



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
POSGRADO EN FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“INMUNIDAD DE DOS MODELOS DE INSECTO A UNA  
CEPA SILVESTRE Y UNA MUTANTE DE  
*Beauveria bassiana*”**

NICOLAS GREGORIO MARTINEZ JACINTO

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

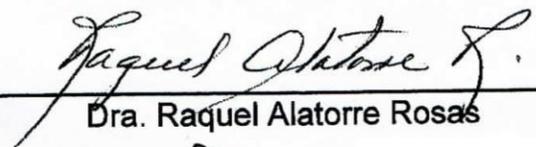
MONTECILLO, TEXCOCO EDO. DE MEXICO

2014

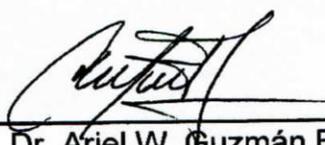
La presente tesis titulada: **INMUNIDAD DE DOS MODELOS DE INSECTO A UNA CEPA SILVESTRE Y UNA MUTANTE DE *Beauveria bassiana***, realizada por el alumno Nicolás Gregorio Martínez Jacinto Bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

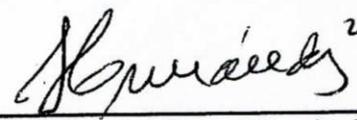
**MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERO**   
Dra. Raquel Alatorre Rosas

**ASESOR**   
Dra. Obdulia Lourdes Segura León

**ASESOR**   
Dr. Ariel W. Guzmán Franco

**ASESOR**   
Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

Montecillo, Texcoco Edo. de México, Abril de 2014.

**INMUNIDAD DE DOS MODELOS DE INSECTO AL HONGO *Beauveria bassiana*  
Bb 88 Y SU MUTANTE Bb 884.5**

Nicolás Gregorio Martínez Jacinto, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2014.

El objetivo de esta investigación fue estudiar la respuesta inmune de los lepidópteros *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*, hacia la infección de dos cepas, uno silvestre (Bb 88) y un aislamiento mutante resistente a 2-Desoxi-D-Glucosa (Bb 884.5) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Primero se estimó la DL<sub>50</sub> de (blastosporas/larva) de ambos aislamientos hacia larvas de último estadio de ambas especies de insectos. Posteriormente, usando las DL<sub>50</sub> estimadas para cada aislamiento, se inocularon larvas de ambas especies y se estimó la actividad de la fenoloxidasa (FO). La virulencia de ambos aislamientos fue similar para *S. frugiperda*, pero diferente para *G. mellonella*, donde el aislamiento silvestre fue más virulento ( $1 \times 10^2$  blastosporas/larva) comparado con la cepa mutante ( $1.7 \times 10^2$  blastosporas/larva). Al estimar la actividad de la FO, esta fue similar entre todos los tratamientos (inoculados con ambos aislamientos y un testigo) en larvas de *S. frugiperda*; para el caso de las larva de *G. mellonella*, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con hongo y testigo, pero ninguna diferencia entre larvas inoculadas con ambos aislamientos de *B. bassiana*. Nuestros resultados sugieren que la especie de insecto tiene un mayor efecto en la actividad de la FO que diferentes aislamientos del mismo hongo. Las implicaciones de estos resultados en la interacción hongo - insecto es discutida.

**IMMUNITY OF TWO MODELS OF THE FUNGUS INSECT *Beauveria bassiana* Bb  
Bb 88 AND MUTANT 884.5**

Nicolás Gregorio Martínez Jacinto, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014.

The objective of this research was to study the immune response of *Spodoptera frugiperda* and *Galleria mellonella*, to the infection of two strains, one wild (Bb 88) and a mutant strain resistant to 2-deoxy- D- glucose (Bb 884.5) of the fungus *Beauveria bassiana*. First the LD<sub>50</sub> (blastospores/larva) of both strains to last instar larvae of both species of insects was estimated. Subsequently, using the estimated LD<sub>50</sub> of each isolate, larvae of both species were inoculated and phenoloxidase activity (PO) was estimated. The virulence of both strains was similar to *S. frugiperda*, but different for *G. mellonella*, where the wild strain was more virulent ( $1 \times 10^2$  blastospores/larva), compared with the mutant strain ( $1.7 \times 10^2$  blastospores/larva). Estimating the PO activity, this was similar among all treatments (inoculated with both strains and a control) in larvae of *S. frugiperda*; in the case of the *G. mellonella* larvae, significant differences between treatments with fungus and control were found, but no difference between larvae inoculated with both strains of *B. bassiana*. Our results suggest that the species of insect has a greater effect on the activity of the PO than different isolates of the same fungus. The implications of these results on the interaction fungus - insect are discussed.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad para el desarrollo del trabajo dentro de sus instalaciones.

Al Dr. Jhony Navat Enriquez Vara, por todo su apoyo, orientación y conocimientos brindados, por nunca perder la esperanza y siempre creer en mi.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por su apoyo y comprensión y siempre alentarme a la culminación de este trabajo.

Al Dr. Ariel Guzmán Franco por el apoyo y el tiempo del análisis estadístico de los datos de la tesis.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por su apoyo en sus consejos y la revisión y comentarios muy acertados del escrito.

Al Dr. Concepción Rodríguez Maciel, a Jorge Zambrano y a Manuel del laboratorio de Toxicología por la facilidad de las larvas.

A Miguel Hesiquio, Esther Riveroll, Manuel Hernández, Sonia Contreras y Jorge Hernández por su apoyo incondicional, por sus acertados consejos.

A la empresa Koppert de México y al Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Hidalgo por darme la oportunidad del desarrollo profesional

## **DEDICATORIA**

A mi madre Emily Jacinto y a mi Padre Miguel Martínez a mis hermanos Lulú, Ángel, Rich, Gloria y Malena por la paciencia y apoyo incondicional para alcanzar mis metas, muchas gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio, Jhony, Jorge, Nuvia, Fabián, Santo, Erika, Alberto, Alex y Jorge Zambrano por hacer mi estancia más llevadera en el laboratorio.

A ti mi Pau, por tu apoyo incondicional, por tu amor, cariño y comprensión y por darme animo, muchas gracias por todo, tienes una gran familia no lo olvides.

Agradecido con la forma más sublime de la inteligencia universal que hasta ahora me ha permitido llegar hasta donde ahora estoy, a ti mi Dios por darme la oportunidad de seguir adelante.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>DEDICATORIA</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	x
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 hipótesis .....	5
1.2. Objetivo general .....	5
1.3. Objetivos específicos .....	5
<b>II. REVISION DE LITERATURA</b> .....	6
2.1. Mecanismos de defensa de los lepidópteros .....	6
2.2. Respuesta inmune humoral .....	7
2.2.1. Melanización .....	9
2.2.2. Péptidos antimicrobianos (AMPs) .....	11
2.2.3. Cecropinas .....	12
2.2.4. Defensinas .....	13
2.3. Respuesta inmune celular .....	14
2.3.1. Fagocitosis .....	14
2.3.2. Encapsulación .....	15
2.3.4. Nodulación .....	16
2.4. Pared celular de los hongos entomopatógenos .....	16
2.4.1. Quitina .....	17
2.4.2. Glicoproteínas .....	18
2.4.3. Glucano .....	18

2.5. Otras generalidades de los hongos.....	20
2.5.1. Enzimas .....	21
2.5.2. Toxinas .....	21
2.6. Antecedentes del Hongo Bb 88 y su mutante Bb 884.5 .....	22
2.6.1. Resistencia a la 2-DG .....	23
2.6.2. Perfil enzimático.....	24
<b>III. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. Insectos .....	25
3.2. Producción de blastoesporas.....	25
3.3. Determinación de la DL <sub>50</sub> .....	26
3.3.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	26
3.3.2. <i>Galleria mellonella</i> .....	27
3.4. Respuesta inmunitaria después de inocular la DL <sub>50</sub> .....	28
3.5. Extracción de hemolinfa.....	28
3.6. Medición de la actividad de la fenoloxidasa (FO).....	29
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. Determinación de la DL <sub>50</sub> .....	30
4.2. Actividad de la Fenoloxidasa (FO).....	32
4.2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	32
4.2.2. <i>Galleria mellonella</i> .....	33
<b>V. DISCUSION.....</b>	<b>34</b>
<b>VI. CONCLUSION.....</b>	<b>37</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>38</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Figura 1. Proceso general de infección de los hongos entomopatógeno. 1) reconocimiento de la espora con el hospedante 2). Formación del apresorio y crecimiento de hifas para cruzar la epicutícula. 3) Desarrollo de cuerpos hifales para la penetración de la cutícula y epidermis. 4) formación de blastoesporas que se desarrollan e invaden la hemolinfa.....	2
<b>Figura 2.</b> Sistemas de reconocimiento, activación de cascadas de señalización, vías regulatorias y producción de moléculas efectoras.....	7
<b>Figura 3.</b> Respuesta inmune celular y humoral que se expresan en los insectos cuando son expuestos a insecticidas sintéticos, botánicos y microorganismos. Los cuadro con líneas solidas y flechas, representan un esquema del sistema inmune del insecto. Las cuadros y flechas identifican donde los insecticidas han sido documentados y que afectan la respuesta inmune particular.....	10
<b>Figura 4.</b> Proceso de melanización. A) Reconocimiento del patógeno a través de molecular específicas. B) Movilización de hemocitos que rodean al cuerpo extraño. C) Deposición de grandes cantidades de hemocitos sobre el cuerpo extraño. D) encapsulación y muerte del patógeno por inanición.....	10
<b>Figura 5.</b> Cuatro tipos diferentes de hemocitos que están involucrados directamente en la inmunidad de insectos Los lepidópteros en su etapa larval como <i>Pseudoplusia includens</i> , <i>Manduca sexta</i> y <i>Bombyx Mori</i> contienen cuatro tipos de hemocitos diferentes en circulación: los granulocito fagocíticos, los Oenocitoides que contienen FO, células esferuladas y formación de capsulas de plasmatocitos. Órganos hematopoyéticos son los que contienen los prohemocitos que maduran principalmente en plasmatocitos. Los granulocitos y otros tipos de hemocitos diferenciados también proliferan en circulación.....	15
<b>Figura 6.</b> Esquema de la pared celular de <i>Sacharomices cerevisiae</i> y <i>Candida albicans</i> . Los polisacáridos de la pared están representados en diferentes colores: quitina (rojo) $\beta$ -1,3-D-glucano (verde), $\beta$ -1,6-D-glucano (azul) y mananos (negro). La proteínas están representadas por rectángulos de color naranja. Las subunidades de la $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa en la membrana plasmática están coloreadas en verde.....	17
<b>Figura 7.</b> Biosíntesis de la pared celular, el glucano y los componentes de la quitina se sintetizan en la membrana plasmática. La síntesis de la glicoproteína se inicia en el retículo endoplasmático. En el aparato de Golgi se modifican las glucosiltransferasas modificando aún más las proteínas adicionando azúcares por lo general oligosacáridos O-ligados y N-enlazados .....	19
<b>Figura 8.</b> Aplicador con la microgeringa para la inyección de blastoesporas del hongo entomopatógeno en larvas de <i>S. frugiperda</i> y <i>G. mellonella</i> .....	27

<b>Figura 9.</b> Mortalidades acumuladas causadas por blastoesporas de las dos cepas del hongo en larvas del gusano cogollero <i>S. frugiperda</i> . Las líneas representan la tendencia de la mortalidad para cada hongo.....	30
<b>Figura 10.</b> Mortalidad acumulada por inoculación de blastoesporas de las dos cepas del hongo sobre larvas de la palomilla de la cera <i>G. mellonella</i> . Las líneas representan la tendencia de la mortalidad para cada hongo .....	31
<b>Figura 11.</b> Actividad de la fenoloxidasa de la hemolinfa de <i>S. frugiperda</i> . Las barras representan el primer y tercer cuartil de la actividad de la fenoloxidasa del gusano cogollero. La línea central indica la mediana. Las barras de error representan los valores máximos y mínimos. ....	32
<b>Figura 12.</b> Actividad de la fenoloxidasa de la hemolinfa de <i>G. mellonella</i> . Las barras representan el primer y tercer cuartil de la actividad de la fenoloxidasa de la palomilla de la cera. La línea central indica la mediana. Las barras de error representan los valores máximos y mínimos.....	33

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Caracterización morfológica y fisiológica de la cepa silvestre en relación a su mutante resistente al compuesto 2DG .....	23
<b>Cuadro 2.</b> Cuantificación de enzimas que fueron secretadas en un medio mínimo con cutícula de <i>T. molitor</i> como única fuente de carbono nitrógeno.....	24
<b>Cuadro 3.</b> Estimación de los valores de la DL <sub>50</sub> para cada aislamiento sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> y <i>G. mellonella</i> . Estos valores fueron los que se emplearon para cada determinación de la actividad de la FO.....	31

## I. INTRODUCCIÓN

A la fecha se considera que los invertebrados carecen de un sistema inmune adaptativo y sólo poseen un sistema innato bien desarrollado con el cual hacen frente a una gran variedad de patógenos (Madigan *et al.*, 2012) heridas, respuesta al estrés y en la regulación de las poblaciones de microorganismos simbioses (Beckage, 2008). La versatilidad de la respuesta innata es promovida por la capacidad que tienen los insectos para colonizar diferentes nichos ecológicos en todo el planeta (Loker *et al.*, 2004). Los lepidópteros se encuentran dentro de las plagas agrícolas más importantes del mundo y comprender su sistema inmune puede aportar conocimiento para ayudar a la regulación de sus poblaciones (Jiang *et al.*, 2010).

