SF del tratamiento C1 (0.664) (Tabla 13).

6.6.2.3 Machos

Ambos valores de actividad PO alcanzados con el tratamiento C1 por los experimentos CA y SF, mostraron los valores más altos en comparación con todos los demás tratamientos en los 3 diferentes experimentos probados, mientras que el experimento CS+B mostró la menor actividad PO con los tratamientos C4 (0.045) y C6 (0.043), comparada con todos los experimentos y tratamientos con los que fueron tratados los machos (Fig. 28).

Tabla 13. Actividad insecticida de los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana* expuestos a 1×10^6 conidios/mL producidos por fermentación sólida (conidios aéreos, CA), o fermentación líquida (conidio + blastosporas sumergidas, CS+B), ó 100 μ L de sobrenadante filtrado (SF), contra ninfas tardías, hembras y machos de *Periplaneta americana* y su correlación con la actividad fenoloxidasas.¹

Insectos y <i>B. bassiana</i>	Tratamientos		
	CA	CS+B	SF
Ninfas	PO\pm SEM	PO\pm SEM	PO\pm SEM
Control	0.849 \pm 0.027a	0.849 \pm 0.027 a	0.849 \pm 0.027 a
C1	0.469 \pm 0.007bc	0.218 \pm 0.050 b	0.454 \pm 0.027 b
C2	0.542 \pm 0.029 b	0.209 \pm 0.050 b	0.314 \pm 0.056 b
C4	0.144 \pm 0.011 d	0.059 \pm 0.008 c	0.408 \pm 0.031 b
C6	0.408 \pm 0.008 c	0.135 \pm 0.024 bc	0.303 \pm 0.030 b
Hembras			
Control	0.218 \pm 0.029 c	0.218 \pm 0.029 a	0.218 \pm 0.029 bc
C1	0.634 \pm 0.045 a	0.211 \pm 0.007 ab	0.254 \pm 0.008 b
C2	0.274 \pm 0.022 c	0.183 \pm 0.040 bc	0.160 \pm 0.019 c
C4	0.411 \pm 0.018 b	0.096 \pm 0.023 b	0.435 \pm 0.013 a
C6	0.212 \pm 0.003 c	0.064 \pm 0.005 c	0.243 \pm 0.007 b
Machos			
Control	0.889 \pm 0.011 a	0.889 \pm 0.011 a	0.889 \pm 0.011 a
C1	0.673 \pm 0.038 b	0.126 \pm 0.003 b	0.664 \pm 0.034 b
C2	0.132 \pm 0.015 c	0.164 \pm 0.023 b	0.167 \pm 0.013 d
C4	0.196 \pm 0.023 c	0.045 \pm 0.001 c	0.573 \pm 0.021 b
C6	0.209 \pm 0.010 c	0.043 \pm 0.003 c	0.391 \pm 0.019 c

¹PO= formación de dopacromo-DO detectada a una longitud de onda de 490 nm. Diferentes letras en las columnas de los valores de las medias indican diferencias significativas a nivel de $P\bar{O}$ 0.05, basados en ANOVA, a partir del *Post Hoc* de la prueba comparación múltiple de Tukey HDS (SPSS Statistics 17.0).

Los valores de mortalidad representan la media de tres repeticiones.

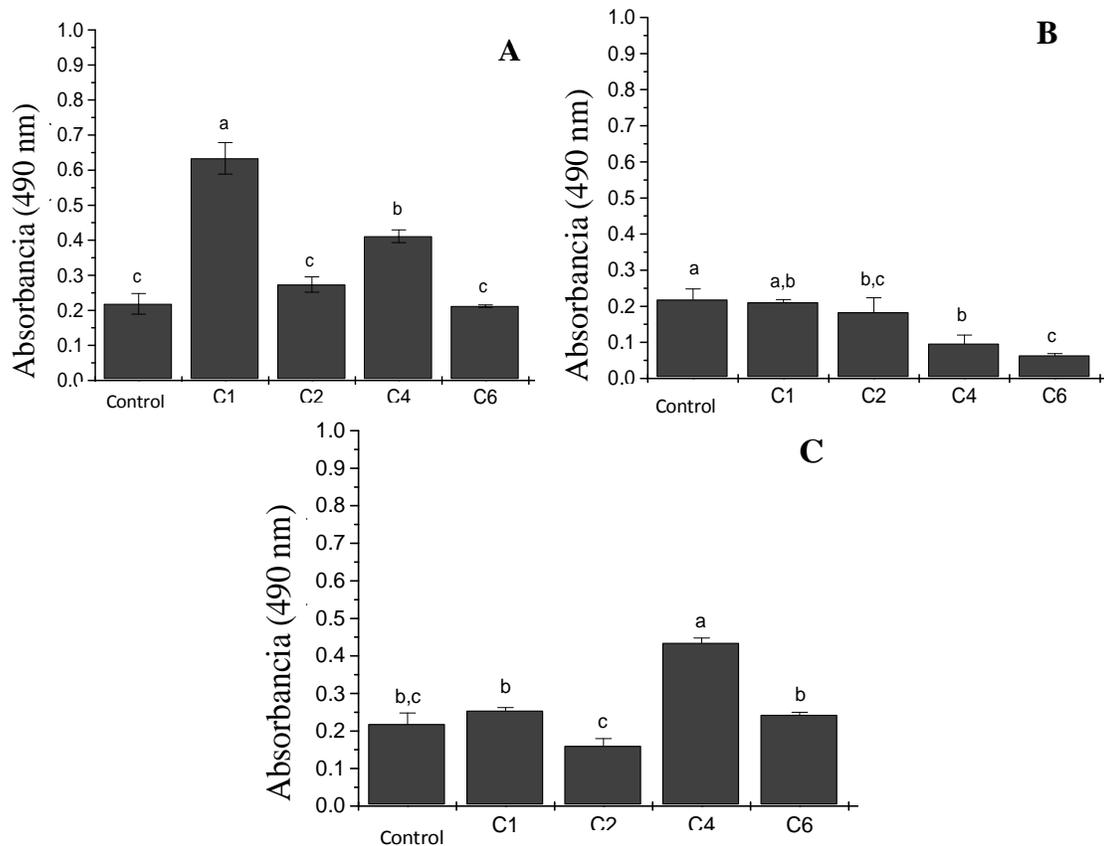


Fig. 27. Actividad fenoloxidasa (PO) en hembras de *Periplaneta americana* expuestas a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana*. A) Actividad PO después de exponer a conidios aéreas; B) Actividad PO después de exponer a conidios sumergidos+blastosporas; C) Actividad PO después de exponer al sobrenadante filtrado. Las columnas que muestran diferentes letras en las figuras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HSD (SPSS 17.0).

6.7 CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE *B. bassiana* Y LA ACTIVIDAD FENOLOXIDASA DE *P. americana*

Los análisis de correlación entre la actividad PO de *P. americana* contra la AI de *B. bassiana* revelaron una asociación significativa entre ambas, en base a la prueba de correlación de Pearson. En esta evaluación se obtuvieron correlaciones positivas y negativas. La correlación entre la actividad insecticida de *B. bassiana* y actividad PO de las cucarachas expuestas al experimento CS+B mostraron una correlación negativa para todos los grupos, donde las ninfas en fase tardía y los machos obtuvieron valor significativos a nivel de $P < 0.05$, con valores de correlación mayores a 0.65 en el coeficiente de determinación (R^2), que representa el porcentaje de compatibilidad. La correlación entre la

actividad insecticida y PO mostraron patrones similares en los experimentos CA y SF, observándose una correlación negativa para ninfas tardías y machos; mientras que las hembras obtuvieron valores negativos tan bajos como 0.20 y no significantes. El valor de R^2 observado en el análisis, reveló valores tan altos como 0.605, en ninfas tardías expuestas a CS+B; y tan bajos como 0.020, en las hembras expuestas a CA.

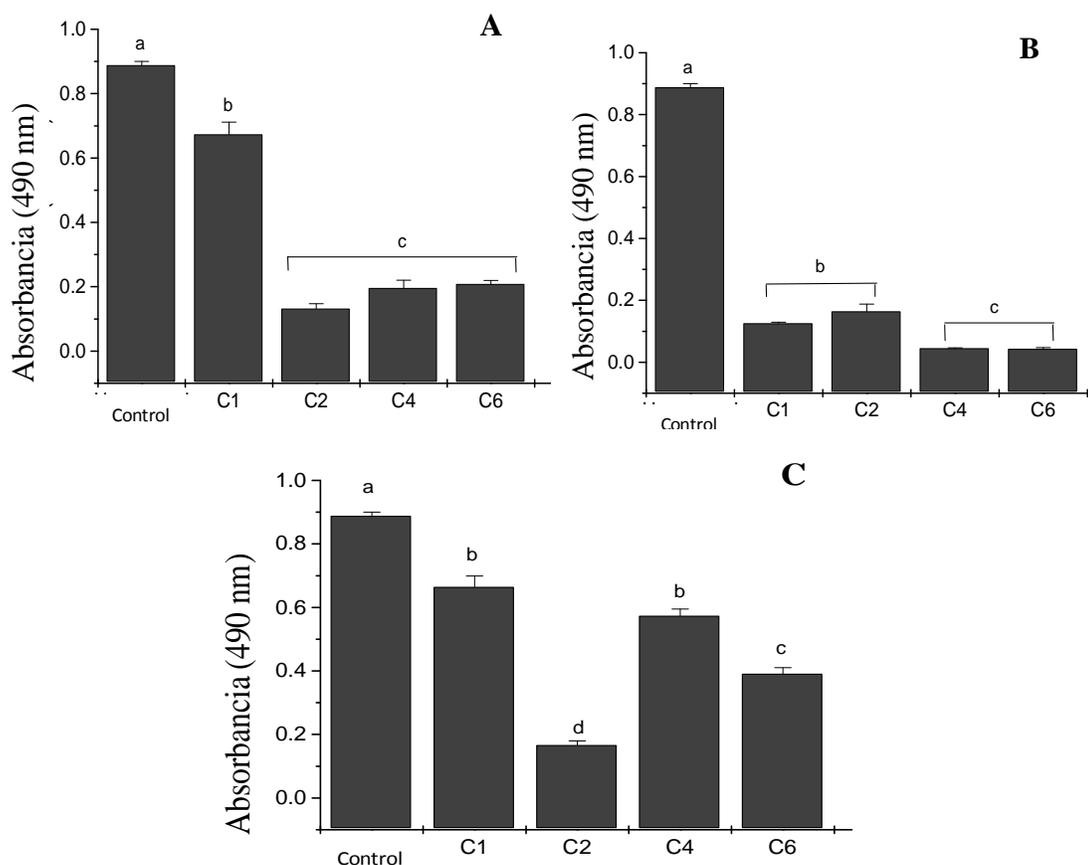


Fig. 28. Actividad fenoloxidasas (PO) en machos de *Periplaneta americana* expuestos a los tratamientos C1, C2, C4 y C6 de *Beauveria bassiana*. A) Actividad de PO después de exponer a conidios aéreas; B) Actividad de PO después de exponer a conidios sumergidos+blastosporas; C) Actividad de PO después de exponerlos a sobrenadante filtrado. Las columnas que muestran diferentes letras indican diferencias significativas, basados en la prueba Tukey HDS (SPSS 17.0).

La correlación de la actividad insecticida de los cuatro tratamientos de *B. bassiana* y la actividad PO en *P. americana* en las fases de ninfas tardías y adultos (hembras y machos) se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Correlación de la actividad insecticida de los experimentos de producción de *Beauveria bassiana* y la actividad fenoloxidasa en *Periplaneta americana* en ninfas tardías, hembras y machos¹

Insectos	Tratamientos					
	Conidios aéreos		Conidios sumergidos y blastosporas		Sobrenadante filtrado	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Ninfas tardías	-0.601	0.023	-0.778	0.008	-0.378	0.202
Hembras	0.142	0.615	-0.513	0.107	0.172	0.557
Machos	-0.619	0.014	-0.660	0.007	-0.680	0.005

r = Coeficiente de correlación de Pearson entre AI y PO; *P* = valor de significancia de la correlación (prueba de 2-colas).

6.7.1 Correlación en ninfas tardías

La correlación entre la actividad insecticida y la actividad PO en ninfas tardías mostró ser negativa para los experimentos de CA ($r = -0.601$; $P = 0.023$) y SC+B ($r = -0.778$; $P = 0.008$). El coeficiente de determinación (R^2) entre la actividad insecticida y actividad PO fue más alto para el experimento con CS+B (0.605), mientras que fue más bajo para el experimento con SF (0.310).

6.7.2 Correlación en hembras

Los resultados del análisis de correlación y el coeficiente de determinación entre la actividad insecticida y la actividad PO en hembras no mostraron diferencias significativas (Tabla 14). Sin embargo, cabe destacar que los valores calculados fueron más bajos

comparados con las etapas de ninfas tardías y machos, mostrando el valor más alto con el experimento CS+B (0.263) y el más bajo con CA (0.020).

6.7.3 Correlación en machos

El análisis de la correlación entre la actividad insecticida y la actividad PO fue significativo, mostrando valores negativos y mayores a 0.60 para todos los tratamientos (Tabla 14). El valor de R^2 fue más alto para el experimento SF (0.462) y el más bajo para el CA (0.383).

DISCUSIÓN

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* es usado ampliamente dentro del control biológico. Es considerado como enemigo natural de insectos de plagas agrícolas (Meyling y Eilenberg, 2007). Este entomopatógeno, no sólo es efectivo sobre plagas de importancia agrícola, sino que su amplio espectro lo hace una herramienta útil en el control de plagas urbanas, ya sea aplicando la forma infectiva (conidios) o subproductos de la fermentación (metabolitos secundarios). Dentro de la plagas urbanas que se han reportado que son susceptibles a *B. bassiana* se encuentran moscas (*Musca domestica* L.), termitas (*Coptotermes formosanus*, Shiraki), garrapatas (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Canestrini; *Amblyomma americanum* L.), escarabajos (*Tribolium castaneum*, Herbst *Sitophilus oryzae* L. y *Acanthoscelides obtectus*, Say), mosquitos (*Anopheles gambiae* Giles), arañas (*Tetranychus cinnabarinus* (Boisd.) Acari: Tetranychidae) y cucarachas (*B. germanica* y *P. americana*) (Howard *et al.*, 2011; Kirkland *et al.*, 2005; Lecuona *et al.*, 2005; Mnyone *et al.*, 2011; Murali *et al.*, 1999; Padín *et al.*, 2002; Posadas y Leucona, 2009; Wei-Bing y Ming-Guang, 2004; Wright *et al.*, 2002). Sin embargo, dentro de este grupo de insectos que son considerados plagas urbanas, los insectos vectores de patógenos hacia el hombre toman una especial importancia. Las cucarachas son consideradas como los principales transmisores mecánicos de microorganismos patógenos causantes de enfermedades disentéricas (Pai *et al.*, 2004; Graczyk *et al.*, 2005). Aunque el control químico ofrece una de las primeras alternativas de control en este tipo de insectos, el uso del control biológico ofrece una alternativa más amigable con el ambiente. No obstante, las cucarachas tienen una rápida respuesta a la influencia de insecticidas químicos, dada como aparición de resistencia al ingrediente activo, así como a la invasión de patógenos, mostrando una respuesta inmune bien desarrollada. Una solución dentro del control biológico, sería la búsqueda de aislamientos nativos de *B. bassiana* para el control de plagas de interés urbano, como lo es la cucaracha *P. americana*. En este rubro, es importante no solamente seleccionar aislamientos efectivos, sino encontrar la forma de potenciar dicha actividad insecticida, así como determinar la interacción patógeno-huésped (respuesta inmune del insecto) que nos pudiera dar las bases para el modo, tipo y tiempo de aplicación

sobre el insecto. Por esto, en el presente estudio se evaluó la actividad insecticida de dos cepas de *B. bassiana* (C1 y C2), con efectividad conocida sobre órdenes de lepidópteros y coleópteros, así como cuatro aislamientos (C3, C4, C5 y C6) nativos obtenidos de cucarachas infectadas con este hongo. Nosotros nos planteamos la hipótesis de que las diferencias de la actividad insecticida entre cepas y aislamientos de *B. bassiana* contra *P. americana* se debían tanto a factores intrínsecos (variabilidad genética y producción de toxinas bajo diferentes condiciones de crecimiento), como extrínsecos (fase larvaria y/o sexo y respuesta inmune del insecto).

Los resultados obtenidos de la selección de aislamientos de *B. bassiana* efectivos contra *P. americana* mediante exposición directa de la suspensión de conidios aéreos (CA), mostraron diferencias en la virulencia del entomopatógeno, así como entre las fases del insecto (ninfas tardías y adultos: hembras y machos). Los tratamientos C1, C2, C4 y C6 fueron los que presentaron AI en contra de *P. americana*. En general, la AI de los tratamientos fue mayor en insectos adultos (22.01% y 14.73% de mortalidad para hembras y machos, respectivamente), que en ninfas tardías (8.03%) (Fig. 12). No obstante, Murali *et al.* (1999), reportaron valores de mortalidad de hasta un 100% sobre insectos adultos de *P. americana* frente a tres aislamientos de *B. bassiana* mediante el contacto directo del crecimiento micelital (conteniendo los CA), pero mediante la aplicación de una suspensión acuosa de CA, a una concentración de 4.6×10^6 conidios/mL, la mortalidad observada varió de un 17 al 75%. Así mismo, Hernández-Ramírez *et al.* (2006), observaron que las ninfas de *P. americana* fueron más susceptible a la aplicación tópica de una suspensión de conidios aéreos (1×10^6 conidio/mL) de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, comparadas con los adultos (51% y 10% de mortalidad, respectivamente) a temperatura ambiente. Sin embargo, a una humedad relativa alta (85%), el incremento de la mortalidad en cucarachas adultas fue de hasta el 44%. Además de la humedad y la concentración de conidios, las diferencias observadas por este grupo en comparación a nuestros resultados, pudiera estar relacionada con el uso de ninfas en fase temprana además de que observaron que la susceptibilidad fue disminuyendo conforme avanzó el desarrollo del insecto. En la patogenia de *B. bassiana* se ha observado que el modo de exposición de las conidios influye directamente en la germinación, y por tanto en la mortalidad de insectos, según lo observado por Fernández *et al.* (2001) con el escarabajo *Leptinotarsa decemlineata* (Say), donde una suspensión de

conidios aéreos aplicados en aspersión directamente sobre el insecto, obtuvo hasta un 85% de germinación después de 36 h, a diferencia de los insectos tratados indirectamente mediante el follaje asperjado con conidios o la combinación de ambos modos de aplicación, con 50 % y 75 % de germinación, respectivamente. También se ha reportado diferencias en la mortalidad entre aislamientos comerciales y nativos. Quesada-Moraga *et al.* (2006) reportaron diferencias bajo condiciones de laboratorio, en la AI entre aislamientos de *B. bassiana* comerciales y nativos, contra las mosquitas *Bemisia tabaci* (Genn.) y *Trialeurodes vaporariorum* (West.), a una única dosis de conidios aéreos similar a la nuestra (1×10^7 conidio/mL). Las diferencias en los valores de mortalidad entre aislamientos de *B. bassiana* para las mosquitas mostraron rangos de mortalidad del 3 al 85%. En nuestros resultados, el aislamiento C4 obtuvo el mayor nivel de virulencia (68.12%) en adultos hembras, usando CA suspendidos (1×10^7 conidio/mL) a una HR de $65 \% \pm 10$ aplicados directamente sobre el abdomen de los insectos. La patogenicidad de los aislamientos nativos sobre cucarachas adultas hembras observada en nuestros resultados, ofrece una ventaja como agente de entomopatógeno para el control más efectivo de la cucaracha urbana, al afectar la fase reproductiva del insecto.

En una revisión de micoinsecticidas publicada por Faria y Wraight (2007), reportaron que el 74.5% de los productos de *B. bassiana* contienen conidios producidos por fermentación sólida (CA), y dentro de este grupo el 75% contienen únicamente conidios como ingrediente activo, y el 25% contienen una mezcla de conidios + cuerpos hifales. Los productos que contienen conidios sumergidos + blastosporas representan sólo el 3.6% de los productos comerciales. El incremento en la actividad insecticida de *B. bassiana* dependiendo del tipo de propágulo fue observado en insectos adultos de *Ambylomma americanum* L., donde la mortalidad con conidios aéreos fue menor al 10%, mientras que los insectos tratados directamente con el sobrenadante del cultivo líquido (caldo dextrosa Sabouraud + 0.5% extracto de levadura) alcanzaron valores mayores al 60% de mortalidad (Kirkland *et al.*, 2004). Así mismo, se ha encontrado que la diferencia en la virulencia de los propágulos de *B. bassiana*, así como la germinación, puede estar influenciada por las condiciones del cultivo. Lane *et al.* (1991), reportaron diferencias en la actividad insecticida en adultos de *Nephotettix virescens* (Distant), entre conidias y blastosporas de *B. bassiana* dependientes de la fuente de carbono o nitrógeno, donde en ambos casos las blastosporas

fueron menos virulentas que las conidias; sin embargo, las blastosporas obtenidas de cultivos carente de nitrógeno, obtuvieron los mayores niveles de germinación. Así mismo, Miranpuri y Khachatourians (1991), encontraron que las blastosporas y conidias de *B. bassiana* presentaron efecto larvicida contra *A. aegypti*; sin embargo las blastosporas fueron más patogénicas al invadir más rápidamente los tejidos del insecto. Anteriormente, en el hongo *I. fumosorosea* contra el coleóptero *Epilachna varivestis* Mulsant se reportó que las blastosporas presentan una mayor actividad comparadas con conidios (Behle *et al.*, 2006). También, se han reportado diferencias en la virulencia con lepidópteros de las especies *S. exigua* y *P. xylostella*, expuestos a dos aislamientos del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea*, donde la penetración de las hifas dentro de la cutícula, así como la proliferación de las blastosporas dentro de la hemolinfa, fue más rápida para el aislamiento más virulento, comparado con el de menor actividad (Altre y Vandenberg, 2001). La combinación de conidias y blastosporas de *B. bassiana*, mostraron hasta un 100% de mortalidad en la mosca *Hematobia irritans* (L.) después de 7 días de postexposición, además de causar una rápida mortalidad (2.7 días) (Lohmeyer y Miller, 2006). Nosotros observamos que cuando los aislamientos fueron fermentados por 13 días (experimentos CS+B y SF), bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura, los valores de mortalidad incrementaron hasta un 95%. La media de la mortalidad de los tratamientos de *B. bassiana* contra *P. americana* en fase de ninfas en el experimento de CS+B fue de 58.58%, mientras que con CA, la patogenicidad fue mucho menor (6.23%). También observamos que el experimento con CA fue más virulento contra hembras comparado con machos y ninfas (27.08% contra 17.75% y 6.23%, respectivamente); mientras que el experimento CS+B mostró una actividad similar contra ninfas tardías, hembras y machos (58.58%, 57.73% y 53.84%, respectivamente) y con el experimento SF, la mortalidad se mantuvo entre los valores medios de los tratamientos CA y CS+B (26.68% 32.98% y 37.92%, respectivamente) (Fig. 13). Estos resultados mostraron que la fermentación en medio líquido de los 4 tratamientos (C1, C2, C4 y C6), en particular la combinación de CS+B, fueron los propágulos más patogénicos frente a las 3 fases probadas de *P. americana*.

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos mostraron una relación entre la virulencia y la viabilidad de los aislamientos. Se observó que la viabilidad de los aislamientos que presentaron mayor AI en los experimentos con CA y CS+B, obtuvieron los valores más altos en el parámetro de germinación a partir de las 24 h de fermentación (Tablas 3 y 4). Anteriormente, esta relación de altas tasas de viabilidad con un incremento en la patogenicidad se ha reportado en algunos aislamientos de *B. bassiana*. Los parámetros de germinación en medios líquidos y sólidos se han empleado para medir variación en la virulencia de aislamientos de *B. bassiana* contra *P. xylostella* y *L. decemlineata* (Talaie ó Hassanlou *et al.*, 2006). Safavi *et al.* (2007), observaron una relación directa entre el alto rango de germinación y el incremento de la virulencia contra *Tenebrio molitor* L. de 3 aislamientos de *B. bassiana*. Así mismo, Montesinos-Matías *et al.* (2011) clasificaron cepas de *B. bassiana* de acuerdo a los fenotipos de germinación y crecimiento radial como parámetros indicadores de virulencia frente a *T. molitor*. Durante la evaluación del experimento CA, los tratamientos C2, C4 y C6, quienes mostraron la actividad más alta contra ninfas y adultos de *P. americana*, obtuvieron un 86.21% de germinación contra el 25.10 % de los tratamientos C1, C3 y C5, quienes también obtuvieron los rangos de actividad insecticida más bajos para insectos adultos, y nula actividad para la fase de ninfa (Tabla 3; Fig 12). Se ha observado que la viabilidad de las conidios de algunas cepas comerciales de *B. bassiana* (GHA-726 y CA-603) se ve influenciada por el tipo de fermentación (sistema sólido, líquido o difásico), así como el tipo y cantidad del aislamiento (Kassa *et al.*, 2008). En un estudio comparativo entre aislamientos de *B. bassiana* nativos y la cepa comercial de *B. bassiana* registrada por BotaniGard® en USA contra ocho diferentes lepidópteros de importancia agrícola, se reportó que los aislamientos mostraron virulencia mayor o igual a la cepa comercial (Wraight *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, el experimento CS+B mostró los valores más altos de mortalidad contra ninfas, hembras y machos. Sin embargo, los valores en la tasa de germinación no fueron mayores a los CA de los tratamientos más virulentos (Fig. 13). Para los tratamientos más patogénicos (C4 y C6) el porcentaje de germinación fue en promedio del 66.8%, seguido por el tratamiento C1, quien obtuvo el 23% de germinación, y cuyos valores de mortalidad no fueron diferentes al control. El tratamiento C2 mostró un valor intermedio tanto de germinación (44. 0%), como de actividad insecticida. Se sabe que *B. bassiana* tiene los más altos requerimientos

nutrimentales para la germinación de esporas, crecimiento hifal y esporulación (ManHong y Xing-Zhong, 2006). También se ha demostrado que las condiciones del cultivo (incluyendo condiciones de estrés) influyen fuertemente en la germinación, adhesión y virulencia en hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* (Rangel *et al.*, 2008). Las condiciones de campo de calor extremo, afectan la virulencia de *B. bassiana* al disminuir la viabilidad de los conidios (Howard *et al.*, 2011). Además del parámetro de germinación, se han utilizado otras técnicas que aseguren la viabilidad de los organismos, entre ellas se encuentra la técnica de unidades formadora de colonias (UFC) y el método de actividad celular por reducción del MTT para confirmar la presencia de células viables en organismos fúngicos (Chaturvedi *et al.*, 2005; Kesanakurti *et al.*, 2012; Stentelaire *et al.*, 2001). La viabilidad de los CA y CS+B fue confirmada mediante ambas técnicas (UFC y MTT). Para el caso de CA, se comprobó que la viabilidad de los conidios con la técnica UFC fue similar a los resultados arrojados por la prueba de germinación, donde los tratamientos más virulentos obtuvieron la mayor cantidad de UFC (3.0×10^7). En cambio, la prueba de MTT no mostró diferencias entre los tratamientos, confirmando la viabilidad de las células independientemente del tiempo de la aparición del tubo germinativo (Tabla 3). Esta relación de mayor viabilidad e infectividad, fue notoria para el tratamiento CS+B, donde los tratamientos C4 y C6 presentaron los más altos valores de viabilidad con las pruebas de MTT y UFC, cuyos valores de mortalidad también fueron los más altos para ninfas, hembras y machos (>70, 90 y 80% de mortalidad, respectivamente, Fig. 13). No obstante, los valores de germinación fueron más altos para el experimento con CA, lo cual nos podría sugerir que el proceso de la fermentación líquida de *B. bassiana* podría influir en el incremento de la AI mostrada por los experimentos con CS+B y SF.