En los programas de manejo integrado de plagas, se emplean microorganismos como el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill., para mitigar el uso de insecticidas sintéticos (Luna y House, 1990; Zimmerman, 2007). Estos hongos en su fase de conidia tienen paredes celulares compuestas de quitina, proteínas de tipo hidrofóbica, entre otras moléculas y algunas de ellas forman parte de sistemas de reconocimiento específico como las hemaglutininas (glicoproteínas) y la glucosa (Boucias y Pendland, 1998). Las esporas una vez que entran en contacto con la cutícula (Figura 1), activan toda una maquinaria de proteasas, quitinasas y lipasas que ayudan a la hidrólisis y despolimerización de la cutícula del insecto (St. Leger, 1995). Después que el hongo penetra al insecto se forman estructuras llamadas blastoesporas, hifas o protoplastos (fase levaduriforme) que van a ser los encargados de invadir el cuerpo del insecto (Vinson, 1991; Zimmermann, 2007).

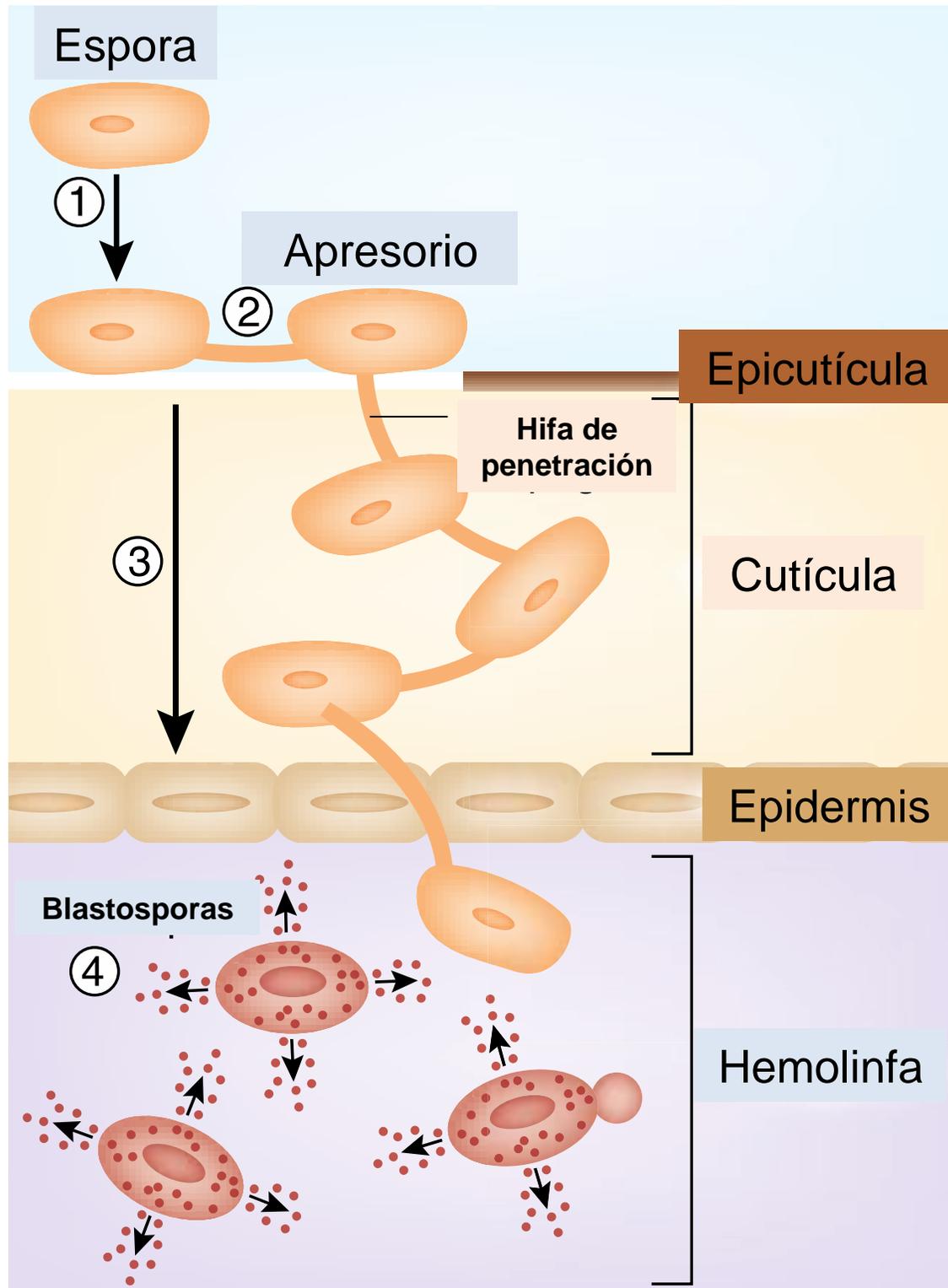


Figura 1. Proceso general de infección de los hongos entomopatógenos. 1) Reconocimiento de la espora con el hospedante. 2) Formación del apresorio y crecimiento de hifas para cruzar la epicutícula. 3) Desarrollo de cuerpos hifales para la penetración de la cutícula y epidermis. 4) Formación de blastosporas que se desarrollan e invaden la hemolinfa (Tomas y Read, 2007).

Cuando el microorganismo ha superado las barreras estructurales, el insecto desencadena una respuesta defensiva que tiende a la neutralización o en su caso a la eliminación del agente externo (Wojda *et al.*, 2009); esta respuesta está dada por una respuesta celular, la cual consiste en la activación y movilización de hemocitos que encapsulan al organismo invasor y otra humoral que se manifiesta por la expresión de péptidos antimicrobianos (Schmid-Hempel, 2005; Levitin y Whiteway, 2008). Una de las desventajas que presentan los hongos entomopatógenos para ser usados en el control de plagas es que requieren de un tiempo mayor que los insecticidas sintéticos para causar mortalidad al insecto plaga (Fan *et al.*, 2007), por ello se busca incrementar la virulencia por medio de la manipulación genética, que puede ser por mutagénesis clásica (Meirelles *et al.*, 1997), por recombinación parasexual (Couteaudier *et al.*, 1996) e inserción de genes, con herramientas moleculares (St. Leger *et al.*, 1996a).

El uso de hongos entomopatógenos transformados genéticamente, aun presenta incertidumbre; pues no se sabe el efecto que podría causar en el agroecosistema donde son liberados. Diferentes autores haciendo énfasis en la contaminación que se podría causar al medio ambiente con estos cambios genéticos de los hongos entomopatógenos, han observado que al sobreexpresar ciertos genes, se exagera la respuesta inmune del insecto al conferir velocidad para matar a su hospedante. Esta reacción se lleva a cabo al sobreactivar la cascada de la serina proteasa por la presencia de compuestos microbianos, que a su vez conduce a la activación del zimógeno profenoloxidasa (ProFO) por la acción de las proteínas (PAP) de activación de la ProFO (Jiang y Kanost, 2000; Piao *et al.*, 2005). El proceso biológico de la esporulación no ha sido posible, esto debido a que en la hemolinfa en donde se desarrolla el hongo se vuelve muy tóxico y con ello se evita la diseminación del hongo transgénico al medio ambiente (Cerenius y Söderhäll 2004 Wang y St Leger, 2007; Kim *et al.*, 2013).

Con el objetivo de obtener cepas mutantes del hongo *B. bassiana* Montesinos-Matías *et al.*, (2011) usaron la técnica de mutación clásica (exposición a la radiación UV) y la selección por resistencia al compuesto 2-desoxiglucosa (2-DG) las cuales se ha mostrado que aumentan sus características de virulencia (Robledo-Moterrubio *et al.*, 2009).

El compuesto 2DG es tóxico para la mayoría de los hongos y se ha visto que los hace menos sensibles a la represión catabólica por carbono (Jin *et al.*, 2011), entra a la célula por medio de los mismos transportadores de la glucosa, y al ser fosforilado, da origen al compuesto 2DG-6-P, molécula altamente tóxica (Randez-Gil *et al.*, 1995).

Los mecanismos de resistencia al compuesto se han relacionado con la desrepresión de enzimas hidrolíticas y quitinolíticas que se requieren para la degradación de carbohidratos complejos (Allen *et al.*, 1989; Loera *et al.*, 1999; Loera y Córdova, 2003), alteración de patrones de esporulación y crecimiento radial (Loera y Viniegra-González, 1998). En ese trabajo se obtuvo la cepa Bb 884.5 que aumenta la producción de la proteasa Pr1 (49 % superior a la cepa silvestre), esta es una de las proteasas más importantes para la degradación de la cutícula (St Leger *et al.*, 1986). Actualmente no se conoce el efecto que causa esta cepa mutante cuando penetra en el hemocele, por lo que la presente investigación se propone analizar la virulencia de la cepa mutante en los insectos *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella* y si la sobreproducción de proteasa Pr1 afecta la producción de FO.

## **1.1 hipótesis**

La sobreproducción de la proteasa Pr1 de la cepa mutante Bb 884.5 de *B. bassiana* puede sobreactivar la producción de la FO.

## **1.2. Objetivo general**

Comparar la actividad de la FO en insectos inoculados con dos cepas, mutado y silvestre, de la misma especie de hongo entomopatógeno, en dos especies de insecto con diferente susceptibilidad a la infección.

## **1.3. Objetivos específicos**

- ✓ Medir la virulencia de la cepa silvestre Bb 88 y de la mutante derivada Bb 884.5 en larvas del gusano cogollero *S. frugiperda* y en la palomilla de la cera *G. mellonella*.
- ✓ Comparar la actividad de la FO en los dos modelos de insecto infectados con blastoesporas como parámetro de la respuesta inmune a la acción del hongo silvestre y su mutante.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Mecanismos de defensa de los lepidópteros

Los lepidópteros son sistemas modelo importantes para comprender la inmunidad innata de los insectos, incluyendo la biología celular de los hemocitos y los análisis bioquímicos de las proteínas plasmáticas. Una respuesta temprana a la infección en larvas de lepidópteros es la activación de la adhesión de los hemocitos de tipo plasmatocito y células granulares que conduce a la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación (Vizioli y Salzet, 2002).

Las larvas de polillas han sido de gran utilidad para proporcionar información sobre el sistema inmune innato de los insectos, muchas de las proteínas de la hemolinfa con funciones inmunes, así como las funciones de los hemocitos se estudiaron inicialmente en *Galleria mellonella* (Ashida y Brey, 1998; Stephens, 1962; Powning y Davidson, 1976; Kavanagh y Fallon, 2010).

El sistema inmune de los insectos reconoce los microorganismos infecciosos por la unión de proteínas plasmáticas de la hemolinfa a los componentes de la superficie microbiana que en el caso de los hongos, es el  $\beta$ -1,3-glucano (Figura 2). Este "reconocimiento de patrones" desencadena la fagocitosis y la formación de nódulos, la activación de la ProFO, la melanización y la síntesis de proteínas antimicrobianas que son secretadas en la hemolinfa (Schimd-Hampel; 2005). La defensa es de dos tipos, la celular (hemocitos) y la humoral (moléculas que circulan en la hemolinfa) los cuales son independientes, pero que en todo momento actúan de forma sincronizada para suprimir la infección (Wojda *et al.*, 2009).

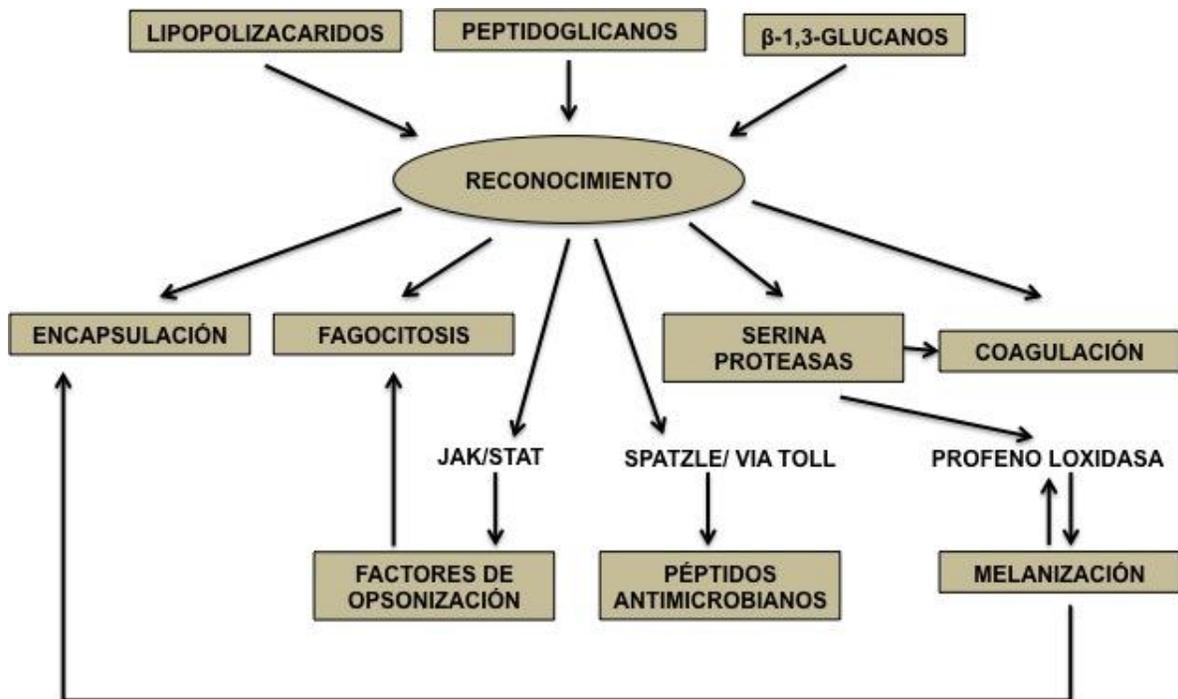


Figura 2. Sistemas de reconocimiento, activación de cascadas de señalización, vías reguladoras y producción de moléculas efectoras (Schmid-Hempel, 2005).