Como se mencionó anteriormente, *B. bassiana* produce tres tipos de propágulos (conidios aéreas, conidios sumergidos y blastosporas), además de micelio, dependiendo del tipo de fermentación (sólida o líquida). La producción de blastosporas por *B. bassiana* en cultivos sumergidos puede variar de acuerdo a los nutrientes y tiempo de fermentación, incrementando exponencialmente la cantidad de células (Pham *et al.*, 2009), así como el rendimiento de conidios sumergidos producidas en cultivos líquidos puede influir en la mortalidad (Arcas *et al.*, 1999). Dentro de los propágulos producidos por *B. bassiana*, se han encontrado diferencias en las propiedades de adhesión a las superficies, siendo las

conidios sumergidos quienes muestran la más amplia especificidad de unión, adhiriéndose tanto a superficies hidrofóbicas, como a débilmente polares e hidrofílicas (Holder y Keyhani, 2005). Esto podría explicar el incremento de la actividad insecticida del experimento con CS+B y la baja susceptibilidad de *P. americana* a los CA de los diferentes tratamientos.

Además de los distintos tipos de células ya mencionadas producidas durante su crecimiento, se ha reportado que *in vivo*, *B. bassiana* presenta una transición dimórfica donde se producen cuerpos hifales tipo levaduras durante el crecimiento en la hemolinfa de los artrópodos, y que cada uno de los estados desarrollados por *B. bassiana* presentan un sistema de evasión del sistema inmune del insecto (Lewis *et al.*, 2009). Los valores medios en la actividad del SF observados en nuestros resultados nos sugieren que a esto se debe la diferencia en la AI entre CA, CS+B y SF (Figs. 12, 13 y 14), lo cual también podría estar relacionado con los metabolitos producidos durante la fermentación líquida de *B. bassiana* (Bidochka y Khachatourians, 1991). Se ha reportado la producción de toxinas después de 14 días de fermentación entre especies de *Beauveria*, tales como beauvericina, oosporeinas, basianinas y tenelinas (Strasser *et al.*, 2000). Algunos de estos metabolitos secundarios, incluyendo basionólidos, son desipéptidos ciclooligoméricos que son considerados un factor de alta virulencia contra insectos (Xu *et al.*, 2009). Esta producción de toxinas podría conferirle ventajas al entomatógeno como producto comercial, ya que la alta producción de toxinas podría incrementar la capacidad insecticida del hongo y bajar la producción de micelio aéreo. En nuestros ensayos de actividad, a partir de cucarachas expuestas a *B. bassiana* se recolectaron insectos (ninfas y adultos) con poca o nula presencia de micelio aéreo, donde se verificó que la mortalidad de los tratamientos de CA y CS+B era debida a los tratamientos con *B. bassiana*.

Dentro de la industria de la agricultura y el desarrollo de micopesticidas, es importante encontrar componentes fúngicos celulares o componentes extracelulares, como toxinas, que pudieran mejorar la calidad y eficiencia del producto comercial (Deshpande, 1999). Algunos metabolitos secundarios producidos por *B. bassiana*, como los ciclohexadipéptidos, específicamente beauvericina (BEA), muestran actividad antibiótica, antifúngica e insecticida, así como actividad antiproliferativa y anti-apoptótica en líneas celulares cancerígenas *in vitro*; pero no es indispensable en el proceso infectivo contra insectos (Xu *et*

al., 2008), mientras que el basianiólido es altamente significativo como factor de virulencia de *B. bassiana* (Xu *et al.*, 2009). Se ha visto que la producción de BEA por *B. bassiana* difiere entre aislamientos de la misma especie (Valencia *et al.*, 2011). Nosotros no pudimos detectar la presencia de BEA en nuestro sobrenadante mediante cromatografía en capa fina (Fig. 16); sin embargo, se comprobó la actividad insecticida y antibacteriana del sobrenadante después de la fermentación líquida (Fig. 14 y 15). Previamente se ha reportado que el filtrado de cultivos líquidos de *B. bassiana* incrementaron la actividad insecticida contra *Aphis gossypii* Glover (Gurulingappa *et al.*, 2011), y la subtilina ligada a proteasas mejoró la virulencia contra *N. lugens* (Song y Feng, 2011). En cultivos líquidos, algunas especies de *Beauveria* inician la producción de toxinas diferentes a BEA, como oosporinas, a partir de los 4 días de incubación, hasta alcanzar los rangos más altos de producción después del día 14 de fermentación (Strasser *et al.*, 2000). Además de las toxinas ciclodessipépticas producidas por *B. bassiana*. También se han reportado otros metabolitos secundarios con capacidad antibacteriana. Lee *et al.* (2005) evaluaron 47 hongos entomopatógenos y encontraron que hasta el 81% de éstos producen componentes anti-*Bacillus* y 64% producen componentes anti-*Staphylococcus*, y que la producción de componentes antibacteriana/antifúngicos por hongos entomopatógenos puede mejorar con nutrientes adecuados durante la fermentación. Algunos de estos componentes con actividad anti-bacteriana se encuentran en el sobrenadante, después de la fermentación líquida de *B. bassiana*. Reddy-Parine *et al.* (2010), reportaron diferencias en la actividad de extractos crudos de *B. bassiana* contra bacterias aerobias patógenas como *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum*. En un reciente estudio, Sahab (2012) reportó que el sobrenadante filtrado de extractos etílicos crudos de *B. bassiana* exhiben actividad antibacteriana contra cepas de bacterias Gram (+) (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus* y *S. aureus*) y Gram (-) (*E. coli* y *Aeromonas* spp.), observándose la mayor actividad sobre bacterias Gram (+), siendo *S. aureus* la menos susceptible y *B. subtilis* la más susceptible. Esto concuerda con nuestros resultados, donde el sobrenadante de los aislamientos de *B. bassiana* mostraron una mayor actividad contra bacterias Gram (+), siendo *B. subtilis* la más susceptible, mientras que las Gram (-) presentaron halos de inhibición más bajos, inclusive para *E. coli*, donde ningún aislamiento del tratamiento SF

mostró actividad inhibitoria (Tabla 5). Con estos resultados podemos sugerir que tanto la actividad anti-bacterial como la actividad insecticida de nuestros aislamientos pueden estar relacionadas con la producción de metabolitos secundarios diferentes a BEA.

Se ha reportado que las proteasas producidas durante la fermentación incrementan la actividad insecticida en hongos entomopatógenos (Mohanty y Prakash, 2008). Así mismo, se demostró que *B. bassiana* produce metabolitos secundarios extracelulares solubles durante la fermentación con actividad insecticida contra *B. tabaci* (Fattha-Amin *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Quesada-Moraga *et al.* (2006), comprobaron que los componentes extracelulares de los entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii* y *Scopulariopsis brevicaulis* obtenidos a partir de cultivos líquidos, tenían efecto tóxico contra larvas de *Spodoptera littoralis*. Por su parte, Kirkland *et al.* (2005) encontraron que el sobrenadante libre de células de *B. bassiana* induce la mortalidad de algunas especies de garrapatas (*A. americanum*, *Amblyomma maculatum* Koch, e *Ixodes scapularis* Say) en fase de adulto. Ellos reportaron que la secreción del ácido oxálico por parte del entomopatógeno, contribuye a la reducción de pH del medio, y que este actúa como un potente acaricida durante la patogenia. Un efecto de potenciación de la actividad insecticida de *B. bassiana* fue observada por Fattha-Amin *et al.* (2011), quienes al conjuntar la producción de conidios y componentes extracelulares solubles en agua, veían que se incrementaba hasta en un 92% el porcentaje de mortalidad contra la mosquita blanca *B. tabaci*. Nosotros observamos una mayor AI con el tratamiento CS+B, en comparación a los tratamientos CA y SF. Esto podría deberse a la actividad conjunta de células (conidios sumergidas + blastosporas) y metabolitos secundarios producidos durante la fermentación.

La introducción de productos sinérgicos podría beneficiar económica y ecológicamente el uso del control biológico. La mezcla de estos componentes con los agentes de control podrían multiplicar la eficacia de dichos agentes de control (Srivastava *et al.*, 2009). Además de la combinación de componentes fúngicos, algunos de estos productos pueden ser de origen químico (orgánicos o inorgánicos). Los químicos como ácido bórico, sílica gel y tierra de diatomeas proveen un excelente control sobre las cucarachas *P. americana* y *B. germanica* (Rust *et al.*, 1991; Zurek *et al.*, 2003; Gore y Schal, 2004; Barcay *et al.*, 2005). Se ha estudiado el uso de tierra de diatomeas sola o en combinación con extractos de plantas, mejorando la eficacia de *B. bassiana* contra coleópteros (*Tribolium*

castaneum (Herbst) y *Rhizopertha dominica* F). La tierra de diatomeas daña la cutícula del insecto, lo cual incrementa la permeabilidad de las conidios disponiendo fácilmente de nutrientes para su germinación (Wassem *et al.*, 2004; Wakil *et al.*, 2011). Algunas formulaciones químicas afectan la germinación de conidios, el crecimiento vegetativo y la esporulación de *B. bassiana* (Alizadeh *et al.*, 2007). Es por eso que se debe verificar la compatibilidad de los productos químicos y el entomopatógeno. En nuestro estudio, evaluamos la compatibilidad del ácido bórico con los aislamientos de *B. bassiana* después de la fermentación líquida durante 13 días. Observamos una relación negativa en la viabilidad de los aislamientos y la concentración de H₃BO₄: a mayor concentración de ácido bórico, menor viabilidad de las células fúngicas (Fig. 17). La concentración al 1% de H₃BO₄ fue la que permitió la mayor viabilidad, aunque no hubo diferencia en la germinación entre los aislamientos y en general mostró bajos niveles de germinación (Ö30%), mientras que los aislamientos C4 y C6, con el método MTT y UFC, la viabilidad fue mayor (Tabla 8). Una vez probada la compatibilidad del químico orgánico con el entomopatógeno, evaluamos el sinergismo entre el ácido bórico y los tratamientos CS+B y SF. Aunque los valores de mortalidad fueron superiores al 82% en todos los aislamientos para todas las fases evaluadas (Tabla 7), el incremento en la AI fue significativo únicamente para los aislamientos C1 y C2 del tratamiento experimento CS+B (Figs. 18, 19 y 20). De igual forma, Zurek *et al.* (2003) observaron una interacción sinergista entre *M. anisopliae* y ácido bórico contra la cucaracha *B. germanica* en bioensayos de laboratorio.

La evaluación de las características fisiológicas de los aislamientos de *B. bassiana* de nuestro estudio mostraron diferencias en la viabilidad, mortalidad y adaptación. Sin embargo, la evaluación genética es una herramienta útil en la búsqueda de variabilidad y genotipos que nos pudieran ayudar en la selección de aislamientos de interés dentro del control biológico. Por ejemplo, se ha logrado establecer una asociación entre un grupo genético determinado y algunas características fisiológicas de *B. bassiana*, como la habilidad de crecimiento a diferentes temperaturas (Bidochka *et al.*, 2002). Mediante el uso de los marcadores moleculares RAPD e ITS-RFLP se ha demostrado la variabilidad genética entre aislamientos de *B. bassiana* de diferentes regiones geográficas y hospederos (Gaitan *et al.*, 2002). Sin embargo, existe controversia en el uso de estos análisis debido a que el uso del RAPD entre aislamientos de *B. bassiana* infectivos contra larvas de *Boophilus*

microplus (Acari: Ixodidae), mostraron baja variación genética entre aislamientos obtenidos de *B. microplus* de la misma localidad (Kamp *et al.*, 2006). Nosotros encontramos en promedio un alto porcentaje de polimorfismo (82%) entre los aislamientos mediante el análisis RAPD, mostrando hasta el 100% de polimorfismo usando los cebadores OPA03, OPB09, OPAB06 y OPD18 (Tabla 11). Thakur *et al.* (2007), reportaron una diferencia en el patrón bioquímico (zimograma) entre aislamientos nativos de *B. bassiana* obtenidos de coleópteros y lepidópteros, además de una variabilidad genética. Su análisis genético mostró un alto grado de diversidad (0-66%) y mediante el análisis de similitud de Jaccard (0.256-1.00), ellos pudieron agrupar los aislamientos según la fuente de obtención, coleópteros o lepidópteros, relacionando esto con la especificidad del hospedero. Nuestro análisis mostró la mayor similitud entre los aislamientos C4 y C6 dada por el *cluster* (0.679) y el análisis de Jaccard (67.9 % de similitud), seguido por los aislamientos C1 y C2, con valores de 0.439 y 43.4% de similitud para cada análisis (Tabla 12). Un estudio reciente, con aislamientos de *B. bassiana* obtenidos de *Ixodes ricinus* L., mostró que los aislamientos que presentan propiedades morfológicas y de cultivo similares, pueden agruparse genéticamente por medio de patrones de banda mediante el análisis RAPD y por la secuenciación de la región ITS (Mitina *et al.*, 2011). Durante la evaluación de la AI de los aislamientos C4 y C6 obtuvieron en promedio los valores más altos de mortalidad para los tratamientos CA (39.56% y 16.84%, respectivamente), CS+B (85.87% y 86.48%, respectivamente) y SF (51.85 % y 42.14%, respectivamente). Contra valores menores al 30% de los aislamientos C1 y C2, para los mismos tratamientos. De acuerdo a la toxicidad observada, la diversidad genética agrupa a nuestros aislamientos según su patogenicidad. Esto también había sido reportado por Santoro *et al.* (2008), quienes analizaron aislamientos de *B. bassiana* obtenidos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer), midiendo los parámetros de mortalidad, crecimiento vegetativo y producción de conidios. Ellos encontraron que los aislamientos más virulentos presentaron patrones más homogéneos mediante el análisis RAPD.

En nuestro trabajo es importante destacar el origen de los aislamientos evaluados, donde las cepas C1 y C2 se usan dentro de programas fitosanitarios para el control de plagas agrícolas; mientras que los aislamientos C4 y C6 provienen de cucarachas de la especie *P. americana*; al analizar nuestros resultados de RAPD observamos que la agrupación de los aislamientos se dio en ese sentido, por un lado las cepas de uso comercial y por el otro los

aislamientos provenientes de *P. americana* (Fig. 23). Anteriormente, se ha reportado que los análisis genéticos son importantes en estudios de campo donde se desea monitorear eficacia y persistencia de cepas de *B. bassiana* introducidas para el control de plagas y diferenciación entre cepas nativas (Castrillo *et al.*, 2003). Aquino de Muro *et al.* (2005), tratando de monitorear aislamientos de *B. bassiana* introducidos en campo obtenidos de las especies de *Eurygaster* (Puton) y *Aelia* L., no encontraron variación genética de los aislamientos de *B. bassiana* obtenidos a partir de insectos de campo, sugiriendo que los insectos fueron infectados por cepas nativas. Así mismo, un estudio con aislamientos de *B. bassiana* efectivos contra *Hypothenemus hampei* (Ferrari), mostró que la combinación entre aislamientos de *B. bassiana* agrupados por similitud genética (caracterización usando secuenciación de la región ITS, así como análisis RAPD) no incrementó la virulencia de los aislamientos. Sin embargo, la combinación de grupos diferentes presentaron antagonismo o sinergismo en la virulencia contra el hospedero (Cruz *et al.*, 2006). Todos los aislamientos de *B. bassiana* evaluados amplificaron las regiones ITS como productos de 600 pb (Fig. 24). Sin embargo, con las enzimas endonucleasas: *Alu* I, *Eco* RI, *Hae* III, *Hha* I, y *Hinf* I no se generaron fragmentos de restricción. Esto concuerda con los estudios recientes de Mendonça *et al.* (2012), quienes también reportaron la variabilidad de *B. bassiana* usando análisis RAPD. Sin embargo, el análisis de la región rDNA-ITS, amplificó un fragmento de 550pb para todos los aislamientos, pero no presentaron fragmentos de restricción usando las endonucleasas *Eco*RI y *Hae*III.

La secuenciación de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) es una de las más informativas para la distinción entre aislamientos de *B. bassiana* (Kouvelis *et al.*, 2008). Uribe y Khachatourians (2004) reportaron la variación molecular a partir del polimorfismo del DNA mitocondrial (DNAm_t) en 15 aislamientos de *B. bassiana*, mostrando que esta región es altamente conservada. Mediante la secuenciación de la región ITS, nosotros encontramos una variación del 7% entre los aislamientos 2 y 6, similar a lo reportado por Coates *et al.* (2002), donde mediante la secuenciación de los genes 5.8S (rRNA) e ITS de *B. bassiana* observaron hasta un 6.62% de variación entre aislamientos. La más alta variación registrada en nuestro trabajo fue en la región ITS, donde se obtuvo un 8.39% de divergencia. Los genes del DNA mitocondrial, por su bajo nivel de polimorfismo, es una herramienta ideal para

examinar la diversidad genética entre poblaciones de hongos e identificar genéticamente una especie o un aislamiento en particular (Ghikas *et al.*, 2010)

Hasta aquí hemos relacionado la diferencia en la virulencia de los aislamientos de *B. bassiana* a las características fisiológicas y genéticas propias del entomopatógeno. Sin embargo, la diferencia en la susceptibilidad de *P. americana* se puede deber a un rasgo evolutivo propio del insecto (Schmid-Hempel, 2003), lo cual nos lleva a la búsqueda de la relación patógeno-huésped. Los datos de la mortalidad de todos los experimentos por tratamiento mostraron que los rangos más altos de mortalidad fueron contra las cucarachas hembras (39.26%) en comparación con los insectos adultos y las ninfas tardías (36.5% y 30.5% de mortalidad, respectivamente). De la Rosa *et al.* (2002), reportaron diferencias en la mortalidad entre las distintas fases de insectos, donde la mosquita de la fruta Mexicana *Anastrepha ludens* (Loew) mostró baja mortalidad en estados inmaduros (larvas y pupas) y altos niveles de mortalidad en adultos. En cambio, un estudio realizado contra *P. americana* con cuatro distintos tratamientos de *B. bassiana* mostraron menor mortalidad en adultos que en ninfas (Hernández-García *et al.*, 2007). Una posibilidad a esta observación es que en este estudio sólo se evaluaron ninfas tardías. La actividad de PO es parte del mecanismo de respuesta inmune innata en insectos y su estimulación se ha relacionado con infecciones fúngicas (Vilmos y Kurucz, 1998). Así mismo se ha reportado que las diferencias en respuesta inmune de los insectos están ampliamente relacionadas a la edad (Rolf, 2001; Robb y Forbes, 2006; Smicht *et al.*, 2007). En nuestro estudio encontramos que las ninfas tardías no expuestas, la actividad de PO fue mayor comparada con ninfas tempranas o hembras (Tabla 13, Fig. 25). Aunque es normal encontrar un incremento en la actividad de PO en las fases tardías ninfales (Hartzer *et al.*, 2005), el aumento en la actividad de PO en los adultos machos contra hembras fue sorprendente. En un estudio diferente, realizado en nuestro laboratorio (Valadez-Lira *et al.*, 2012), comparamos la actividad de PO entre hembras y machos, no se encontraron diferencias con *H. virescens* y *P. interpunctella*, pero las hembras de *S. exigua* y *T. ni* mostraron una actividad de PO mayor comparada con adultos. En un reciente estudio de los mecanismos bioquímicos de la formación de la pared celular de la ooteca de *P. americana* se reportó la oxidación de PO a -glucosidasas para inducir la esclerotización de la ooteca, como mecanismo para proteger los huevos fertilizados de infecciones (Whitehead, 2011). La cascada de PO finaliza en la formación de quinonas

(Gillespie *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1998; Kanost y Gorman, 2008). Nosotros creemos que esto puede explicar los bajos niveles observados en hembras comparado con machos, observados en nuestro estudio.

Existe una variación en los niveles de PO dependiendo del sexo del insecto. Así mismo, se ha reportado que la presencia de microorganismos induce la actividad de PO, y esta actividad varía durante el ciclo de vida (Thomas-Guyon *et al.*, 2009). Se sabe que la respuesta inmune en insectos es multifactorial (Schmid-Hempel, 2005). En un estudio de la actividad de PO, se observó que *Galleria mellonella* L. mostró una disminución de actividad después de exponer los insectos al hongo entomopatógeno *Conidiobolus coronatus* (Bogu *et al.*, 2007). No obstante, un reporte reciente mostró que al exponer al mosquito *A. gambiae* contra *B. bassiana*, la edad no alteraba la susceptibilidad y la supervivencia del insecto expuesto, pero si el tiempo de muerte, donde los insectos viejos murieron más rápido que los jóvenes (Mnyone *et al.*, 2011). A pesar de que no encontrábamos los factores por los cuales las ninfas sobrevivieron a la infección de CA de *B. bassiana*, pero no al experimento de CS+B, esto fue claro cuando observamos una mayor actividad de PO en ninfas expuestas al experimento CA (0.391), comparada con las expuestas al experimento CS+B (0.155) (Tabla 14, Fig. 26, 27 y 28). Estos resultados fueron similares en insectos ortópteros (*Gryllus texensi* Cade and Otte), y coleópteros (*Popillia japonica* Newman) (Tucker y Stevens, 2003). En este aspecto, Ruiz-González *et al.* (2009), trabajando con *Bombus terrestris* L., observando que el nivel y la función inmune incrementó en adultos o larvas como resultado de la exposición a patógenos y parásitos. Sabemos que la PO se produce y libera en la hemolinfa; a este respecto, Aoki y Yanase (1970) encontraron que la actividad de PO se redujo cuando la infección de *B. bassiana* incrementó en el lepidóptero *B. mori*. Resultados similares fueron reportados por Gillespie *et al.* (2000), quienes observaron una disminución en la actividad de PO de *Schistocerca gregaria* Forsskål después de la infección por *M. anisopliae* var *acridum*. Esta relación, donde la actividad de PO incrementa con el desarrollo de insectos inmaduros, fue reportada previamente por Nation *et al.* (1995), quienes observaron que en larvas tempranas del díptero *Anastrepha suspensa* (Loew) expuestas a radiación había una reducción en la actividad de PO, en comparación a larvas tardías del tercer instar.

Como se mencionó anteriormente, existe una relación entre actividad de PO y el sexo del insecto. En el díptero *Scathophaga stercoraria* L. se han reportado diferencias en la actividad de PO en la hemolinfa, dependiendo del sexo y la edad del insecto (Schwarzenbach *et al.*, 2005). Esta diferencia dependiente del sexo también se observó en nuestro estudio, donde las cucarachas hembras mostraron menor actividad de PO, comparada con machos y ninfas (0.265 contra 0.282 y 0.305, respectivamente). Así mismo, se ha observado un incremento en la actividad de PO dependiendo del estado reproductivo en insectos. En este aspecto, Adamo *et al.* (2001), reportaron que la actividad de PO en *Gryllus texensis* (Cade & Otte) fue similar en machos y hembras antes de la reproducción, pero en cuanto los machos iniciaron la edad reproductiva, la actividad de PO disminuyó. Por el contrario, en hembras la actividad de PO incrementó después de la reproducción. A este respecto Toledo *et al.* (2007), no encontraron diferencias en la susceptibilidad a *B. bassiana* entre hembras y macho de *Peregrinus maidis* (Ashmead). Sin embargo, la tasa de infección de las hembras fue mayor comparada con la de los insectos machos. Nuestros resultados mostraron actividad insecticida de *B. bassiana* contra *P. americana*, donde la susceptibilidad del insecto fue: hembras > macho > ninfas tardías, y la actividad insecticida observada por experimento fue: CS+B > SF > CA.

Debido que las CA es el tipo de propágulo más ampliamente usado como ingrediente activo de los micoinsecticidas comerciales (de Faria y Wraight, 2007) y que nosotros encontramos una mayor patogenicidad en el experimento con CS+B, es importante comparar productos de *B. bassiana* a partir de fermentaciones líquidas y sólidas para el control de cucarachas. La producción de metabolitos durante la fermentación además de presentar actividad insecticida (CS+B>SF), mostró actividad antibacteriana, mayormente contra *B. subtilis*. La activación fenoloxidasas (PO) es un componente integral del sistema de defensa de insectos el cual inmoviliza y mata microorganismos invasores (Zhao *et al.*, 2007). La presencia de microorganismos como *B. subtilis* puede inducir la activación de PO (da Silva *et al.*, 2000). Nosotros observamos una correlación inversa entre la actividad insecticida de *B. bassiana* y la actividad de PO de *P. americana* en ninfas tardías, hembras y machos (Tabla 16). Esto podría sugerir que la presencia de metabolitos en el sobrenadante controla la población bacteriana, importante para la activación de PO, la cual se ve

suprimida por este componente, permitiendo a las células de *B. bassiana* penetrar y germinar, redundando en un incremento de la actividad insecticida.