## 2.2. Respuesta inmune humoral

En los insectos, en la respuesta humoral se incluyen a los péptidos antimicrobianos moléculas de reconocimiento, intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno (quinonas, difenoles, superóxido, peróxido de hidrógeno, y nitrógeno reactivo), las moléculas pre-apoptóticas y citoquinas pre-inflamatorias (Meister *et al.*, 2000; Löwenberger, 2001; Vass y Nappi, 2001; Nappi y Christensen, 2005). Estas vías están reguladas por complejas cascadas enzimáticas que modulan la coagulación y la melanización en la hemolinfa (Lavine y Strand, 2002).

El sistema de ProFO participa en el reconocimiento y defensa en los invertebrados (Söderhäll, 1982). El sistema se activa con moléculas de la pared celular o enzimas liberadas por los patógenos o por heridas mecánicas (Galko y Krasnow, 2004). Si un patógeno ya sea bacteriano o fúngico entra en contacto con el hemocele, su presencia puede ser detectada por los receptores de reconocimiento de patrones y estos a su vez inducir a

una respuesta más sistémica sobre la regulación de la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) en el cuerpo graso del insecto (Boderich *et al.*, 2009). En experimentos con ProFO purificada a partir del gusano de seda (*Bombyx mori*), se identificó la presencia de la cascada de la serina proteasa como un proceso intermedio entre activadores naturales de la ProFO y productos activos de este mismo (Ashida y Dohke, 1980). Cuando este proceso se activa hasta cierto umbral ya no puede ser revertido, y se da la melanización como efector de la defensa inmune y puede ir acompañada de la respuesta celular.

Los procesos de fagocitosis y encapsulación, dependen en buen grado del reconocimiento del cuerpo extraño, que va seguido de la activación de la señalización intracelular (Strand, 2008). Los patrones humorales responden al microorganismo mediante la unión a lipopolisacáridos (LPPs), peptidoglicanos, y glucanos. Estos incluyen hemolina, la proteína de unión a LPS, la proteína de reconocimiento de las bacterias Gram negativas (GNBPs), proteínas de reconocimiento de peptidoglicano solubles (PGRP-SA), proteínas de reconocimiento de glucano (GRPs), la forma soluble de la molécula de adhesión celular síndrome de Down (Dscam), y proteínas del complemento TEP. (Dong *et al.*, 2006 Wang *et al.*, 2006; Terenius *et al.*, 2007; Strand, 2008).

El primer paso para la iniciación de la respuesta inmune, ya sea humoral o celular, es el reconocimiento del patógeno. Esto se logra mediante las proteínas de reconocimiento de patrones/receptores (PRPs), que reconocen y se unen a los dominios conservados (patrones) situados en la superficie del patógeno, que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Medzhitov y Janeway, 1997). Los PRPs mejor caracterizados son las lectinas de tipo C, las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos, los  $\beta$ -1,3-glucano proteínas, la hemolina y las integrinas (Bettencourt *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 2001; Bettencourt *et al.*, 2004). Estas proteínas están presentes en la membrana plasmática de las células del cuerpo graso y los hemocitos que son solubles en la hemolinfa.

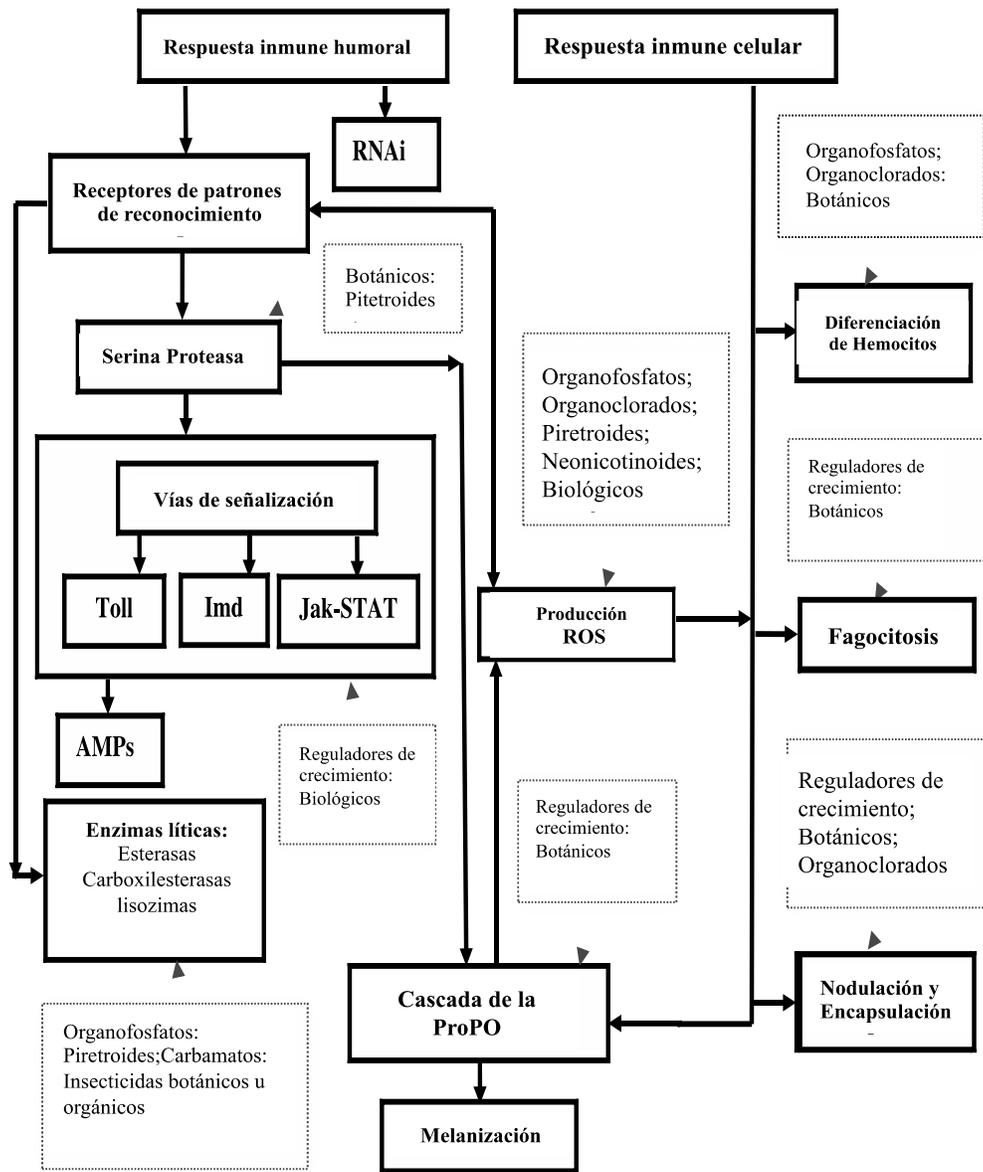
Las PRPs Se unen a los lípidos y los hidratos de carbono que son sintetizados por microorganismos y están expuestos en su superficie , tales como lipopolisacaridos (LPPs) de bacterias Gram negativas , ácidos lipoteicoicos y peptidoglicanos de bacterias Gram positivas y  $\beta$ -1,3- glucanos de hongos (Nappi *et al.*, 2000).

Las bacterias Gram positivas y los hongos desencadenan principalmente la vía Toll (Figura 3), la cual induce la producción de péptidos antimicrobianos para combatir a estos patógenos, sin embargo estos péptidos no siempre son eficaces contra los hongos entomopatógenos (Gliński y Buczek , 2003). Las vías de señalización Toll y Jak-STAT, participan en la defensa contra la infección viral (Dostert *et al.*, 2005; Zambon *et al.*, 2005) ya que inducen RNA de interferencia pequeños capaces de inactivar al RNA viral, los cuales probablemente sean una defensa primaria en los insectos (Imler y Eleftherianos, 2009). Los RNAi tienen secuencias de ácido nucleico que se unen a sus blancos de manera altamente específica, a diferencia de lo que ocurre en bacterias y hongos (James y Xu, 2012).

### **2.2.1. Melanización**

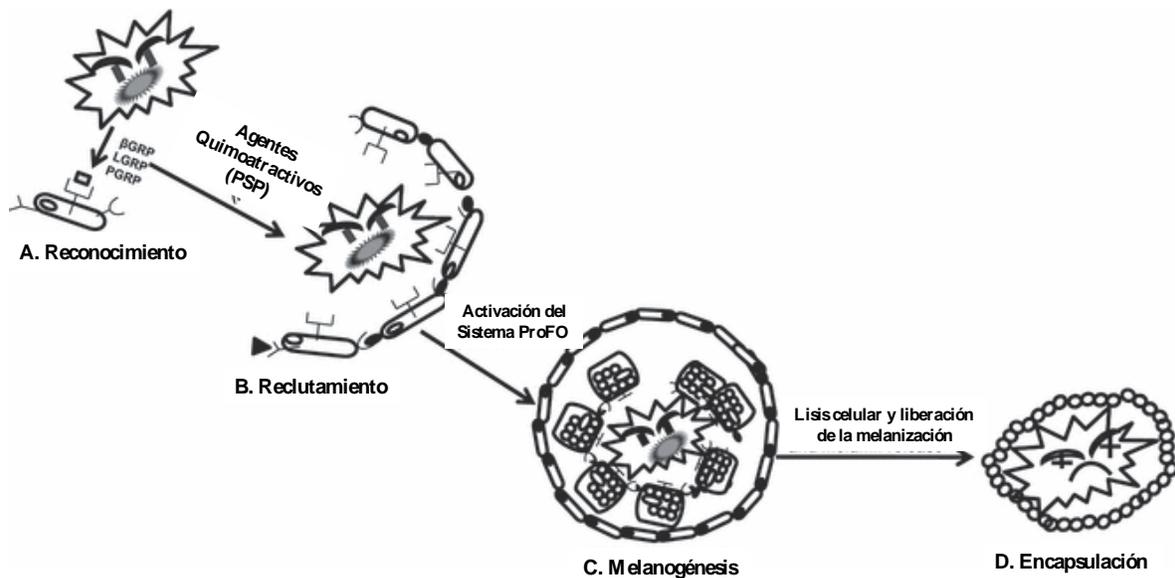
La melanización es efectuada por la enzima FO la cual convierte fenoles a quinonas que posteriormente se polimerizan para formar melanina (Söderhäll y Cerenius, 1998.) La melanina se forma a partir del aminoácido fenilalanina, que primero es hidroxilado y pasa de tirosina a fenilalanina hidroxilasa. La tirosina es entonces hidroxilada por la enzima FO activa para producir DOPA, que una vez oxidado, pasa a ser dopaquinona y se convierte inmediatamente a dopacromo por una reacción espontánea no enzimática (González- Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2011).

La reorganización estructural no enzimática del dopacromo, es seguido por la descarboxilación que genera 5-6, dihidroxiindol (DHI). El DHI es oxidado por la enzima PO para formar 5-6, indolquinonas. Estas indolquinonas finalmente se polimerizan a eumelanina en presencia de compuestos de tiolfeomelaninas (Nappi y Christensen, 2005).



**Figura 3. Respuesta inmune celular y humoral que se expresan en los insectos cuando son expuestos a insecticidas sintéticos, botánicos y microorganismos. Los cuadros con líneas solidas y flechas, representan un esquema del sistema inmune del insecto. Las cuadros y flechas identifican donde los insecticidas han sido documentados y que afectan la respuesta inmune particular. (James y Xu, 2012)**

El DHI puede ser producido por una ruta alterna donde la DOPA descarboxilasa elimina  $\text{CO}_2$  de DOPA para formar dopamina (Beerntsen *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005). La vía de melanización comúnmente descrita (Figura 4), es el proceso de melanización contra huevos de parasitoides en larvas de mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Nappi y Vass, 1993).



**Figura 4. Proceso de melanización.** A) Reconocimiento del patógeno a través de moléculas específicas. B) Movilización de hemocitos que rodean al cuerpo extraño. C) Deposición de grandes cantidades de hemocitos sobre el cuerpo extraño. D) Encapsulación y muerte del patógeno por inanición (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2011).

### 2.2.2. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

La expresión de los AMPs y de proteínas a menudo son inducidos por la infección microbiana, pero que generalmente la expresión más fuerte ocurre en el cuerpo graso (Bulet y Stöcklin, 2005; Brown *et al.*, 2007), aunque los hemocitos también contribuyen a la acumulación de los péptidos antimicrobianos que son secretados en el plasma de la hemolinfa (Lavine *et al.*; 2005). Los AMPs también se expresan en el intestino medio de las prepupas de los lepidópteros, son secretados en el lumen y le confieren cierta profilaxis contra infecciones en el proceso de la metamorfosis (Dunn *et al.*, 1994).

Los AMPs también pueden ser expresados en los tejidos extraembrionarios de huevecillos de los lepidópteros que proporcionan protección contra la infección para el desarrollo del embrión (Gorman *et al.*, 2004).

Desde que se descubrió el primer AMPs (la cecropina) en la década de los 80's por el grupo de investigación del Dr. Boman, se han identificado un buen número de péptidos antimicrobianos que comparten características comunes tales como el peso molecular relativamente bajo, carga positiva y capacidad de inducción cuando hay lesiones o infección por microorganismos (Steiner *et al.*, 1981). Actualmente se conocen más de 200 de estos péptidos en insectos (Li *et al.*, 2012).