En resumen, el trabajo realizado con los diferentes aislamientos del entomopatógeno *B. bassiana* evaluado contra *P. americana*, induce la mortalidad del insecto y se relaciona con la supresión de la actividad de PO. Así también, observamos que la actividad insecticida es dependiente del aislamiento y propágulo, así como de la toxicidad de los metabolitos producidos durante la fermentación líquida y que estas características fisiológicas pueden ser debidas a la variabilidad genética del microorganismo. Un factor que influyó también en la patogenia de *B. bassiana* sobre el insecto, fue el estado de desarrollo y sexo de la cucaracha. La combinación de propágulos y sobrenadante, así como el conocimiento del estado más susceptible y la respuesta inmune del insecto a los componentes del bioinsecticida, puede darnos la pauta para desarrollar un producto comercial efectivo contra una de las principales plagas urbanas: *P. americana*.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron aislamientos nativos de *B. bassiana* a partir de *P. americana*, de los cuales C4 y C6, mostraron mayor patogenicidad sobre cucarachas que los aislamientos comerciales Bb-Chc-LBIH-28 y GHA.
2. Se observó que el producto total de la fermentación líquida (CS+ B) de *B. bassiana* mostró mayor efectividad sobre *P. americana* que los propágulos infecciosos obtenidos por fermentación sólida (conidios aéreos CA) y/o el sobrenadante filtrado (SF) de la fermentación líquida.
3. Los cuatro aislamientos seleccionados de *B. bassiana* mostraron producción de metabolitos bioactivos con efecto antimicrobiano después de la fermentación líquida, con mayor actividad contra bacterias Gram (+).
4. El uso de H_3BO_4 como adyuvante inorgánico a bajas concentraciones, aumentó la efectividad de *B. bassiana* sobre *P. americana*.
5. Los niveles de fenoloxidasasa (respuesta inmune innata) varía de acuerdo a la fase del ciclo y sexo de *P. americana*, lo que puede influir directamente en la susceptibilidad del insecto a patógenos.
6. Los aislamientos nativos de *B. bassiana*, que mostraron mayor actividad insecticida sobre *P. americana*, disminuyeron los niveles de producción de PO.
7. Los análisis RAPD-PCR permitieron diferenciar molecularmente a los aislamientos y cepas de *B. bassiana*, agrupándolos de acuerdo a su patogenicidad.
8. Se confirmaron diferencias genéticas entre los aislamientos y cepas de *B. bassiana* mediante la secuenciación de la región ITS ribosomal.

LITERATURA CONSULTADA

- Adamo, S.A., M. Jensen y M. Younger.** 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Anim. Behav.* **62**:417-425
- Alizadeh, A., M. A. Samih, M. Khezri y R.S. Riseh.** 2007. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *Int. J. Agri. Biol.* **9**(1): 31-34.
- Almeida, J. E. M., S. B. Alves y R. M. Pereira.** Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). *J. Appl. Entomol.* **121**(1-5): 539-543.
- Altre, J. A., y J. D. Vandenberg.** 2001. Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **78**: 81-86.
- Alves, S. B., L. R. Savoi, R. L. Biaggioni, M. A. Tamaie y R. M. Pereira.** 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Invertebr. Pathol.* **81**(2): 70-77.
- Aoki, J., y K. Yanase.** 1970. Phenol oxidase activity in the integument of the silkworm *Bombyx mori* infected with *Beauveria bassiana* and *Spicaria fumoso-rosea*. *J. Invertebr. Pathol.* **16**: 459-464.
- Appel, A. G.** 1998. Daily pattern of trap-catch of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) in kitchens. *J. Econ. Entomol.* **91**: 1136 -1141.
- Appel, A. G.** 2003. Laboratory and field performance of an indoxacarb bait against german cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* **96**: 863-870.
- Appel, A. G. y E. P. Benson.** 1995. Performance of avermectin bait formulations against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* **88**: 924-931.
- Appel, A. G., M. J. Gehret y M. J. Tanley.** 2004. Effects of moisture on the toxicity of inorganic and organic dust formulations to German cockroaches (Blattodea: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* **97**: 100961016.
- Appel, A. G. y Smith L. M.** 2002. Biology and management of the Smokybrown cockroach. *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 33-55.

- Aquino-de-Muro, M., S. Elliott, D. Moore, B. L. Parker, M. Skinner, W. Reid y B. El Bouhssini.** 2005. Molecular characterization of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of sun pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycol. Res.* **109**: 2946306.
- Arcas, J. A., B. M. Días y R. E Lecuona.** 1999. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparation of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *J. Biotech.* **67**: 151-158.
- Asgari, S., U. Theopold C. Wellby y O. Schmidt.** 1998. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. *PNAS.* **95**: 3690-3695.
- Ashida, M. y P. T Brey.** 1998. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade; in *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*, Brey, P. T. and Hultmark, D. (eds.) Chapman & Hall, New York, USA. pp. 135-172.
- Baines, D., Desantis T. y R. G. H. Downer.** 1992. Octopamine and 5-hydroxytryptamine enhance the phagocytic and nodule formation activities of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes. *J. Insect Physiol.* **38**: 905-914.
- Barcay, S. J.** 2005. IPM for cockroach infestations. *Pest Control Technol.* **6**:44-48.
- Bartlett M. C. y S. T. Jaronski.** 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. En: *fungi and biological control systems* (Burge M. N., ED.), Manchester University Press, Manchester, UK.
- Barnes, S. E. y D. Moore.** 1997. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycol. Res.* **101**: 662-666.
- Baumholtz, M.A, L. C. Parish, J. A. Witkowski y W. B. Nutting.** 1997. The medical importance of cockroaches. *Internat. J. Dermatol.* **36**: 90696.
- Behle, R. W., C. Garcia-Gutierrez, P. Tamez-Guerra, M. R. McGuire y M. A. Jackson.** 2006. Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwest. Entomol.* **31**: 289-295.
- Bell, W. J. y K. G. Adiyodi.** 1981. Reproduction. In: *The American Cockroach*. Eds Bell, W. J. y K. G. Adiyodi. Chapman & Hall, London. pp. 343-370.

- Bidochka, M. J., F. V. Menzies y A. M. Kamp.** 2002. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Arch. Microbiol.* **178**(6): 531-537.
- Bidochka, M. J., A. M. Kamp y J. N. A. De Croos.** 2000. Insect pathogenic fungi: from genes to populations. *En: Fungal Pathology.* Kronstad, J.W (Ed.). The Netherlands: Kluwer Academic Press. pp. 171-193.
- Bidochka, M. J. y G. G. Khachatourians.** 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(7): 1679-1684.
- Bidochka, M. J, R. J. St Leger y D. W. Roberts.** 1997. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Mem. Entomol. Soc. Can.* **129** (171): 213-224.
- Bidochka, M. J. y G. G. Khachatourians.** 1991. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* **58** (1): 106-117.
- BioEdit 7.0.9 for Windows.** 1997-2011. Biological sequence alignment editor. Ibis Biosciences. Carlsbad, CA.
- Boucias, I., J. Mazet, S. Pendland y Y. Hung.** 1995. Comparative analysis of the in vivo and in vitro metabolites produced by the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Can. J. Botany.* **73**(S1): 1092-1099
- Blazar, J. M., E. K. Lienau y M. W. Allard.** 2011. Insects as vectors of foodborne pathogenic bacteria. *Terr. Arthropod Rev.* **4**: 5-12.
- Bogu , M. I., E. K dra, J. Bania M. Szczepanik, M. Czygier, P. Jabłowski, A. Pasztaleniec, J. Samborski, J. Mazgajska y A. Polanowski.** 2007. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *J. Insect Physiol.* **53**: 909-922
- Brayner, F. A., H. R. C. Araújo, S. S. Santos, M. G. S. Cavalcanti, L. C. Alves, J. R. B. Souza y C. A. Peixoto.** 2007. Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Med. Vet. Entomol.* **21**: 112-120.
- Brenner, J.** 2002. Cockroaches (*Blattaria*). *Med. Vet. Entomol.* Academic Press. Pp 29-44.

- Broderick, N. A., K. F. Raffa y J. Handelsman.** 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. PNAS. **103** (41): 15196-15199.
- Buchawaldt, L. L. y J. S. Jensen.** 1991. HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus*. Biochem. **30** (7): 2311-2316.
- Bulet P., S. Cociancich, J.-L. Dimarcq, J. Lambert, J.-M. Reichhart. D. Hoffmann, C. Hetru y J. A. Hoffmann.** 1991. Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. J. Biol.Chem. **266**: 24520-24525.
- Buscott, F., D. Wipf, C. Di-Battista, J. C. Munch, B. Botton y F. Martin.** 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed-PCR. Mycol. Res. **100**: 63-71.
- Caballero, P., M. López-Ferber y T. Williams.** 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial M.V. Phytoma. España, S.l. 518 p.
- Castrillo, L. A., L. S. Bauer, H. Liu, M. H. Griggs y J. D. Vandenberg** 2010. Characterization of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) isolates associated with *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) populations in Michigan. Biol. Control. **54**(2): 135-140.
- Castrillo, L. A., J. D. Vandenberg y S. P. Wraight.** 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. J. Invertebr. Pathol. **82**(2): 75-83.
- Castlebury, L. A., J. B. Sutherland, L. A. Tanner, A. L. Henderson y C. E. Cerniglia.** 1999. Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. J. Microbiol. Biotech. **15**: 119-121.
- Cerenius, L. y K. Söderhäll.** 2002. Early events in crustacean innate immunity. Fish Shellfish Immunol. **12**: 421-437.
- Charnley, A.** 1984. Invertebrate-microbial interactions. Anderson, J. Rayner, A. and Walton, D. (Eds.). Cambridge University Press. PP 229-270.
- Chaturvedi, A. K., A. Kavishwar, G. B. Shiva Keshava y P. K. Shukla.** 2005. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein

protects against experimental murine aspergillosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **12**(9): 1063-1068.

- Chernysh, S, K. S, G. Bekkers, V. Pleskach, N. Filatova, V. Anikin, V. Platonov y P. Bulett.** 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *PNAS.* **20**: 12628612632.
- Cho, E-M., D. Boucias y N. O. Keyhani.** 2006. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. II. Fungal cells sporulating on chitin and producing oosporein. *Microbiol.* **152** (9): 2855-2864.
- Choi, Y. W., K. D. Hyde y W. H. Ho.** 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity.* **3**:29-38.
- Churchill, B. W.** 1982. Mass production of microorganisms for biological control. En: *Biological Control of Weeds with Plant Pathogens.* R. Charudattan y H. L. Walker, (Eds.) John Wiley & Sons, New York. pp 139-156.
- Clunie, L.** 2004. A guide to common invertebrates of New Zealand. www.landcareresearch.co.nz/research/biosystematics/invertebrates/invertid/
- Coates, B. S., R. L. Hellmich y L. C. Lewis.** 2002. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. *Mycol. Res.* **106**: 40650.
- Cochran, D.G.** 1989. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *J. Econ. Entomol.* **82**: 336-341.
- Cruz, L.P., A. L. Gaitan y C. E. Gongora.** 2006. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Appl. Microbiol. Biotech.* **71**(6): 918-922.
- Dalzoto, P.R., C. Glienke-Blanco, V. Kava-Cordeiro, W.L Araujo y J.L., Azevedo.** 2003. RAPD analysis of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* **107**: 106961074.
- De La Rosa, W., F. L. Lopez y P. Liedo.** 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* **95**(1): 36-43.
- Demark, J. J. y G. W. Bennett.** 1989. Efficacy of chitin synthesis inhibitors on nymphal German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* **82**: 1633-1637.

- Deshpande, M. V.** 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Rev. Microbiol.* **25** (3): 229-243
- Elgderi, R. M., K. S. Ghenghesh y N. Berbash.** 2006. Carriage by the German cockroach (*Blattella germanica*) of multipleantibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospitals and households in Tripoli, Libya. *Annal. Trop. Med. Parasitol.* **100** (1): 55662.
- Elliot, S. L. y A. G. Hart.** 2010. Density-dependent prophylactic immunity reconsidered in the light of host group living and social behavior. *Ecol.* **91**: 65-72.
- EPA.** Environmental Protection Agency. 1993. US Government Printing office: Washington, DC. EPA 738-R-93-017.
- Estrada M.E., M.V. Camacho y C. Benito.** 2007. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). *Cell Mol. Biol. Lett.* **12**: 240-252.
- Fakoorziba, M. R., F. Eghbal, J. Hassanzadeh y M. D. Moemenbellah-Fard.** 2010. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential vectors of the pathogenic bacteria found in nosocomial infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **104**: 521-528.
- Fargues, J. y C. Luz.** 1998. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Sci. Technol.* **8**: 3236334
- de Faria, M. R. y S. P. Wraight.** 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control.* **43**: 237-256.
- Fattah-Amin, G. A. E., S. Ali-Bazaid, N. Ahmed-Youssef y W. Diaeddeen-Saleh.** 2011. Assessment of insecticidal activity of red pigment produced by the fungus *Beauveria bassiana*. *Arch. Agron. Soil Sci.* **57**(4): 435-443.
- Fathpour, H., G. Emtiazi y E. Ghasemi.** 2003. Cockroaches as reservoirs and vectors of drug resistant *Salmonella* spp. *J. Iranian Biomed.* **7**:35-38.
- Faulhaber, L. M. y R. D Karp.** 1992. A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunology.* **75**: 3786381.

- Feng, M. G., J. B. Johnson y L. P. Kish.** 1990: Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal-infesting aphids (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* **19** (3): 815-820.
- Fernández, C. y R. Juncosa.** 2002. Biopesticidas: ¿La agricultura del futuro? *Phytoma*, **141**:14 ó 19.
- Fernandez, S., E. Groden, J. D. Vandenberg y M. J. Furlong.** 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Invertebr. Pathol.* **77**: 217-226.
- Ferron, P.** 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* **23**: 409-442.
- Fisher, C. W. y U. E. Brady.** 1983. Activation, properties and collection of haemolymph phenoloxidase of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol-C.* **75**: 111-114.
- Fotedar, R., U.B. Shrinivas y A. Verma.** 1991. Cockroaches (*Blattella germanica*) as carriers of microorganisms of medical importance in hospitals. *Epidemiol. Infect.* **107**: 181-187.
- Fotedar, R., Nayar, E., Samantray, J.C., Shriniva, S., Banerjee, U., Dogra, V. et al.** 1989. Cockroaches as vectors of pathogenic bacteria. *J. Commun. Dis.* **21**: 318-322.
- Gaitan, A, A. M. Valderrama, G. Saldarriaga, P. Velez y A. Bustillo.** 2002. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. *Mycol. Res.* **106**(11): 1307-1314.
- García, M. D. y F. Uruburu.** 2000. La conservación de cepas microbianas. *Act Sem.* **30**:12-16.
- García-Gutiérrez, C., P. Tamez-Guerra, H. Medrano-Roldán y M. B. González-Roldán.** 2007. Mercado de bioinsecticidas en México. En: biotecnología financiera aplicada a bioplaguicidas. García Gutiérrez C. y H. Medrano-Roldán (Eds.). Artes gráficas la impresora, Durango. México. pp: 17-40.
- Gardes, M. y T. D. Bruns.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**: 113-118.
- Gillespie, A.** 1988. Use of fungi to control pests of agricultural importance. *En: Fungi in biocontrol Biocontrol Systems.* Ed. MN Burges. UK: Manchester University Press. Pp: 37-60.

- Gillespie, J. P., C. Burnett y A. K. Charnley.** 2000. Response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Insect Physiol.* **46**: 429-437.
- Gillespie, A. T. y N. Claydon.** 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pestic. Sci.* **27**: 203-215.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost y T. Trenczek.** 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* **42**: 611-643.
- Gillespie, J. P. y G. G. Khachatourians.** 1992. Characterization of the *Melanoplus sanguinipes* hemolymph after infection with *Beauveria bassiana* or wounding. *Comp. Biochem Physiol. Part B: Comp. Biochem.* **103** (2): 455-463.
- Ghikas, D.V., V. N. Kouvelis y M. A. Typas.** 2010. Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*. *BMC Microbiol.* **10**:174. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/174>
- Glare, T.R. y A. Inwood.** 1998. Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycol. Res.* **102**: 250-256.
- Goettel, M. S. y D. W. Roberts.** 1992. Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. En: *Biological control of locusts and grasshoppers*. Lomer C. J., y C. Prior. (Eds.), C. A. B. International, Wallingford, Oxon, UK.
- Gomez-Flores, R., S. Gupta, R. Tamez-Guerra y R. T. Mehta.** 1995. Determination of mics for *Mycobacterium avium-M. intracellulare complex* in liquid medium by a colorimetric method. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1842-1846.
- Gore, J. Ch. y C. Schal.** 2004. Laboratory evaluation of boric acid-sugar solutions as baits for management of German cockroach infestations. *J. Econ. Entomol.* **97**(2): 581-587.
- Graczyk, T. K., R. Knight y L. Tamang.** 2005. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clin. Microbiol. Rev.* **18** (1):128-132.
- Griesch, J. y A. Vilcinskis.** 1998. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Biocontrol Sci. Technol.* **8** (4): 517-531.

- Gupta, S., S. B. Krasnoff, N. L. Underwood, J. A. A. Renwick y D. W. Roberts.** 1991. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathol.* **115**: 185-189.
- Gupta, S., C. Montlor y Y. S. Huang.** 1995. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. *J. Natl. Products.* **58** (5): 733-738.
- Gurulingappa, P., P. A., McGee y G. Sword.** 2011. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. *Crop Prot.* **30**: 349-353.
- Hamill, R. L., C. E. Higgins, H. E. Boaz y M. Gorman.** 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.* **49**: 4255-4258.
- Harrison, R. L. y B. C. Bonning.** 2010. Proteases as insecticidal agents. *Rev. Toxins.* **2**(5): 935-953.
- Hartzer, K. L., K. Y. Zhu y J. E. Baker.** 2005. Phenoloxidase in larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): molecular cloning of the proenzyme cDNA and enzyme activity in larvae paralyzed and parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59**: 67-79.
- Hernández-Ramírez, G., F. Hernández-Rosas, H. Sánchez-Arroyo y R. Alatorre-Rosas.** 2007. Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Entomotropica.* **22**: 27-36.
- Hywel-Jones, N.L. y A.T. Gillespie.** 1990. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* **94** (3): 389-392.
- Hillyer, J. F. y B. M. Christensen.** 2005. Mosquito phenoloxidase and defensin localize in melanization innate immune responses. *J. Histochem. Cytochem.* **53**: 689-698.
- Hiromori, H. y J. Nishigaki.** 2001. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* **36**(2): 231-236.
- Hiruma, K., y M. L. Riddiford.** 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to DOPA decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 245-253.

- Hoffmann, M. P. y A. C. Frodsham.** 1993. The need, status, and potential for biological control. *En: Natural Enemies of Vegetable Insect Pests.* Cooperative extension, Cornell University, Ithaca, NY. pp 63.
- Holder, D. J. y N. O Keyhani.** 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 526065266.
- Hoog, G. S.** 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. *Stud. Mycol.* **1**: 1-41.
- Howard, A., R. N'Guessan, C. Koenraadt, A. Asidi, M. Farenhorst, M. Akogbéto, B. Knols y W. Takken.** 2011. First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *J. Malaria* **10**: 24. <http://www.malariajournal.com/content/10/1/24>
- Hung, S. Y. y D. G. Boucias.** Phenoloxidase Activity in Hemolymph of Naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **67**(1): 35-40.
- Humber, R. A.** 2007. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. *Insect Mycol. Curator, ARSEF.* <http://www.sipweb.org/fungi/humber.pdf>
- Humber, R. A.** 1997. Fungi identification. *En: Manual of techniques in insect pathology.* L. A. Lacey (Ed.) Academic Press, San Diego. pp. 153-185.
- Huxham, I. M., K. D. Z. Samuels, J. B. Heale y N. J. McCorkindale.** 1989a. *In vivo* and *in vitro* assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. *J. Invertebr. Pathol.* **53**(2): 143-151.
- Huxham, I. M., A. M. Lackie y N. J. McCorkindale.** 1989b Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on the cellular immunity in insects. *J. Insect Physiol.* **35**: 976105
- Iturralde, M. J.** 2005. Identificación genética de hongos. Sociedad Micológica de Madrid. Disponible en <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias30.html>
- Iwanaga, S. y B. L. Lee.** 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38** (2): 128-50.
- Jackson, M. A., S. Cliquet y L. B. Iten.** 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci. Technol.* **13**: 23-33.

- Jackson, M. A., M. R. McGuire, L. A. Lacey y S. P. Wraight.** 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. **101**: 35-41.
- Jackson, M. A., y R. J. Bothast.** 1990. Carbon concentration and carbon to nitrogen ratio influence submerged culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 3435-3438
- James, R. R., B. A. Croft, B. T. Shaffer y B. Lighthart.** 1998. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid. Environ. Entomol. **27** (6): 1506-1513.
- Jeanson, R. y J. L. Deneubourg.** 2006. Path selection in cockroaches. J. Exp. Biol. **209** (PT 23): 4768-4775.
- Jeffs, L. B., I. J. Xavier, R. E. Matai y G. G. Khachatourians.** 1997. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. J. Can. Microbiol. **45**: 936-948.
- Jegorov, A., P. Sedmera, V. Havlicek y V. Matha.** 1998. Destruxin Ed₁ a cyclopeptide the fungus *Metarhizium anisopliae*. Phytochem. **49** (6): 1815-1817.
- Jiang, H., Y. Wang y M. R. Kanost.** 1998. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. PNAS. **95**: 12220-12225.
- Jomori, T., T. Kubo y S. Natori.** 1990. Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*. Eur. J. Biochem. **190**: 201-206.
- Jomori, T. y S. Natori.** 1992. Function of the lipopolysaccharide-binding protein of *Periplaneta americana* as an opsonin. FEBS Lett. **296**: 283-286.
- Ka ergius, A. y Ma kinait R.** 2005. PCR-based detection and identification of fungi producing trichotecenes in food grains. Botanica Lithuanica. **11**(2): 87-99.
- Ka ergius, A., A. Lugauskas, L. Levinskait , R. Varnait , A. Mankevi ien , B. Bakutis, V. Baliukonien y D. Br k-tien .** 2005. Screening of micromycetes producing toxic substances under various conditions. Botanica Lithuanica. Suppl. 7. pp. 65-75.

- Kamp, E. K. F., G. C. Lara, Á. M. M. Lage, V. Zahner y V. R. E. Pinheiro-Bittencourt.** 2006. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. Parasitol. Res. **98**(4): 324-332.
- Kamp, A. M. y M. J. Bidochka.** 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Lett. Appl. Microbiol. **35**(1): 74-77.
- Kanost, M. R., y M. J. Gorman.** 2008. Phenoloxidases in Insect Immunity. *In: Insect Immunology*. N. Beckage, ed. Elsevier. pp 69-96.
- Kassa, A., M. Brownbridge, B. L. Parker, M. Skinner, V. Gouli, S. Gouli, M. Guo (...), y Hata T.** 2008. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. **112** (5): 5836591.
- kawasaki, K., T. Kubo y S. Natori.** 1996. Presence of the *Periplaneta* lectin-related protein family in the American cockroach *Periplaneta americana*. Insect Biochem. Mol. Biol. **26**: 355-364.
- Kells, S.A., J. T. Vogt, A. G. Appel y G. W. Bennett.** 1999. Nutritional status of in situ populations of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). J. Insect Physiol. **45**: 709-717.
- Kershaw, M. J., E. R. Moorhouse, R. Bateman, S. E. Reynolds y A. K. Charnley.** 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. J. Invertebr. Pathol. **74**: 213-223.
- Kesanakurti, D., P. E. Kolattukudy y P. B. Kirti.** 2012. Fruit-specific overexpression of wound-induced *tap1* under E8 promoter in tomato confers resistance to fungal pathogens at ripening stage. Physiol Plantarum. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01626.x
- Khachatourians, G. G.** 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. *En: Howard, D. H., & J. D. Miller (Eds.). The Mycota. Berlin: Springer, Vol IV: human and animal relationship.* pp 331-364.
- Kirkland, B. H., A. Eisa y N. O. Keyhani.** 2005. Oxalic acid as a fungal acaracidal virulence factor. J. Med. Entomol. **42** (3): 346-351.
- Kirkland, B. H., E. M. Cho y N. O. Keyhani.** 2004. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Biological Control. **31**(3): 414-421.

- Kitabayashi, A. N., T. Arai, T. Kubo y S. Natori.** 1998. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 785-790.
- Kouvelis, V. N., A. Sialakouma y M. A. Typas.** 2008. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. *Mycol. Res.* **112** (7): 829-844.
- Kubo, T. y S. Natori.** 1987. Purification and some properties of a lectin from the hemolymph of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Eur. J. Biochem.* **168**: 68-75.
- Kubo, T., K. Kawasaki y S. Natori.** 1990. Sucrose-binding lectin in regenerating cockroach (*Periplaneta americana*) legs: Its purification from adult hemolymph. *Insect Biochem.* **20**: 585-591.
- Ku era, M. y A. Sam-i áková.** 1968. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **12**(3): 316-320.
- Kulshrestha, V. y S. C. Pathak.** 1997. Aspergillosis in German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Blattoidea: blattellidae). *Mycopathol.* **139**: 75-78.
- Kulshrestha, V. y S. C. Pathak.** 1997. Aspergillosis in german cockroach *Blattella germanica* (L.) (Blattoidea: Blattellidae). *Mycopathol.* **139**: 75-78.
- Lane, B. S., A. P. J. Trinci y A. T. Gillispie.** 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycol. Res.* **95** (7): 829-833.
- Lee, S-Y., N. Ikuo, I. Fumio, K. Hiroshi y N. Takuya.** 2005. Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. *Mycopathol.* **160** (4): 321-325.
- Lee, H. L., K. P. Loong y W. H. Cheong.** 1984. Laboratory studies on the susceptibility of *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health.* **15**: 422-423.
- Lecuona, R. E., M. Turica, F. Tarocco, y D. C. Crespo.** 2005. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. *J. Med. Entomol.* **42**(3): 332-336.