En general, los AMPs no requieren de mucha energía para su producción pues son moléculas muy pequeñas de 14- 20 aminoácidos, por lo que su síntesis se lleva a gran escala; básicamente actúan de dos formas, una de ellas es creando poros en la membrana de los patógenos al traspasar esta barrera, la célula patógena explota por el cambio de presión interna; la otra consiste en permear la célula e inactiva moléculas causando un desorden y por ende la muerte del mismo (Zasloff, 2002; Yount y Yeaman, 2006). Aunque tienen diferentes estructuras y distintos organismos (bacterias u hongos), las AMPs se clasifican en cuatro grupos; a) cecropinas, b) péptidos ricos en cisteína, c) péptidos ricos en prolina, y d) péptidos ricos en glicina. Aunque los más comunes son las cecropinas y aquellos que son ricos en cisteína (Tsakas y Marmaras; 2010).

### **2.2.3. Cecropinas**

Las cecropinas se aislaron inicialmente de *Hyalophora cecropia* después de que se le inyectaron bacterias Gram-negativas de *Escherichia coli* (Hultmark *et al.*, 1980; Steiner *et al.*, 1981). Estos péptidos se producen en respuesta a lesiones sépticas, ya sea por bacterias Gram-negativas o por bacterias Gram-positivas; afectan la proliferación celular mediante la inhibición de síntesis de la membrana celular (Tsakas y Marmaras; 2010).

Las cecropinas solo se han descrito en los órdenes Díptera y Lepidóptera, y todavía es incierto si se encuentran en otras especies de insectos. Los péptidos de cecropina maduros carecen de residuos de cisteína, son de 35 a 39 aminoácidos de longitud y forman dos  $\alpha$ -hélices conectadas por una bisagra que se integran en las membranas celulares de bacterias ácidas (Charroux *et al.*, 2009).

En *S. frugiperda* se identificó un grupo de péptidos antimicrobianos de la familia cecropina de las subfamilia CECA,CECB, CECC y CECD, estos nuevo péptidos purificados se han identificado como CecB1 el cual se sintetizó químicamente (syCecB1) y se demostró que es activo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como en los hongos (Duvic *et al.*, 2012).

#### **2.2.4. Defensinas**

Entre los péptidos antimicrobianos de origen natural, las defensinas forman una familia única de polipéptidos catiónicos ricos en cisteína y con una estructura de tres o cuatro puentes disulfuro. Estas defensinas proporcionan una eficiente defensa inicial contra patógenos infecciosos como bacterias Gram-positivas, también tienen una potente actividad contra algunas bacterias Gram-negativas, hongos, levaduras y protozoarios (Chapuisat *et al.*, 2007; Viljakainen y Pamilo; 2008). En *G. mellonella* se describieron las denominadas Galleria defensinas; las cuales en sinergia con las apolipoporinas tipo III, causan daños irreversibles en la pared celular bacteriana así como fuertes alteraciones intracelulares, como el aumento de vacuolización y la condensación del citoplasma (Palusińska-Szyszk *et al.*, 2012).

Volkoff *et al.*, (2003) describieron la secuencia y la transcripción de tres genes de *S. frugiperda* que codifican para péptidos ricos en 6-cisteína; las alineaciones indican que los péptidos predichos pertenecen a la familia de las defensinas de insectos; aunque los estudios filogenéticos sugieren que forman un grupo distinto de las otras defensinas. Los nuevos

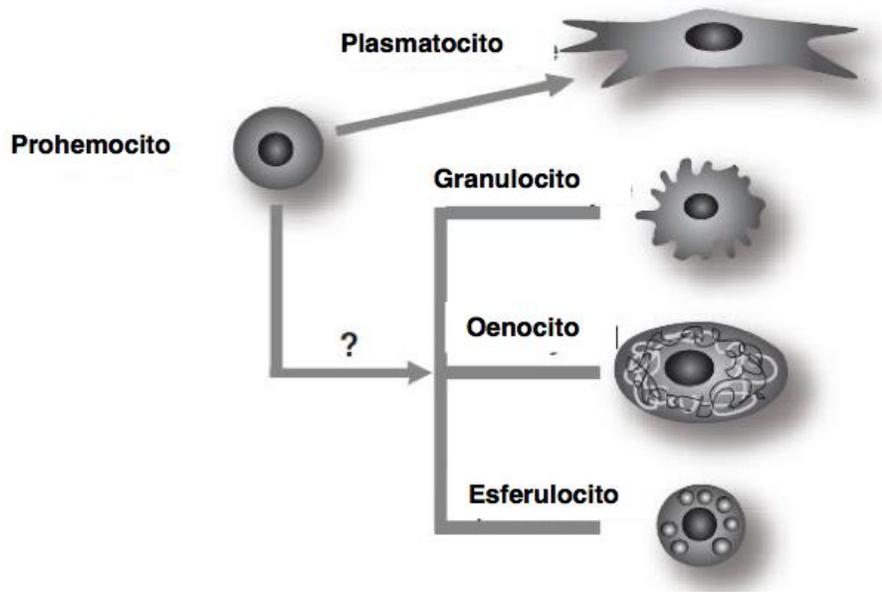
genes fueron nombrados como Spodoptericina, Sf gallerumicina y Sf-cobatoxina que tienen homología y regiones muy conservadas como los observados en *Bombix mori* y en *G. mellonella*.

### **2.3. Respuesta inmune celular**

Los hemocitos (Figura 5) son responsables de una serie de respuestas de defensa en los insectos, dentro de los que figuran la fagocitosis, la nodulación, encapsulación y melanización (Lavine y Strand; 2002). Estos procesos parecen ser las respuestas inmunes discretas en términos de resultados en la expresión de genes. Sin embargo, existen ciertas respuestas inmunes que comparten una serie de elementos comunes y que funcionan de manera coordinada para eliminar los patógenos de la hemolinfa (Tsakas y Marmaras; 2010).

#### **2.3.1. Fagocitosis**

La fagocitosis se induce cuando receptores de la superficie de fagocitos se activan por las células diana. La respuesta de hemocitos a diversas bacterias difiere por ejemplo, en *Aedes aegypti* los hemocitos responden a *E. coli* con la fagocitosis, mientras que a *Micrococcus luteus* con la melanización (Hernández-Martínez *et al.*, 2002; Hillyer y Schmidt 2003 a, b). Además, existen diferencias en la eficacia y rapidez de la fagocitosis entre diferentes bacterias. Se ha demostrado que la bacteria *E. coli* es fagocitada más fácilmente que *Staphylococcus aureus* en *Anopheles gambiae*, así como en los hemocitos aislados de la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata* (Levashina *et al.*, 2001; Moita *et al.*, 2006; Lamprou *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren fuertemente que mecanismos moleculares distintos regulan la fagocitosis en los insectos.



**Figura 5.** Cuatro tipos diferentes de hemocitos involucrados directamente en la inmunidad de insectos. Los lepidópteros en su etapa larval como *Pseudoplusia includens*, *Manduca sexta* y *Bombyx mori* contienen cuatro tipos de hemocitos diferentes en circulación: los granulocitos fagocíticos, los Oenocitoides que contienen FO, células esferuladas y formación de cápsulas de plasmatocitos. Organos hematopoyéticos son los que contienen los prohemocitos que maduran principalmente en plasmatocitos. Los granulocitos y otros tipos de hemocitos diferenciados también proliferan en circulación (Strand, 2008).

### 2.3.2. Encapsulación

La encapsulación es la respuesta de los hemocitos a grandes objetivos tales como parásitos, protozoos y nematodos. Los hemocitos se unen a la diana en múltiples capas de células hasta que forman una cápsula alrededor del objeto invasor. La cápsula normalmente termina melanizada (Ling y Yu; 2006). En el interior de la cápsula el organismo invasor es aniquilado por productos citotóxicos reactivos o por asfixia (Carton *et al.*, 2009; Nappi *et al.*, 2009).

#### **2.3.4. Nodulación**

El proceso de la nodulación consiste en la agregación de material de los hemocitos que atrapan un gran número de bacterias. Los nódulos pueden ser melanizados o no melanizados y se forman en respuesta a un número de invasores. La formación de nódulos parece estar relacionado con los eicosanoides en muchas especies de insectos (Miller *et al.*, 1999) o la ProPO y la dopa descarboxilasa (DDC) en hemocitos de mosca del Mediterráneo *C. capitata* (Sideri *et al.*, 2008; Shrestha *et al.*, 2010).

#### **2.4. Pared celular de los hongos entomopatógenos**

La pared celular de los hongos, presenta una estructura con gran plasticidad la cual le confiere forma a la célula; ésta tiene la capacidad para permitir la permeabilidad celular, así como protección ante los cambios osmóticos. Esta estructura es el lugar donde se inicia el contacto directo con agentes externos (cutícula y/o pared celular de los insectos), en esta capa se encuentran las adhesinas y un gran número de receptores que una vez activados, transducirán diferentes señales al interior de la célula (Pontón, 2008).

La pared celular realiza el primer contacto con el hospedante y juega un papel muy importante en el desarrollo de la patogenicidad (Chaffin *et al.*, 1998; Nimrichter *et al.*, 2005; Pontón *et al.*, 2001). Esta pared es muy diferente a la de los vegetales, las cuales están compuestas fundamentalmente por celulosa. La pared de los hongos está compuesta principalmente de proteínas o polisacáridos; dentro de los cuales destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano (Figura 6). Las proteínas se asocian a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados formando fuertes cadenas que se entrelazan y dan rigidez a la célula (Pontón, 2008).

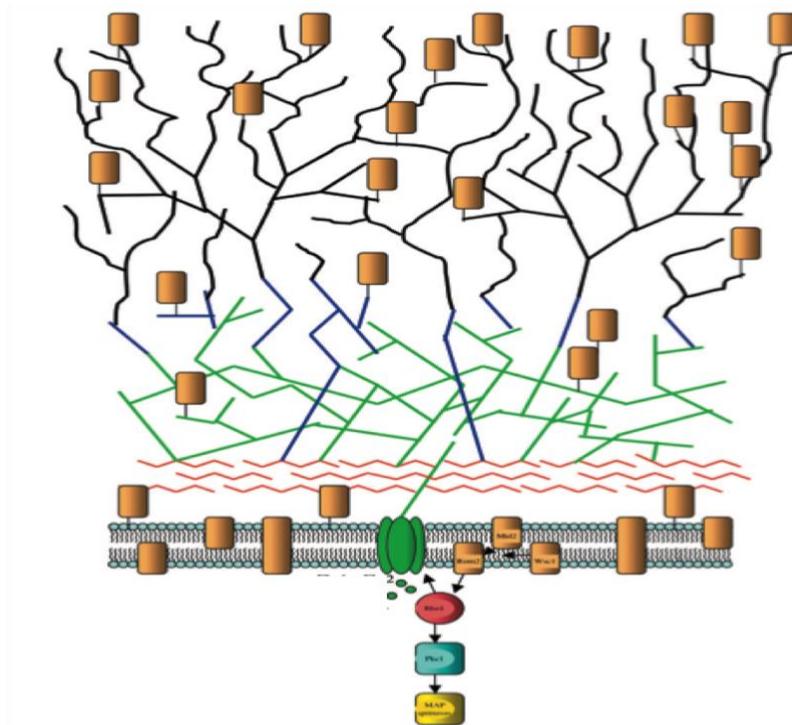


Figura 6. Esquema de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Los polisacáridos de la pared están representados en diferentes colores: quitina (rojo)  $\beta$ -1,3-D-glucano (verde),  $\beta$ -1,6-D-glucano (azul) y mananos (negro). La proteínas están representadas por rectángulos de color naranja. Las subunidades de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa en la membrana plasmática están coloreadas en verde. (Pontón, 2008).

#### 2.4.1. Quitina

La quitina se forma a partir de monómeros de N-acetil glucosamina por la enzima quitina sintasa, la cual deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplasmática. El contenido de quitina varía de acuerdo a la fase en la que se encuentra el hongo, en general representa del 1-2% del peso seco de la pared celular en las levaduras, mientras que para los hongos filamentosos puede variar de 10 a un 20%; este mismo compuesto, en las hifas de *Candida albicans* es tres veces más alto que el de las levaduras (Chattaway *et al.*, 1968). También se ha observado que el contenido de quitina en las fases miceliales de *Paracoccidioides brasiliensis* y las levaduriformes de *Blastomyces dermatitidis* es de un 25 a 30% (Kanetsuna; 1969).

### 2.4.2. Glicoproteínas

Las glicoproteínas, son proteínas (principalmente intrínsecas de membrana y de secreción) que están ligadas a que participan principalmente en la forma celular, intervienen directamente en los procesos de adhesión; protege a la célula de sustancias extrañas; también participan en la absorción de moléculas, es un transmisor de señales al citoplasma para el remodelado y síntesis de nuevos componentes de la pared celular (Bowman y Free; 2006). Los azúcares predominantes en las glicoproteínas son la glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina. La unión del azúcar a la parte proteica es, bien a través de un *enlace* N-glucosídico a través del grupo amida de una asparragina, o bien a través de un *enlace* O-glucosídico a través de un grupo hidroxilo de una serina, una treonina o una hidroxilisina (Pontón, 2008).

### 2.4.3. Glucano

El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces  $\beta$ -1,6 (en *Candida* pero no en *Aspergillus*),  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4. El  $\beta$ -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura (Bowman y Free; 2006).