- Lewis, M. W., I. V. Robalino y N. O. Keyhani.** 2009. Uptake of the fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived in vivo hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol.* **155**: 311063120.
- Lohmeyer, K. H. y J. A. Miller.** 2006. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* **99** (6):1943-1947.
- Logrieco, A., A. Moretti, G. Castella, M. Kostecki, P. Golinski, A. Ritieni y J. Chelkowski.** 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3084-3088.
- Lounibos, L. P.** 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Ann. Rev. Entomol.* **47**: 233-266.
- Luo, X., N. O. Keyhani, X. Yu, Z. He, Z. Luo, Y. Pei y Y. Zhang.** 2012. The MAP kinase Bbslt2 controls growth, conidiation, cell wall integrity, and virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Fungal Gen. Biol.* **49**. In press. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184512000801
- ManHong, S. y XingZhong L.** 2005. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathol.* **161**(5): 295-305.
- Maurer, P, Y. Couteaudier, P. A. Girard, P. D. Bridge y G. Riba.** 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* **101**: 159- 164.
- Mazet, I. y D. G. Boucias.** Effects of the fungal pathogen, *Beauveria bassiana* on protein biosynthesis of infected *Spodoptera exigua* larvae. *J. Insect Physiol.* **42**(2): 91-99.
- Mazet, I., S. Y. Hung y D. G. Boucias.** 1994. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. *J. Cell. Mol. Life Sci.* **50**(2): 142-147.
- McCoy, C. W.** 1990. Entomogenous fungi as microbial pesticides. En: Baker RR, Dunn PE, Eds. *New directions in biological control*. New York: A. R. Liss. pp 139-159.
- Meyling, N. V. y J. Eilenberg.** 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol. Control.* **43**(2): 145-155.

- Mendoza, M. da C., M. da F. Santos, R. Silva-Mann y J. M. Ferreira.** 2012. RAPD, microsatellites markers in the genetic diversity characterization of *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. isolates. Trop. & Subtrop. Agroecosyst. **15** (1):117-124.
- Mendoza, A. F.** 1992. Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brazil. *En: C. J. Lomer and C. Prior (Eds.). Biological control of locusts and grasshoppers, proceedings of the international institute of tropical agriculture, Republic of Benin, China.* **29**: 239-244.
- Mills, R. R., S. Androuny y F. R. Fox.** 1968. Correlation of phenoloxidase activity with ecdysis and tanning hormone release in the American cockroach. J. Insect Physiol. **14**(5): 603-611.
- Milner, R. J. y R. M. Pereira.** 2007. Microbial control of urban pests ó cockroaches, ants and termites. *En: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. L. Lacey A. & H. K. Kaya (Eds.). Springer Netherlands.* pp 695-711.
- Miranpuri GS y Khachatourians.** 1991. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. J Entomol Experiment Applicata. **59**(1): 19-27.
- Mitina, G.V., Y. S. Tokarev, A. A. Movila y T. Yli-Mattila.** 2011. Polymorphism of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) strains isolated from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Moldova. Ticks Tick-borne Dis. **2**(1): 50-54.
- Mnyone, L., M. Kirby, M. Mpingwa, D. Lwetoijera, B. Knols, W. Takken, C. Koenraad y T. Russell.** 2011. Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. Biomedical Life Sci. **108**(2): 317-322.
- Mohanty, S. y S. Prakash.** 2008. Laboratory and field evaluation of the fungus *Chrysosporium lobatum* against the larvae of the mosquito *Culex quinque fasciatus*. J. Parasitol. Res. **102**(5):881-886.
- Montesinos-Matías, R., G. Viniestra-González, R. Alatorre-Rosas y O. Loera.** 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Chem. Materials Sci. **27**(9): 2095-2102.

- Monti, S. M., V. Fogliano, A. Logrieco, R. Ferracane y A. Ritien.** 2000. Simultaneous determination of beauvericin, enniatins, and fusaproliferin by high performance liquid chromatography. *J. Agriculture Food Chem.* **48**(8): 3317-332.
- Monzon, A.** 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo integrado de plagas. Costa Rica.* **63**: 95-103.
- Moore, J., M. Freehling y N. J. Gotelli.** 1994. Altered behavior in two species of blattid cockroaches infected with *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala). *J. Parasitol.* **80**: 220-223.
- Moore, W. S. y T. A. Granovsky.** 1983. Laboratory comparisons of sticky traps to detect and control five species of cockroaches (Orthoptera: Blattidae and Blatellidae). *J. Invertebr. Pathol.* **76**(4): 845-849.
- Murali-Mohan, C. H., K. L. Aruna y K. D. Uma.** 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Sci. Technol.* **9**(1): 29-33.
- Mustafa, U. y G. Kaur.** 2010. Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates. *Intern. J. Biotechnol. Biochem.* **6**: 7016713.
- Nation, J. L., B. J. Smittle y K. Milne.** 1995. Radiation-induced changes in melanization and phenoloxidase in Caribbean fruit fly larvae (Diptera: Tephritidae) as the basis for a simple test of irradiation. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **88**: 201-205.
- Neuvéglise, C., Y. Brygoo, B. Vercambre y G. Riba.** 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brognaartii* isolated from insects. *Mycol. Res.* **98**: 322-328.
- Nilanonta, C., I. Masahiko, K. Prasat, P. Prasit, K. Sumalee, P. Daraporn, T., Morakot y T. Yodhathai.** 2000. Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Planta Med.* **66**: 756-758.
- Oppert, B.** 2006. Two dimensional analysis of proteinase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **67**: 173-179.
- Ouedraogo, R. M., M. Cusson, M. S. Goettel y J. Brodeur.** 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Invertebr. Pathol.* **82** (2): 103-109.

- Ormond, E. L., A. P. M. Thomas, P. J. A. Pugh, J. K. Pell y H. E. Roy.** 2010. A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 1466-154.
- Padmavathi, J., K. Uma Devi, C. Uma Maheswara Rao, N. Nageswara y R Reddy.** 2003. Telomere fingerprinting for assessing chromosome number, isolate typing and recombination in the entomopathogen, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Mycol. Res.* **107**: 572-6580.
- Pachamuthu, P., S. T. Kamble y G. Y. Yuen.** 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. *J. Econ. Entomol.* **92**: 340-346.
- Pai, H-H, W-C. Chen y C-F. Peng.** 2004. Cockroaches as potential vectors of nosocomial infections. *Infection Control and Hospital Epidemiol.* **25**(11): 979-984.
- Pai, H-H, Y.C. Ko y Chen E.R.** 2003. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. *Act. Tropica.* **87**(3): 355-359.
- Padn, S., G. Dal Bello y M. Fabrizio.** 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *J. Stored Prod. Res.* **38**(1): 69-74.
- Pathan, A. A. K., K. Uma-Devi, H. Vogel y A. Reineke.** 2007. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. *Fungal Genetics Biol.* **44**(12): 1231-1241.
- Pechal, L. J., J. Austin, R. Gold y J. K. Tomberlin.** 2007. Epidemiology and spatial relationships of bacteria associated with *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) in central Texas. *J. Agricul. Urban Entomol.* **24**: 205-216.
- Peczy ska-Czoch, W., M. J. Urba czyk y S. Ba Gzy.** 1991. Formation of beauvericin by selected strains of *Beauveria bassiana*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **39**(1-2): 175-9.
- Pendland, J. C., S. Y. Hung y D. G. Boucias.** 1993. Evasion of host defense by in vivo-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. *J. Bacteriol.* **175**(18): 5962-5969.

- Pendland, J. C., S. Y. Hung y D. G. Boucias.** 1995. *In vivo* development of the entomogeneous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* (beet armyworm) larvae. *Mycopathol.* **130**(3): 151-158.
- Pham, T. A., J. J. Kim, S. G. Kim y K. Kim.** 2009. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiol.* **37**(3): 218-224.
- Plattner, R. D. y P. E. Nelson.** 1994. Production of beauvericin by a strain of *Fusarium proliferatum* isolated from corn fodder for swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(10): 103894-3896
- Posadas, J. B y R. E. Leucona.** 2009. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **46**(2): 284-291.
- Pridgeon, J. W., A. G. Appel, W. J. Moar y L. Nannan.** 2002. Variability of resistance mechanisms in pyrethroid resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Pest. Biochem. Physiol.* **73**(3): 149-156.
- Quesada-Moraga, E., E. A. A. Maranhao, P. Valverde-García, y C. Santiago-Álvarez.** 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biol. Control.* **36**(3): 274-287.
- Quesada-Moraga, E., R. Santos-Quirós, P. Valverde-García y C. Santiago-Álvarez.** 2004. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.* **87**: 51-58.
- Ramoska, W. A. y T. Todd.** Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae) as a result of feeding activity on selected host plants. *Environ Entomol.* **14**(2): 146-148.
- Rangel, D. E. N., D. G. Alston y D. W. Roberts.** 2008. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol. Res.* **112**(11): 1355-1361.

- Rheins, L. A. y R. D. Karp.** 1985. Effect of gender on the inducible humoral immune response to honeybee venom in the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Dev. Comp. Immunol.* **9**: 416-49.
- Rehner, S. A., A. M. Minnis, G. H. Sung, J. J. Luangsaard, L. Devotto y R. A. Humber.** 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycol.* **103**(5): 1055-1073.
- Rehner, S. A. y E. Buckley.** 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycol.* **97**: 846-98.
- Reddy-Parine, N., A. A. Khan Pathan, Sarayu B, V. Sudha Nishanth y V. Bobbarala.** 2010. Antibacterial efficacy of secondary metabolites from entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Internat. J. Chem. Analyt. Sci.* **1**(5): 94-96.
- Ritieni, A., A. Moretti, A. Logrieco, A. Bottalico, G. Randazzo, S. M. Monti, R. Ferracane y V. Fogliano.** 1997. Occurrence of fusaproliferin, fumonisin B₁, and beauvericin in maize from Italy. *J. Agric. Food Chem.* **45** (10): 4011-4016.
- Robb, T. y M. R. Forbes.** 2006. Age-dependent induction of immunity and subsequent survival costs in males and females of a temperate damselfly. *BMC Ecology.* **6**:15.
- Rolf, J.** 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Fungal Gen. Biol.* **46**(5): 353-364.
- Ruiz-González, M. X., Y. Moret y M. J. F. Brown.** 2009. Rapid induction of immune density-dependent prophylaxis in adult social insects. *Biol. Lett.* **5**: 781-783.
- Rust, M. K., D. D. A. Reiersen y K. H. Hansgen.** 1991. Control of American cockroaches (Dictyoptera: Blattidae) in sewers. *J. Med. Entomol.* **28**(2): 210-213.
- Safavi, S. A., F. A. Shah, A. K. Pakdel, G. Reza-Rasoulian, A. R. Bandani y T. M. Butt.** 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol Lett.* **270**:116-23.
- Sahab, A. F.** 2012. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi. *J. Appl. Sci. Res.* **8**(3): 1441-1444.
- Salecker, I. y J. Boeckh.** 1995. Embryonic development of the antennal lobes of a hemimetabolous insect, the cockroach *Periplaneta americana*: light and electron microscopic observations. *J. Comp. Neurol.* **352**: 336-54.

- Salehzadeh, A., P. Tavacol y H. Mahjub.** 2007. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. *J. Vector Borne Dis.* **44**:105-110.
- Samson, R.A., H.C. Evans y J. P. Latgé.** 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. New York, USA. pp187.
- Schal, C., Gautier, J. Y. y W. J Bell.** 1984. Behavioural ecology of cockroaches. *Biol. Rev.* **59**: 209-254.
- Scharf, M. E., G. W. Bennett, B. L. Reid y Ch. Qui.** 1995. Comparisons of three insecticide resistance detection methods for the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econom. Entomol.* **88**(3): 536-542.
- Schmid-Hempel, P.** 2003. Variation in immune defense as a question of evolutionary ecology. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **270**: 357-366.
- Schmid-Hempel, P.** 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Ann. Rev. Entomol.* **50**: 529-551.
- Schwarzenbach, G. A., D. J. Hosken y P. I. Ward.** 2005. Sex and immunity in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. *J. Evol. Biol.* **18**:455-463.
- Scott, J. G., D. G. Cochran y B. D. Siegfried.** 1990. Insecticide toxicity, synergism, and resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* **83**(5): 1698-1703.
- Shafiq, A. M, A. Nadeem y H. Fazil.** 2012. Potential of Biopesticides in Sustainable Agriculture. En: Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. M. Abdul y G. Elisabeth (Eds). Serie: Strategies for Sustainability. Springer Netherlands. ISBN: 978-94-007-1591-2. pp: 529-595.
- Slepneva, I. A., D. A. Komarov, V. V. Glupov, V. V. Serebrov y V. V Khramtsov.** 2003. Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* **300** (1): 188-191
- Smith, L. M., A. G. Appel, T. P. Mack, G. J. Keever y E. P. Benson.** 1997. Evaluation of methods of insecticide application for control of smokybrown cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* **90**(5): 1232-1242.
- Smith, R. J. y E. A. Grula.** 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **37**(3): 222-230.