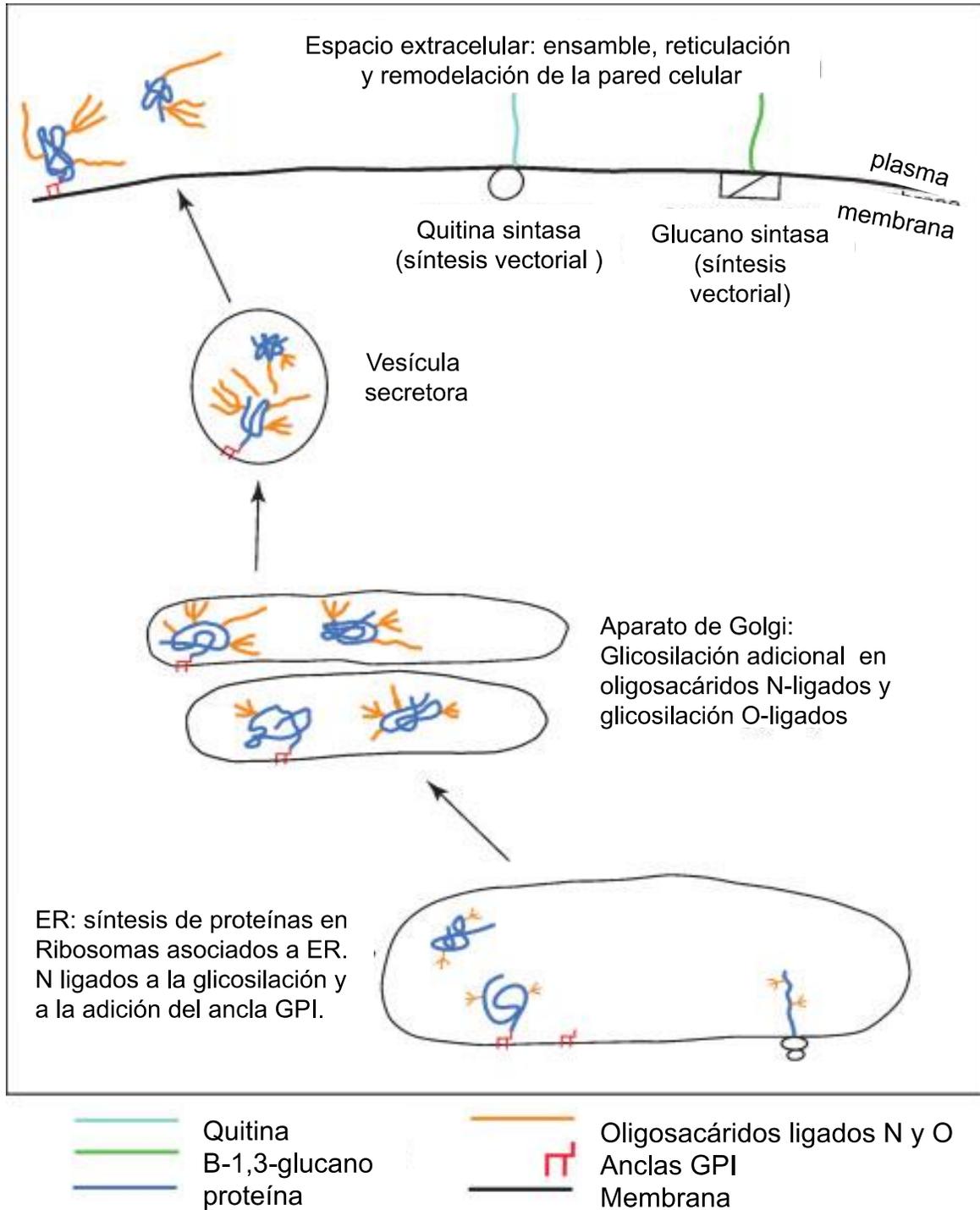


Figura 7. Biosíntesis de la pared celular, el glucano y los componentes de la quitina se sintetizan en la membrana plasmática. La síntesis de la glicoproteína se inicia en el retículo endoplasmático (ER). En el aparato de Golgi las glucosiltransferasas modifican las proteínas adicionando azúcares por lo general oligosacáridos O-ligados y N-enlazados (Bowman y Free; 2006).

El  $\beta$ -1,3-D-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetasas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1,500 residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,3. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces  $\beta$ -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada (Figura 7). Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas, proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular (Bowman y Free; 2006; Pontón, 2008).

## **2.5. Otras generalidades de los hongos**

Los hongos entomopatógenos algunas veces cuando están en el ambiente en ausencia del hospedante, desarrolla una fase saprofitica; esta fase le permite fisiológicamente características que le permiten sobrevivir en el medio ambiente como tolerancia a la luz ultravioleta, baja humedad, altas temperaturas y falta de nutrientes (Gillespie y Claydon, 1989). Por otra parte, cuando encuentra las condiciones favorables, un sistema específico de transducción de señales a nivel celular y molecular es activado y el hongo diferencia su hospedero correcto para posteriormente infectar generar la muerte y comenzar un nuevo ciclo.

Posada y Vega; (2005) determinó que la fase patogénica del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) es de 4 días y la fase saprofitica es de 6.2 días en condiciones de laboratorio. Otros autores han reportado tiempos diferentes que van de 3 a 14 días en la fase patogénica en condiciones de campo; en buen grado estos datos son la combinación de factores bióticos y abióticos, zona geográfica así como la presencia del hospedante susceptible (Monzón, 2001). Durante el proceso de invasión de los tejidos se producen gran variedad de metabolitos secundarios que son los causantes de la muerte del hospedante. Los síntomas de la enfermedad previos a la muerte son la pérdida de sensibilidad, falta de coordinación de movimientos y parálisis (Von Döhren, 2004).

### **2.5.1. Enzimas**

Las enzimas que hidrolizan la cutícula, son principalmente las proteasas del tipo subtilisina (Pr1 A y B), serina proteasas (Pr2 y Pr3), cistein proteasas (Pr4), carboxipeptidasas (MeCPA), metaloendoproteasas y dipeptidilpeptidasa, entre otras (Hegedus y Khachatourians, 1995; St Leger, 1995; St Leger *et al.*, 1996b; Joshi *et al.*, 1995; Clarkson y Charney, 1996). La hidrólisis de la quitina es llevada a cabo principalmente por una serie de exo-N-acetilglucosaminidasa, quitobiosas y endoquitinasas (Hegedus y Khachatourians, 1995; Clarkson y Charnley, 1996). Las proteasas Pr1 y la quitinasa Bbchit1 se han observado como factores de virulencia en el hongo *B. bassiana* (Joshi *et al.*, 1995; St Leger *et al.*, 1996a; Fan *et al.*, 2007). Cuando el hongo está dentro del insecto, este comienza a proliferar en cuerpos hifales secundarios que se ramifican en la procutícula, conformada principalmente por fibrillas de quitina laminadas que están embebidas en una matriz proteica, que actúa como una cubierta física que la protege de las secreciones extracelulares (Pendlan *et al.*, 1993).

### **2.5.2. Toxinas**

En el metabolismo secundario de los hongos entomopatógenos, producen compuestos de bajo peso molecular como ácidos orgánicos y difenoles con actividad insecticida (Monzón, 2001). *B. bassiana* puede matar a sus hospederos antes de invadir todos sus órganos, gracias a la producción de toxinas. Aunque también pueden ser producidos en asociación con el insecto como una respuesta a la infección (Gillespie y Claydon, 1989). *B. bassiana* produce varios compuestos tóxicos que se han considerado como factores de virulencia en donde se incluye la beauvericina, la basianolida, basianina, y los beauverolidos (Vey *et al.*, 2001; Von Döhren, 2004), algunos de los cuales están clasificados como depsipéptidos (compuestos consistentes en cadenas de aminoácidos que alternan con ácidos carboxílicos vía enlaces ésteres y amidas), algunos no peptídicos. Para el hongo *Beauveria brongniartii* se han identificado las tenellinas, Isarolidos A, B y C y otro compuesto denominado oosporeina. En *Cordyceps militaris* se ha logrado identificar la cordicepina (Upadhyay *et al.*, 2001).

## 2.6. Antecedentes del Hongo Bb 88 y su mutante Bb 884.5

El hongo entomopatógeno silvestre de *B. bassiana* denominado Bb 88, fue aislado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) en una finca cafetalera en el estado de Oaxaca. El aislamiento nativo ha sido usado en diferentes investigaciones para evaluar la patogenicidad y virulencia sobre diferentes insectos plaga, para conocer su biología e interacción con estos (Orduño-Cruz., 2009; Hernández-López., 2010; Ibarra-Cortés., 2011; Carrillo-Benítez., 2012)., en el laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de Hongos Filamentosos de la Universidad Autónoma Metropolitana se han empleado técnicas de mutación clásica para la obtención de cepas que se han evaluado en su virulencia, infectividad y características fisiológicas y bioquímicas.

Hasta ahora dicho microorganismo, tanto en su forma silvestre como sus mutantes, solo se han mantenido las características morfológicas y fisiológicas. (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009; Montesinos-Matías; 2011). En las mutantes generadas, se observó un efecto tóxico en el medio SDA+2DG ( $0.2 \text{ g l}^{-1}$ ) medido en términos de la tasa de crecimiento radial ( $U_r$ ) con una disminución del 11.5 y 13.9% para las cepas evaluadas, en comparación con el medio de cultivo con ausencia del compuesto 2DG. Para la velocidad específica de crecimiento, no mostró diferencias estadísticas significativas en presencia y ausencia de 2DG para cada cepa evaluada. Montesinos Matías, (2008) en la cepa silvestre Bb 88 evaluó el porcentaje de germinación de los conidios, el cual se correlacionó de manera positiva con los parámetro de virulencia como el tiempo de inicio de muerte, el tiempo letal medio y la mortalidad máxima. La cepa mutante 884.5 no presento las mejores variables de crecimiento e infectividad, la mortalidad máxima acumulada fue baja ( $44.45 \pm 6\%$ ) y el tiempo de inicio de muerte mas prolongado ( $7.06 \pm 0.92 \text{ d}$ ) cuando fue inoculado en forma de espora en adultos de *T. molitor* (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Caracterización morfológica y fisiológica de la cepa silvestre en relación a su mutante resistente al compuesto 2DG.**

<b>Parámetros evaluados</b>	<b>Bb 88</b>	<b>Bb 884.5</b>
U <sub>r</sub> (μm/h) SDA	98.87+3.8b	93.73 +1.7b
U <sub>r</sub> (μm/h) SDA+2DG	84.97+7.0b	85.13+7.2b
<b>Disminución U<sub>r</sub></b>	11.50%	9%
L <sub>av</sub> (μm/h) SDA	228.89+8.8a	280.74+15.9b
L <sub>av</sub> (μm) SDA+2DG	198.08+4.4a	252.36+20.3b
D <sub>h</sub> (μm/h) SDA	2.59+0.09b	2.52+0.21b
D <sub>h</sub> (μm/h) SDA+2DG	2.09+0.06a	2.75+0.21b
μ(h <sup>-1</sup> ) SDA	0.064+0.05c	0.052+0.004b
μ(h <sup>-1</sup> ) SDA+2DG	0.065+0.003c	0.051+0.005b
U <sub>r</sub> (μm/h) NAG	94.72+4.36a	88.32+2.11a
U <sub>r</sub> (μm/h) NAG+2DG	51.42+1.48a	88.84+5.63c
<b>Disminución U<sub>r</sub></b>	45%	4%
U <sub>r</sub> (μm/h) SMAYO	82.5+2.5a	89.16+1.25 b

2DG=2-Deoxideglucosa (0.2 g l<sup>-1</sup>); G=germinación (%); U<sub>r</sub>=tasa de crecimiento radial (μm/h<sup>-1</sup>); μ=velocidad específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>); L<sub>av</sub>= longitud promedio de las hifas de la periferia de la colonia (μm). Las letras distinguen los grupos que resultaron de las prueba de medias de cada renglón (P ≤ 0.05) (Montesinos-Matías, 2011).

### 2.6.1. Resistencia a la 2-DG

El compuesto 2DG, no es metabolizable y es tóxico para la mayoría de los hongos donde se ha probado, este penetra a la célula por medio de los transportadores de glucosa y al ser fosforilado, origina el compuesto tóxico 2DG-6-P, (Randez-Gil *et al.*, 1995). Los mecanismos de resistencia a 2DG están directamente relacionados con la sobreexpresión de enzimas cinasas y fosforilasas que participan en rutas de transducción de señales (Randez-Gil *et al.*, 1995). La represión catabólica de carbono (CCR) es la represión de genes que son requeridos para la utilización de fuentes de carbono no preferenciales en presencia de glucosa (Westergaard *et al.*, 2007). Por ejemplo en bacterias se ha observado que el microorganismo tiene la facultad de elegir entre diferentes fuentes de carbono según su valor en el metabolismo y cambiar de una fuente de carbono a otra en función de la disponibilidad en el medio donde está creciendo (Görke y Stülke, 2008; Rojo, 2010).

Las cepas que desarrollan resistencia a la 2-DG, frecuentemente son menos sensibles a la represión por catabolito del carbono en diversos grados. Las reacciones catabólicas liberan energía como el de la glucólisis, desencadenando un efecto pleiotrópico, es decir causando que se produzcan diferentes enzimas que en condiciones normales se encuentran reprimidas por la presencia del carbono como comúnmente se manifestaría si la glucosa estuviera presente (Allen *et al.*, 1989). Este fenómeno de resistencia a la 2DG, se ha empleado como criterio de selección de cepas sobreproductoras de enzimas y de otros metabolitos; por ejemplo se han seleccionado mutantes con desrepresión catabólica y que son sobreproductoras de pectinasas (Antier *et al.*, 1993;) de celulasas (Parvez *et al.*, 1998) de amilasas y de ácido cítrico (Suzuky *et al.*, 1996).

### 2.6.2. Perfil enzimático

El estudio de perfil enzimático se llevó a cabo en un medio mínimo en donde se usó cutícula del insecto *T. mollitor* como única fuente de carbono y nitrógeno en el medio para el desarrollo de los hongos entomopatógenos (Cuadro 2) Donde se observó que la virulencia esta directamente relacionada con la sobreexpresión de las proteasas y quitinasas totales, así como la Pr1 y la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (Montesinos-Matías, 2011). Pues cuando se llevaron a cabo los bioensayos sobre adultos de *T. mollitor* la cepa Bb 884.5 mostró siempre una menor mortalidad sugiriendo con esto que las enzimas que participan desde manera temprana en la infección hacen que el hongo sea más exitoso.

**Cuadro 2. Cuantificación de enzimas que fueron secretadas en un medio mínimo con cutícula de *T. mollitor* como única fuente de carbono nitrógeno.**

<b>enzimas</b>	<b>Bb 88</b>	<b>Bb 884.5</b>
Proteasas totales(mUI $\mu$ g proteína <sup>-1</sup> )	2.78 $\pm$ 0.20a	2.61 $\pm$ 0.26a
Pr1 (U $\mu$ g <sup>-1</sup> proteína)	2.3 $\pm$ 0.009a	3.45 $\pm$ 0.11b
Quitinasas totales (U $\mu$ g proteína <sup>-1</sup> )	0.10 $\pm$ 0.013b	0.06 $\pm$ 0.00a
$\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (UI $\mu$ g proteína <sup>-1</sup> )	0.043 $\pm$ 0.001b	0.016 $\pm$ 0.00a

Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias en cada renglón ( $P \leq 0.05$ ) (Montesinos-Matías, 2011).

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* fueron colectadas de un cultivo de Soya (*Glycine max*) en el estado de Tamaulipas. Los insectos fueron criados en una dieta artificial (Fall Armyworm Diet® Southland Products Inc.) a 30 °C, 70-80 % de Humedad Relativa y un fotoperiodo de 12h L: O. Se utilizaron charolas de poliestireno de 128 cavidades (Bio-Serv) y se sellaron con tapas autoadheribles. En cada cavidad se colocó 500 µL<sup>-1</sup> de dieta y una larva. Después de 12 días, las larvas fueron transferidas a vasos de polipropileno transparente modelo SOLO® de 1 una onza con tapa, que se incubaron bajo las mismas condiciones hasta que fueron requeridos.

Las larvas de la palomilla de la cera (*G. mellonella*) fueron criadas con una metodología estándar en el laboratorio (modificado de Ashfat *et al.*, 2005), con una dieta artificial a base de maíz molido previamente esterilizado a 70° C por 15 min (± 60%), miel de abeja (± 20%), salvado de trigo (±10%) vitaminas (± 4%), y levadura de cerveza (± 6.9%). La mezcla se realizó en bandejas grandes que posteriormente se colocó en cilindros de plástico tipo resina de alta resistencia (30 X 12 cm) y selladas con tapa del mismo material con malla metálica de 0.5 mm de abertura, donde se colocaron las larvas de segundo instar y fueron mantenidas en cámaras de cría a 30± 1° C con 70-80 de H.R, en completa oscuridad.

#### 3.2. Producción de blastoesporas

Se usaron cultivos monosporicos de la cepa silvestre de *B. bassiana* (88) y una mutante resistente al compuesto 2-desoxi-D-glucosa (884.5). La mutante fue previamente aislada por Robledo-Monterrubio *et al.*, (2009) y caracterizada por Montesinos-Matías *et al.*, (2011). Las cepas fueron cultivadas en cajas Petri de 90 mm de diámetro con Agar Dextrosa Sabouraud suplementado con 1% de extracto de levadura e incubadas a 28°C en completa oscuridad.

A partir de cultivos de 20 días se tomaron discos de cinco milímetros de diámetro para inocular  $50 \text{ mL}^{-1}$  de medio de cultivo líquido que contenía Caldo Dextrosa Sabouraud suplementado con 1 % de levadura. El medio líquido que se encontraba en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y seis discos con micelio y conidios de las cepas fueron incubados en un agitador automático MaxQ 4000® a 200 rpm por cuatro días a 28 °C.

Las blastosporas de los hongos fueron recolectadas por medio de filtración usando dos capas de gasa estéril para remover el micelio. La suspensión fue centrifugada tres veces a 10 000 rpm por 10 minutos a 4 °C para remover los remanentes del medio líquido y resuspendidas en un buffer salino de fosfatos (PBS; pH 7.4) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). La concentración de blastosporas se determinó usando una cámara Neubauer. El porcentaje de blastosporas viables se determinó usando la técnica de conteo en placa con Agar Dextrosa Sabouraud (Goettel e Inglis, 1997). En todos los casos se encontró más del 95 % de viabilidad.

### **3.3. Determinación de la DL<sub>50</sub>**

#### **3.3.1. *Spodoptera frugiperda***

El procedimiento para cada cepa del hongo fue el mismo. Grupos de treinta y seis larvas del sexto instar de *Spodoptera frugiperda* fueron inyectadas vía intrahemocelica con cinco concentraciones de blastosporas ( $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$ ) contenidas en  $10 \mu\text{L}^{-1}$  de PBS+Tween 80 al 0.03 %. Las larvas del grupo testigo se inyectaron únicamente con el PBS+Tween 80 al 0.03%. Antes de la inoculación las larvas se inmovilizaron manteniéndolas en hielo por 10 min. Se usó una jeringa para insulina de 1 mL<sup>-1</sup> con una aguja de 30G de grosor montada a un microaplicador manual para inyectar las blastosporas en suspensión.

La aguja de la jeringa se introdujo en la última propata con dirección hacia la parte anterior de la larva (Figura 8). Las larvas fueron transferidas individualmente a un pozo de

una placa de cultivo celular de 12 cavidades, cada pozo se rellenó con 2 mL<sup>-1</sup> de agar-agua al 1.5 %. Las placas de 12 cavidades fueron incubadas a 27 °C y 70 % de HR en completa oscuridad. Se evaluó la mortalidad cada 24 h durante cinco días. Para confirmar la mortalidad por los hongos, las larvas muertas se colocaron en una cámara húmeda, que consistía en una caja Petri con papel filtro humedecido y se incubaron a 28° C por 5 días hasta observar la esporulación. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes.



**Figura 8. Aplicador con la microjeringa para la inyección de blastoesporas del hongo entomopatógeno en larvas de *S. frugiperda* y *G. mellonella*.**

### **3.3.2. *Galleria mellonella***

El procedimiento experimental fue similar al de *S. frugiperda* con algunas modificaciones. Grupos de 36 larvas del último instar de *G. mellonella* fueron inyectadas con ambas cepas (88 y 884.5). Se utilizaron cinco dosis:  $5 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1.5 \times 10^2$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2.5 \times 10^2$  blastoesporas. El testigo se inyectó con PBS+Tween 80 al 0.03%. El procedimiento de inoculación y manejo de las larvas fue igual como se describió arriba. El experimento se repitió en dos ocasiones diferentes.

En ambos insectos se registró la mortalidad cada 24 horas durante cinco días. La mortalidad se corrigió mediante la fórmula de Abbott (1925). Los datos de los bioensayos

se analizaron mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con error binomial y un ajuste Probit usando el paquete estadístico GenStat v. 8.0 (Payne *et al.*, 2005). Antes de combinar las repeticiones, se verificó si las líneas de los modelos ajustados eran paralelas y si las intersecciones y la pendiente eran iguales. Si ambas líneas se ajustaban al modelo y eran iguales, entonces los datos de las repeticiones se combinaban.

La dosis que causa el 50% de las infecciones de las larvas (DL<sub>50</sub>) fue estimada con base en el mejor modelo seleccionado con base en pruebas parciales de F. Las dosis que causó mortalidad del 50 % (DL<sub>50</sub>) fue estimada a partir del modelo con mejor ajuste, y los intervalos de confianza fueron calculados de acuerdo al teorema de Fieller (Fieller, 1944).

#### **3.4. Respuesta inmunitaria después de inocular la DL<sub>50</sub>**

La manipulación, la inoculación e incubación de las larvas se realizó como se describió previamente. Grupos de 12 larvas del sexto instar de *S. frugiperda* y del último instar de *G. mellonella* se les inyectó la DL<sub>50</sub> de la cepa Bb 88 y Bb 884.5. Al grupo testigo se le inyectó PBS+Tween 80 al 0.03%. La DL<sub>50</sub> de la cepa Bb 88 y Bb 884.5 para *Spodoptera frugiperda* fue de  $2 \times 10^4$  blastosporas/larva (Cuadro 3). La DL<sub>50</sub> de la cepa 88 en *Galleria mellonella* fue de  $1 \times 10^2$  blastosporas/larva y de la cepa 884.5 fue de  $1.7 \times 10^2$  blastosporas/larva (Cuadro 1). El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes para *S. frugiperda* y dos veces para *G. mellonella*.

#### **3.5. Extracción de hemolinfa**

Después de 24 horas de inoculadas las larvas se tomó una muestra de su hemolinfa. Las larvas se colocaron en una superficie fría durante 10 min para inmovilizarlas. Las larvas fueron pinchadas en una de las propatas con una aguja estéril. La gota de hemolinfa se depositó sobre un papel parafilm y con una pipeta se tomaron 10 µL de hemolinfa. La

muestra se mezcló con 400  $\mu\text{L}^{-1}$  de PBS frío en un tubo tipo Eppendorf de 1.5  $\text{mL}^{-1}$ . La mezcla se agitó en un vortex por 10 seg y las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6. Medición de la actividad de la fenoloxidasa (FO)**

La actividad de la FO se midió usando el método descrito por Lee *et al.*, (2008). Las muestras de hemolinfa se descongelaron y en una placa de 96 cavidades se colocaron 100  $\mu\text{L}^{-1}$  de la muestra y 100  $\mu\text{L}^{-1}$  de una solución de L-DOPA (4  $\text{mg}/\text{mL}^{-1}$  de agua). La mezcla se incubó por 20 min a 25  $^{\circ}\text{C}$  en completa oscuridad. La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro (MultiSkan Ascent) a 492 nm. Las mediciones de la actividad de FO se realizaron por triplicado en cada muestra. La actividad de la fenoloxidasa se expresó como unidades de FO por mg de proteína, en donde una unidad es la cantidad de la enzima requerida para aumentar la absorbancia en 0.001 unidades por min (Lee *et al.* 2008).

La proteína se midió usando el kit de proteína BCA (No. cat. 23227; Pierce Biotechnology, Rockford, IL) que se basa en el método del ácido bicinonónico (BCA) usando albumina bovina como proteína estándar. Dos réplicas de 10  $\mu\text{L}^{-1}$  de las muestras de hemolinfa se mezclaron con los reactivos del kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió en un lector de microplacas (MultiSkan Ascent) a 562 nm.

Los datos de la FO se analizaron por medio del análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis utilizando el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2011). Los datos de las repeticiones de la FO en *S. frugiperda* y *G. mellonella* se juntaron debido a que no se encontraron diferencias estadísticas entre repeticiones.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Determinación de la $DL_{50}$

En el gusano cogollero (*S. frugiperda*) no se encontraron diferencias estadísticas entre repeticiones de los experimentos. Las mortalidades se analizaron mediante el análisis binomial Probit de modelos paralelos, donde no se encontró diferencias entre las ordenadas al origen para cada una de las líneas Probit generadas para cada cepa ( $F_{1,51}=0.01$ ,  $P=0.928$ ), así como para las pendientes ( $F_{1,51}=1.42$ ;  $P=0.234$ ); por lo que, la virulencia de las dos cepas es similar (Cuadro 2). Por lo tanto, la  $DL_{50}$  para las larvas del gusano cogollero fue de aproximadamente  $2.1 \times 10^4$  blastoesporas/larva (Figura 9).

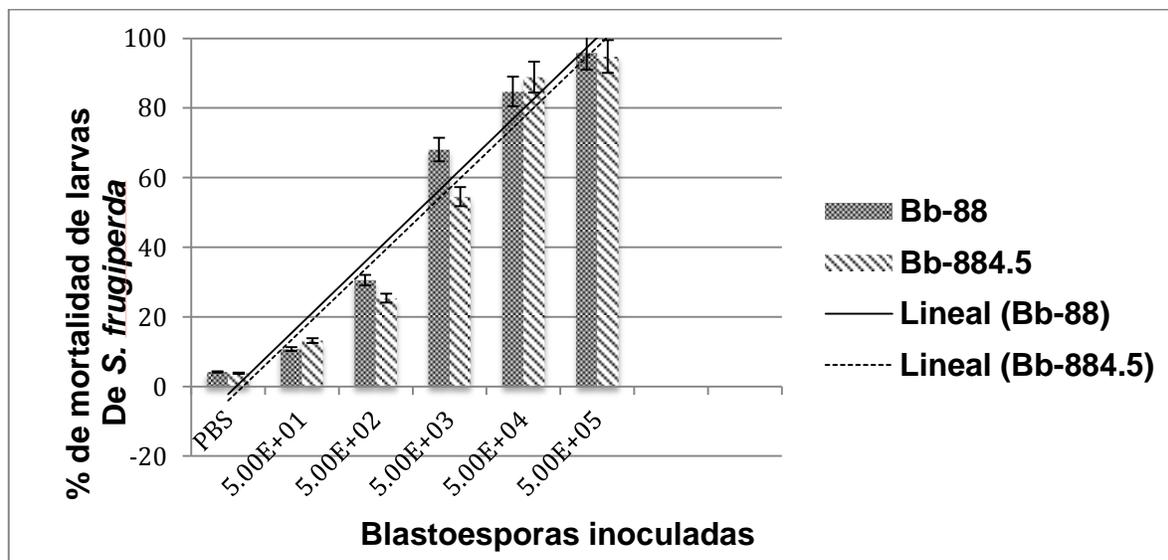


Figura 9. Mortalidades acumuladas causadas por blastoesporas de las dos cepas del hongo en larvas del gusano cogollero *S. frugiperda*; las líneas representan la tendencia de la mortalidad para cada hongo.