- Smith, R. J., S. Pekar y E. A. Grula.** 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* **38**(3): 335-344.
- Smicht, M. R., A. C. Brockmann, W. W. Pirk, D. W. Stanley y J. Tautz.** 2007. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Can. J. Zool.* **79**(12): 2176-2180.
- Söderhäll, K. y L. Cerenius.** 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 23-28.
- Song, T.-T. y M.-G. Feng.** 2011. *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *J. Invertebr. Pathol.* **106**: 211-216.
- Song, H.-H., H.-S. Lee, G.-P. Lee, S.-D. Ha y C. Lee.** 2009. Structural analysis of enniatin H, I, and MK1688 and beauvericin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and their production by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. *Food Additives & Contaminants: Part A* **26**(4): 518-526.
- SPSS 17 for Windows.** 2008. Statistical Package for the Social Sciences. IBM-SPSS Inc.
- Srivastava, Ch. N., P. Maurya, P. Sharma y L. Mohan.** 2009. Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomol Res.* **39**(6): 341-355.
- Stamets, P. E.** 2003. Mycopesticides. US Patent 6660290.
- Stentelaire, C., N. Antoine, C. Cabrol, G. Feron y A. Durand.** 2001. Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. *Enzyme Microbial. Technol.* **29**(869): 560-566.
- Stimac, J. L. y R. Pereira.** 2006. Methods and formulations for control of pests. US patent RE38, 958.
- St Leger, R.J., L.L. Allee, B. May, R.C. Staples y D.W. Roberts.** 1992. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycol. Research.* **96** (12): 1007-1015.
- St Leger, R. J., L. Joshi, M. J. Bidochka, N. W. Rizzo y D. W. Roberts.** 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (3): 907-912.

- Strasser, H., S. Hutwimmer y W. Burgstaller.** 2011. Metabolite toxicology of fungal biocontrol agents. *En: Regulation of biological control agents.* R.H. Elhers (Ed.) Parte 2: pp 191-213.
- Strasser, H., A. Vey y T. M. Butt.** 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolytocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Sci. Technol.* **10**(6): 717-735.
- Sugumaran, M.** 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell. Res.* **15**: 2-9.
- Sun, S. C., I. Lindstrom, H. G. Boman, I. Faye y O. Schmidt.** 1990. Hemolin: An insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science.* **250**: 1729-1732.
- Sun, J., J. R. Fuxa y G. Henderson** 2003. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *J. Invertebr. Pathol.* **84** (1): 38-46.
- Suresh, P. V. y M. Chandrasekaran.** 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. *Process Biochem.* **34**(3): 257-267.
- Tachbele, E., W. Erku, T. Gebre-Michael y M. Ashenafi.** 2006. Cockroach-associated foodborne bacterial pathogens from some hospitals and restaurants in Addis Ababa, Ethiopia: distribution and antibiograms. *J. Rural Trop. Pub. Health.* **5**:34-41.
- Takahashi, S., K. Uchida, N. Kakinuma, R. Hashimoto, T. Yanagisawa y A. Nakagawa.** 1998. The structures of pyridovericin and pyridomacrolidin, new metabolites from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* *J. Antibiot.* **51** (11): 1051-1054.
- TalaeióHassanloui, R., A. Kharazi-Pakdel, M. Goettel y J. Mozaffari.** 2006. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Sci. Technol.* **16**(5): 525-534.
- Tanada, Y. y H. Kaya.** 1993. *Insect pathology.* Academic Press. San Diego, CA. (USA). pp 666.
- Tatfeng, Y. M., M. U. Usuanlele, A. Orukpe, A. K. Digban, M. Okodua, F. Oviasogie y A. A. Turay.** 2005. Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches. *J. Vect. Borne Dis.* **42**: 1296134

- Thakur, R., R. C. Rajak y S. S. Sandhu.** 2005. Biochemical and molecular characteristics of indigenous strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* of Central India. *Biocontrol Sci Technol.* **15**(7): 733-744
- Thakur, R. A. y J. S. Smith.** 1997. Liquid chromatography/thermospray/mass spectrometry analysis of beauvericin. *J. Agric. Food Chem.* **45** (4): 123461239.
- Toledo, A. V., A. M. M. de Remes-Lenicov y C. C. López-Lastra.** 2007. Pathogenicity of fungal isolates (Ascomycota: Hypocreales) against *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae), and *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of corn diseases. *Mycopathol.* **163**: 2256232.
- Thomas-Guyon, H., B. Gagnaire, A. Bado-Nilles, K. Bouilly, S. Lapegue y T. Renault.** 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* **33**: 653-659.
- Tompkins, D. M., A. M. Dunn, M. J. Smith y S. Telfer.** 2011. Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. *J. Animal Ecol.* **80**:19-38.
- Torres, J., H. Romero, A. Santiago y C. R. Apitz.** 2006. Susceptibilidad *in Vitro* de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **26**(1):42-47.
- Tucker, M. y L. Stevens.** 2003. Geographical variation and sexual dimorphism of phenoloxidase levels in Japanese beetles (*Popillia japonica*). *Biol. Sci.* **270**: S245-S247.
- Uribe, D. y G. G. Khachatourians.** 2004. Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveals high intraspecific variation. *Micol. Res.* **108** (9): 1070-1078.
- Urtz, B. E. y W. C. Rice.** 1997. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptus oryophilus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 4056 409.
- Valadez-Lira, J. A., J. M. Alcocer-Gonzalez, G. Damas, G. Nuñez-Mejía, B. Oppert, C. Rodriguez-Padilla y P. Tamez-Guerra.** 2012. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran pests after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Sci.* 12:80 available online: www.insectscience.org/12.80.

- Valencia, J., G. Bustamante, A. A. Jiménez y M. Grossi-de-Sá.** 2011. Cytotoxic activity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: an intraspecific evaluation of beauvericin production. *Biomed. Life Sci.* **63**(3):306-312.
- Valles, S. M., P. G. Koehler y R. J. Brenner.** 1997. Antagonism of fipronil toxicity by piperonyl butoxide and *S,S,S*-tributyl phosphorotrithioate in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econom. Entomol.* **90**(5): 1254-1258
- Vey, A. y J. Fargues.** 1977. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. *J. Invertebr. Pathol.* **30**(2): 207-215.
- Vey, A., R. E. Hoagland y T. M. Butt.** 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *En: Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential.* Butt, T. M., C. Jackson, & N. Magan (Eds.) CABI Publishing, Wallingford, UK, pp- 311-346.
- Vilcinskis, A., y P. Götz.** 1993. Parasitic Fungi and their Interactions with the Insect Immune System. *En: Advances in Parasitology.* J.R. Baker, R. Muller & D. Rollinson (Eds.). Academic Press. **43**:267-313.
- Vilcinskis, A., V. Matha y P. Götz.** 1997a. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *J. Insect Physiol.* **43** (5): 475-483.
- Vilcinskis, A., V. Matha y P. Götz.** 1997b. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol.* **43** (12): 1149-1159.
- Vilmos, P. y E. Kurucz.** 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* **62**:59-66.
- Vuillemin, P.** 1912. *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **29**: 34-40.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols. *En: M. INNIS, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White, (Eds.) Academic Press, San Diego.* pp. 3 15-322.

- Wakil, W., T. Riasat, M. U. Ghazanfar, Y. J. Kwon y F. A. Shaheen.** 2011. Aptness of *Beauveria bassiana* and enhanced diatomaceous earth (DEBBM) for control of *Rhyzopertha dominica* F. Entomol. Res. **41**(6): 233-241.
- Wang, S., X. Miao, W. Zhao, B. Huang, M. Fan, Z. Li y Y. Huang.** 2005. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). Mycol. Res. **109**(12): 1364-1372.
- Wang, Q. y L. Xu.** 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. Molecules. **17**(3): 2367-2377.
- Waseem, A., J. C. Lord, J. R. Nechols y R. W. Loughin.** 2005. Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. J. Econ. Entomol. **98**: 683-688.
- Waseem, A., J. C. Lord, J. R. Nechols y R. W. Howard.** 2004. Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. J. Econ. Entomol. **97**: 273-280.
- Wasti, S. S. y G. C. Hartmann.** 1975. Experimental parasitization of larvae of the gypsy moth, *Porthetria dispar* (L.), with the entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Parasitol. **70**: 341-346.
- Watanabe, N., M. Hattori, E. Yokoyama, S. Isomura, M. Ujita y A. Hara.** 2006. Entomogenous fungi that produce 2,6-pyridine dicarboxylic acid (dipicolinic acid), J. Biosci. Bioeng. **102**(4): 365-368.
- Wei, Y., A. G. Appel, W. J. Moar y N. Liu.** 2001. Pyrethroid resistance and cross-resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). Pest Manag. Sci. **57**: 1055-1059.
- Wei-Bing, S. y F. Ming-Guang.** 2004. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. Biol. Control. **30** (2): 165-173
- Wen, Z. y J. G. Scott.** 1997. Cross-Resistance to Imidacloprid in Strains of German Cockroach (*Blattella germanica*) and House Fly (*Musca domestica*). Pest. Sci. **49**(4): 367-371.
- Wessels, J. G. H.** 1999. Fungi in their own right. Fungal Genet. Biol. **27**: 134-145.

- Whitehead, D. L.** 2011. Haemocytes play a commensal rôle in the synthesis of the dihydroxybenzoate required as a precursor for sclerotization of the egg case (ootheca) in the cockroach *Periplaneta americana* (L). *Bull. Entomol. Res.* **101**:251-258.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski y S. V. Tingy.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.
- Wraight, S.P., M.A. Jackson y S. L. Dekock.** 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: *fungi as biocontrol agents*, Butt, T. M., C.Jackson, y N. Magan, (Eds.). CABI Publishing, Willingford, Oxon, United Kingdom. pp 253-288.
- Wraight, S. P., M. E. Ramos, P. B. Avery, S. T. Jaronski y J. D. Vandenberg.** 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *J. Invertebr. Pathol.* **103**(3): 186-199.
- Wright, M. S., W. L. A. Osbrink y A. R. Lax.** 2002. Transfer of entomopathogenic fungi among formosan subterranean termites and subsequent mortality. *J. Appl. Entomol.* **126** (1): 20-23.
- Xu, Y., R. Orozco, E. M. Kithsiri-Wijeratne, A. A. L. Gunatilaka, S. P. Stock e I. Molnar.** 2008. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem. Biol.* **15**(9): 898-907.
- Xu, Y., R. Orozco, E.M. Kithsiri-Wijeratne, P. Espinosa-Artiles, A. A. L. Gunatilaka, S. P. Stock e I. Molnár.** 2009. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Gen. Biol.* **46**(5): 353-364.
- Xu, L., J. Wang, J. Zhao, P. Li, T. Shan, J. Wang, X. Li y L. Zhou.** 2010. Beauvericin from the endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from *Dioscorea zingiberensis* and its antibacterial activity. *Nat. Prod. Commun.* **5**(5): 811-814.
- Y-Zhu, P. M. L. N., L. Wang, B. Ho y J. L. Ding.** 2006. Diversity in lectins enables immune recognition and differentiation of wide spectrum of pathogens. *Int. Immunol.* **18**: 1671-1680.
- Zarchi, A. A. K. y H. Vatani.** 2008. A survey on species and prevalence rate of bacterial agents isolated from cockroaches in three hospitals. *Vector-Borne Zoo. Dis.* **9**:197-200.

- Zhao, P. C., J. J. Li, Y. Wang y H. B. Jiang.** 2007. Broad-spectru antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem. Mol.* **37**: 952-959.
- Zimmermann, G.** 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* **17**: 553-596.
- Zukowski, K.** 1993. Laboratory studies of the usefulness of biopreparation dipel in reducing the German cockroach (*Blattella germanica* L.) population. *Rocz Panstw Zakl Hig.* **44**: 227-230.
- Zukowski, K.** 1994. Testing effectiveness of selected bio-insecticides for reducing the population of cockroaches (*Blattella germanica* L.). *Rocz Panstw Zakl Hig.* **45**: 139-144.
- Zukowski, K.** 1995. Laboratory examination of the effectiveness of new biological preparations for reducing populations of cockroaches (*Blattella germanica* L.). *Rocz Panstw Zakl Hig.* **46**: 293-297.
- Zukowski, K. y C. Bajan.** 1996. Studies of the usefulness of *Beauveria bassiana* for eradication of cockroaches (*Blattella germanica* L.). *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **47**(3): 343-349.
- Zukowski, K. y C. Bajan.** 1997. Laboratory determination of the activity of insecticidal fungus *Paecilomyces farinosus* in reducing the numbers of cockroaches *Blattella germanica* L. *Rocz. Panst. Zakl. Hig.* **48**(2): 133-138.
- Zukowski, K., C. Bajan y E. Popowska-Nowak.** 1999. The effect of infestation by mixed culture of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* on reduction in numbers of experimental culture *Blattella germanica* L. *Rocz. Panst. Zakl. Hig.* **50** (3): 321-327.
- Zurek, L., L. J. C. Gore, S. M. Stringham, D. W. Watson, M. G. Waldvogel y C. Schal.** 2003. Boric acid dust as a component of an integrated cockroach management program in confined swine production. *J. Econ. Entomol.* **96**: 1362-1366.

ANEXO 1