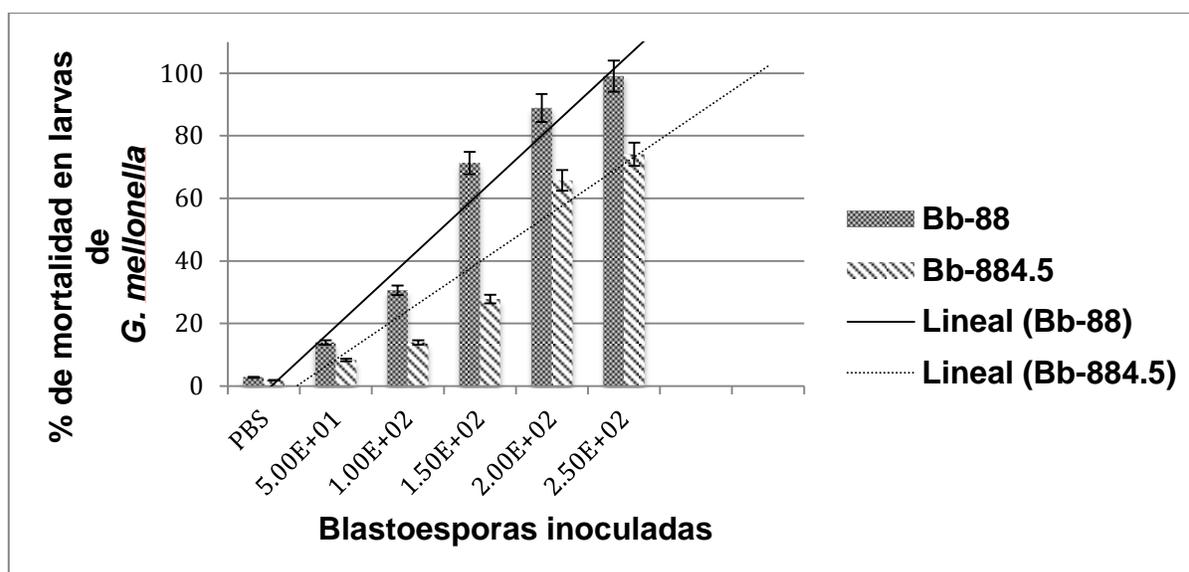
Para la palomilla de la cera (*G. mellonella*), no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre repeticiones de los experimentos, el análisis Probit no mostró diferencias entre las ordenadas al origen de cada línea Probit generada para cada cepa ( $F_{2,84}=2.59$ ,  $P=0.081$ ), ni entre las pendientes ( $F_{2,84}=1$ ,  $P=0.373$ ); lo que permitió combinar los datos para la estimación de virulencia.

**Cuadro 3. Estimación de los valores de la DL<sub>50</sub> para cada cepa sobre larvas de *S. frugiperda* y *G. mellonella*. Estos valores fueron los que se emplearon para cada determinación de la actividad de la FO**

Insecto	Hongo	DL <sub>50</sub>	LS	LI	Intercepto(SE)	Pendiente (SE)
<i>S. frugiperda</i>	Bb-88	2.1X10 <sup>4</sup>	1.4X10 <sup>4</sup>	3.1X10 <sup>4</sup>	-4.262(0.373)	0.9835(0.0819)
	Bb-884.5	2.1X10 <sup>4</sup>	1.2X10 <sup>4</sup>	3.6X10 <sup>4</sup>		
<i>G. mellonella</i>	Bb-88	1.08X10 <sup>2</sup>	1X10 <sup>2</sup>	1.1X10 <sup>2</sup>	-8.744(0.640)	4.295(0.302)
	Bb-884.5	1.7X10 <sup>2</sup>	1.6X10 <sup>2</sup>	1.9X10 <sup>2</sup>	-7.506(0.777)	3.342(0.353)

DL<sub>50</sub>= Dosis letal media, LS= Límite superior, LI=Límite inferior, SE= error estándar

Al comparar las líneas Probit generadas para cada cepa (Bb 88 y Bb 884.5) en larvas de *G. mellonella*, se observó diferencias en las ordenadas al origen ( $F_{1,86}=74.36$ ,  $P<0.001$ ) pero no entre las pendientes ( $F_{1,86}=4.44$ ,  $P=0.38$ ). Esto sugiere diferencias en la virulencia entre cepas (Cuadro 3). La DL<sub>50</sub> en las larvas del *G. mellonella* de la cepa Bb 88 es  $1 \times 10^2$  blastosporas/larva y de la cepa mutante Bb 884.5 es de  $1.7 \times 10^2$  blastoesporas/larva (figura 10).



**Figura 10. Mortalidad acumulada por inoculación de blastosporas de las dos cepas del hongo sobre larvas de la palomilla de la cera *G. mellonella* las líneas representan la tendencia de la mortalidad para cada hongo.**

## 4.2. Actividad de la Fenoloxidasa (FO)

### 4.2.1. *Spodoptera frugiperda*

La actividad de la fenoloxidasa en larvas de *S. frugiperda* fue similar entre la cepa silvestre, mutante y el control ( $H=0.44$ ;  $P=0.8$ ; Figura 11).

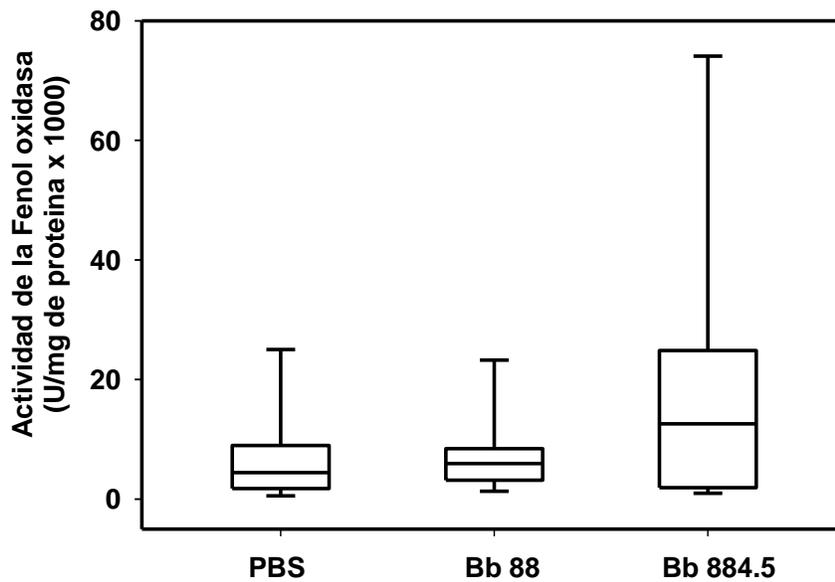


Figura 11. Actividad de la fenoloxidasa de la hemolinfa de *S. frugiperda*. Las barras representan el primer y tercer cuartil de la actividad de la fenoloxidasa del gusano cogollero. La línea central indica la mediana. Las barras de error representan los valores máximos y mínimos.

#### 4.2.2. *Galleria mellonella*

Se encontraron diferencias entre el control y las cepas de *B. bassiana* ( $H=7.77$ ,  $P=0.02$ , Figura 12). Sin embargo, entre la cepa silvestre y la mutante no hay diferencias en la actividad de la fenoloxidasa ( $H=0.55$ ,  $P=0.4564$ ).

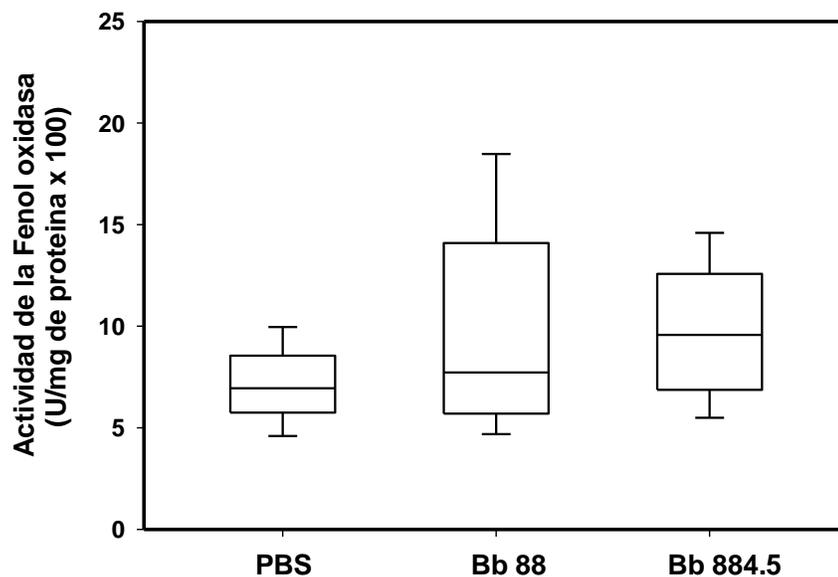


Figura 12. Actividad de la fenoloxidasasa en la hemolinfa de *Galleria mellonella*. Las barras representan el primer y tercer cuartil de la actividad de la fenoloxidasasa de la palomilla de la cera. La línea central indica la mediana. Las barras de error representan los valores máximos y mínimos.

## V. DISCUSION

En esta investigación se comparó dos cepas de *B. bassiana*, una silvestre y otra mutada, cuyas características biológicas fueron anteriormente estudiadas (Montesinos-Matías et al., 2011). La cepa mutante produce casi 50% más proteasas tipo Pr1 que la silvestre. Dicha proteasa es considerada como esencial para la penetración de la cutícula y que por lo tanto es una característica que se ha empleado como prioritaria para el aumento de la virulencia en cepas transgénicas (St Leger *et al.*, 1996a; Wang *et al.*, 2002; Mohanty *et al.*, 2008; Montesinos-Matías *et al.*, 2011).

Cuando estos mismos hongos se introdujeron en la hemolinfa de *S. frugiperda*, la  $DL_{50}$  fue similar para los dos aislamientos ( $2.1 \times 10^3$  blastosporas/larva). No ocurrió lo mismo cuando las blastosporas de ambos aislamientos se inocularon en larvas de *G. mellonella*, pues en este insecto si se encontraron diferencias, es decir, el aislamiento silvestre requirió de una menor cantidad de blastosporas/larva ( $1.08 \times 10^2$ ) que el aislamiento mutante ( $1.7 \times 10^2$ ).

Los datos de nuestros experimentos indican que la Pr1 no es un factor exclusivo de la virulencia. Es decir que esta característica actúa de forma sinérgica con otros componentes degradadores de la cutícula para poder causar una virulencia más alta (Smith *et al.*, 1981; St Leger *et al.*, 1986a,b; Beys da Silva *et al.*, 2010) y que por lo menos en un insecto susceptible como *G. mellonella* se pudo observar este fenómeno, al requerir la mutante mayor cantidad de blastosporas para causar la muerte del 50% de la población.

Cuando se realizó la cuantificación de la fenoloxidasa en *S. frugiperda*, tampoco se encontró una diferencia que pudiera estar mediada por esta característica, pues en los tres tratamientos se observó la misma tendencia. En larvas de *G. mellonella*, la actividad de la FO en los insectos que fueron tratados con PBS (testigo) y los aislamientos fueron diferentes, pero al comparar entre ambos aislamientos, no se encontraron diferencias.

Parte de estas diferencias están directamente correlacionas con la coloración, biología y hábitos de alimentación de cada insecto. Por ejemplo, se sabe que larvas con una

coloración más oscura y de hábitos solitarios como lo es *S. frugiperda* producen una mayor cantidad de hemocitos y una mayor producción de la fenoloxidasa que son los directamente responsables de la defensa ante agentes extraños en la hemolinfa del insecto (Sussman, 1949; Wyatt, 1961). De la misma forma en poblaciones gregarias como *G. mellonella* les resulta demasiado costoso poder mantener un alto porcentaje de hemocitos que puedan hacer frente a estas infecciones, por lo que tienden a invertir más en la capacidad competitiva por los recursos disponibles en la alimentación que las especies que viven de forma solitaria (Kraaijeveld *et al.*, 2001).

Por otra parte consideramos que las fuentes de alimentación en las que fueron criadas ambas especies son completamente diferentes en cuanto a su composición y proporción y es más probable que la dieta semi-artificial donde fue criada *S. frugiperda* este más completa en cuanto a proteínas, mientras que las larvas de *G. mellonella* por la técnica de reproducción se adicionan mayor cantidad de carbohidratos (miel y maíz molido). Lee *et al.*, (2008) evaluó el efecto de la calidad de la dieta (cantidad de proteína) sobre la melanización cuticular y la inmunocompetencia y encontró que el grado de melanización cuticular y los mecanismos fisiológicos como la actividad antibacteriana y la actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa del insecto para resistir a la infección fue más alto en larvas que se alimentaron con dietas ricas en proteínas.

Al realizar la cuantificación de unidades enzimáticas de FO en la hemolinfa, se observó que para *S. frugiperda* no hubo cambios entre la mutante y la silvestre. Por lo tanto si la serina proteasa fue sobreactivada por la presencia de la producción de Pr1 de la cepa mutante Bb-884.5 es muy probable que *S. frugiperda* esté haciendo frente al patógeno con una combinación entre la respuesta humoral y la respuesta celular; y que por lo consiguiente requiere de una mayor cantidad de inóculo para poder matar el 50% de la población.

El efecto sobre *G. mellonella* mostro que el aislamiento mutante Bb 884.5 requiere de mayor cantidad de inóculo comparado con el aislamiento silvestre. Es probable, que este resultado sea consecuencia de sobreproducción de la Pr1 el cual activa la vía Toll y por

ende desencadena en la producción de péptidos antimicrobianos haciendo que rápidamente se dispare la producción de la FO, de esta manera el medio donde se desarrolla el hongo se vuelve un medio muy toxico (Gottar *et al.*, 2006). La gran mayoría de aislamientos transformadas para la sobreexpresión de la Pr1, pueden reducir significativamente el tiempo de alimentación, reduciendo con ello el daño a los cultivos (Wang y St Leger, 2007; Leng *et al.*, 2011).

Los resultados de nuestra investigación sugieren que al hacer la comparación entre un insecto altamente tolerante a la infecciones (*S. frugiperda*) y un insecto susceptible (*G. mellonella*), influyen otros factores como la alimentación y el ciclo biológico, que cumplen una función muy importante en la defensa del insecto. La sobreproducción de la proteasa Pr1 en el aislamiento mutante, incrementa la producción de fenoloxidasa pero no es suficiente para causar alta mortalidad, ya que requiere de otros factores de virulencia como la velocidad de germinación y de crecimiento (Montesinos-Matías, 2011), que son cruciales para el éxito del hongo sobre su hospedante.

## VI. CONCLUSION

Al comparar entre un insecto altamente tolerante a la infecciones (*S. frugiperda*) y un insecto susceptible (*G. mellonella*), se observó que la alimentación y el ciclo biológico, son factores que cumplen una función muy importante en la defensa del insecto.

La sobreproducción de la proteasa Pr1 en el aislamiento mutante, incrementa la producción de fenoloxidasa pero no es suficiente para causar alta mortalidad.

En *S. frugiperda* no hubo diferencias entre la mutante y la silvestre, por lo que es muy probable que esté haciendo frente al patógeno con una combinación entre la respuesta humoral y la respuesta celular; y que por lo consiguiente requiere de una mayor cantidad de inóculo para poder matar el 50% de la población.

El efecto sobre *G. mellonella* mostro que el aislamiento mutante Bb-884.5 requiere de mayor cantidad de inóculo comparado con el aislamiento silvestre.

Nuestros resultados sugieren que la especie de insecto tiene un mayor efecto sobre la actividad de la FO que diferentes aislamientos del mismo hongo.

## VII. LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S.1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. of Economic Entomology, 18, 265-267.
- Allen, K.E; M. T. McNally; H. S. Lowendorf; C. W. Slayman and s. J. Free. 1989. Deoxyglucose resistant mutants of *Neurospora crassa*: isolation, mapping, and biochemical characterization. Journal of Bacteriology. 171(1): 53-58.
- Antier, P; A. Minjares; S. Roussos; M. Raimbault and G. Viniegra-González. 1993. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. Enzyme and Microbial Technology, 15: 254-260.
- Ashfat, M; N. K. All-Tememi and S. Ahmed. 2005. Effect of artificial diets on some parameters of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. under optimum conditions. J. Agric. Res. 43(3):223-228.
- Ashida, M. and K. Dohke. 1980. Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry.10: 37-47.
- Ashida, M., and P. 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). London, UK: Chapman and Hall, pp. 135-172.
- Beckage, N. E. 2008. Insect immunology. Oxford: Academic Press. 348 pp.
- Beerntsen, B, T; A. A. James and B. M. Christensen. 2000. Genetics of mosquito vector competence. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 115-137.
- Bettencourt, R; H. Asha; C. Dearolf and Y. T. Ip. 2004. Hemolymph-dependent and independent responses in *Drosophila* immune tissue. J. Cell. Biochem. 92: 849-863.
- Bettencourt, R; H. Lanz-Mendoza; K. R. Lindquist and I. Faye. 1997. Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. Eur. J. Biochem. 250: 630-637.
- Beys da Silva, W.O; L. Santi; A. P. F. Correa; L. A. D. Silva; F. R. Bresciani; A. Schrank and M. H. Vainstein. 2010. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic activity in response to different substrate including components of arthropod cuticle. Fung Biol. 114:911-916.
- Boucias D. G and J. C. Pendland. 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers pp:1-14.
- Bowman, S. M. and S. J. Free. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays. 28: 799-808.

- Broderick, N.A; D. P. Welchman and B. Lemaitre. 2009. Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In: Rolff, J., Reynolds, S.E. (Eds.), Insect infection and immunity, evolution, ecology, and mechanisms. Oxford University Press, NY, pp. 34–48.
- Brown K. L., C. Cosseau; J. L. Gardy and R. E. Hancock. 2007. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends Immunol.* 28: 260–266.
- Bulet, P. and R. Stöcklin. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.*12:3–11.
- Carrillo-Benítez; M. G. 2012. Diversidad y estructura genética de poblaciones de hongos patógenos infectando larvas de gallina ciega en Guanajuato, México. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 80 pp.
- Carton, Y; F. Frey and A. J. Nappi. 2009. Parasite-induced changes in nitric oxide levels in *Drosophila paramelanica*. *J. Parasitol.* 95: 1134-1141.
- Cerenius, L and K. Söderhäll. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116–126.
- Chaffin, W.L; J. L. López-Ribot; M. Casanova; D. Gozalbo and J. P. Martínez. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 130-180.
- Chapuisat, M; A. Oppliger; P. Magliano and P. Christe. 2007. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proc. Biol. Sci.* 274:2013–2017.
- Chattaway, F. W; M. R. Holmes y J. E. Barlow. 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 51: 367-376.
- Charroux, B; T. Rival; K. Narbonne-Reveau and J. Royet. 2009. Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes Infect.*11:631–636.
- Christensen, B. M; J. Li; C. C. Chen and A. J. Nappi. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in Parasitology* 21:192-199.
- Clarke, C.A; C. G. C. Dickson and P. M. Sheppard. 1963. Larval color pattern in *Papilio demodocus*. *Evolution.* 17:130–137.
- Clarkson J. M. and A. K. Charnley. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology.* 4(5):197-203.
- Couteaudier, Y; M. Viaud and G. Riva. 1996. Genetic nature, stability, and improvement virulence of híbrids from protoplast fusión un *Beauveria*. *Microbiol. Ecol.* 32:1-10.

- Dong, Y. M; H. E. Taylor and G. Dimopoulos. 2006. AgDscan, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* immune system. *PlosBiol.* 4: 1137-1146.
- Dostert, C; E. Jouanguy; P. Irving; L. Troxler; D. Galiana-Arnoux; C. Hetru; J.A. Hoffmann and J. L. Imler. 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat. Immunol.* 6(9):946-953.
- Dunn, P. E; T. J. Bohnert and V. Russel. 1994. Regulation of antibacterial protein synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta*. *Annals of the New York Academy of Science.* 712: 117-130.
- Duvic, B; V. Jouan; N. Essa; P. A. Girard; S. Pages and Z. Abi Khattar. 2012. Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. *J Insect Physiol.* 58:881–888.
- Fan, Y; W. Fang ; S. Guo; X. Pei; Y. Zhang; Y. Xiao; D. Li; K. Jin; M. J. Bidochka and Y. Pei. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strain overexpressing and engineered chitinase. *App. Environ. Microbiol.* 73(1): 295-302.
- Fieller, E.C. 1944. A fundamental formula in the statistics of biological assay, and some applications. *Q. Jour. of Pharmacy and Pharmacology.* 17: 117-123.
- Galko, M. G. and M.A. Krasnow. 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol.* DOI: 10.1371/journal.pbio.0020239.
- Gillespie, A. T. and Claydon. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science* 27: 203-215.
- Gliński, Z., Buczek, K., 2003. Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta* 38, 183–189.
- Goettel, M.S., and D.G Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. p. 213-249. *In* Lacey, L.A. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology.* Academic Press, London, UK.
- González-Santoyo, I. and A. Cordova-Aguilar. 2011. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 142(1): 1-16.
- Görke, B. and J. Stülke. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many walls to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 613-624.
- Gorman, M. J. P. Kankanala and R. M. Kanost. 2004. Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco horn-worm eggs. *Insect. Molecular Biology.* 13: 19-24.

- Gottar, M; V. Gobert; A. A. Matzkevich; J-M. Reichart; C. Wang; T.M. Butt; M. Belvin. J. A. Hoffmann and D. Ferrandon. 2006. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*. 127:1425–37.
- Greene, E. 1989. A diet-induced developmental polymorphism in a caterpillar. *Science*, 243: 643–646.
- Hegedus, D. D. and G. G. Khachatourians. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances* 13(3): 455-490.
- Hernández-López, J. 2010. Virulencia de aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch) (Ascomycetes: Hypocreales) en larvas de gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeidae) y su interacción con algunos factores bióticos y abióticos. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 59 pp.
- Hernández-Martínez, S; M. H. Lanz-Rodríguez; L. González-Cerón and V. Tsutsumi. 2002. Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 39: 61-69.
- Hillyer, J. F; S. L. Schmidt and B. M. Christensen. 2003a. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res.* 313: 117-127.
- Hillyer, J.F; S. L. Schmidt and B. M. Christensen. 2003b. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and Plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Parasitol.* 89: 62-69.
- Hultmark, D; H. Steiner; T. Rasmuson and H. G. Boman. 1980. Insect immunity. purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106: 7-16.
- Ibarra-Cortés; K. H. 2011. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de la cochinilla rosada del hibisco *Maconelicoccus hirsutus* Green. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 40 pp.
- Imler, J.L and I. Eleftherianos. 2009. *Drosophila* as a model for studying antiviral defenses. In: Rolff, J., Reynolds, S.E. (Eds.), *Insect infection and immunity, evolution, ecology, and mechanisms*. Oxford University Press, NY, pp. 49–68.
- Inglis, G. D; M. S. Goettel; T. M. Butt and H. Stracer. 2001. Fungal biological control Agent: Progress, problems and potential. *CABI International. Fungy as biocontrol Agents*. Edts. T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan. Pp 23-69.

- James, R. R. and J. Xu. 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Jour. Invert. Pathol.* 109:175–182.
- Jin, K; Z. Luo; X. Jiang; Y. Zhang; Y. Zhou and Y. Pei. 2011. Carbon catabolite repressor gene *BbCre1* influences carbon source uptake but does not have a big impact on virulence in *Beauveria bassiana*. *J. Inverteb. Pathol.* 106: 400-406.
- Jiang H; A. Vilcinskas and M. R. Kanost. 2010. Immunity in lepidopteran insect. (Ed: in) K. Söderhäll. *Invertebrate immunity*. Springer Science. Landes Bioescence, 1806, Rio Grande, Austin Texas, 78701, USA.
- Jiang, H. and M. R. Kanost. 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 95–105.
- Joshi, L; R. J. St Leger and M. J. Bidochka. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* 125: 211-218.
- Kanetsuna, F; L. M. Carbonell; R. E. Moreno y J. Rodriguez. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 97:1036-1041.
- Kavanagh, K. and J.P. Fallon. 2010. Technical Focus *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *The British Mycological Society*. Published by Elsevier Ltd. *Fungal biology reviews* 24: 79 -83.
- Kim, J, S; J. Y. Choi; J. H. Lee; J. B. Park; Z. Fu; Q. Liu; X. Tao; B. R. Jin; M. Skinner; B. L. Parker and Y. H. Je. 2013. Bumblebee venom serine protease increases fungal insecticidal virulence by inducing insect melanization. *PLoS One* 8(4): e62555. doi:10.1371/journal.pone.0062555.
- Kraaijeveld, A.R; E. C. Limentani and H. C. J. Godfray. 2001. Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B–Biological Sciences*, 268, 259–261.
- Lamprou, I; I. Mamali; K. Dallas; V. Fertakis; M. Lampropoulou and V. J. Marmaras. 2007. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology* 121: 314-327.
- Lavine, M. D; G. Chen and M. R. Strand. 2005. Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35(12): 1335-1346.
- Lavine, M. D. and M. R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32 (10): 1295-1309.

- Lee, K. P; S. J. Simpson and K. Wilson. 2008. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology*. 22(6). 1052-1061.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan G., Zhao, M. 2011. Applications and development trends in biopesticides. *African J. Biotechnol.* 10(86): 19864-19873.
- Levashina, E.A; L. F. Moita; S. Blandin; G. Vriend; M. Lagueux and F. C. Kafatos. 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*. 104: 709-718.
- Levitin, A., M. Whiteway, 2008. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. *Cellular Microbiology* 10:1021-1026.
- Li, Y; Q. Xiang; Q. Zhang; Y. Huang and Z. Su. 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37(2): 207-215.
- Ling. E; X. Q. Yu. 2006. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 289-299.
- Loera, O; J. Aguirre and G. Viniegra-González. 1999. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enzym. Microb. Technol.* 25: 103-108.
- Loera, O. and G. Viniegra-González. 1998. Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase overproducing mutants using image analysis procedures. *Biotechnol. Tech.*12: 801-804.
- Loera, O. and J. Córdova. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:177-181.
- Loker E. S; C. M. Adema; S. M. Zhang and T. B. Kepler. 2004. Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Invertebrate Immunol. Rev.* 198: 10–24.
- Lowenberger, C. 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*31(3): 219-229.
- Luna, J. M. and G. J. House. 1990. Pest Management in Sustainable Agricultural Systems. In: Edwards, C. A., Lal, R., Madden, P., Miller, R. H. and House, G. (eds) Sustainable Agricultural Systems. Soil and Water Conservation Society, Ankeny, p. 157-173.

- Madigan, M. T; J.M. Martinko; D. A. Stahl and D. P. Clark. 2012. Brock Biology of Microorganisms 13th edition. Pearson. USA.
- Medzhitov, R. and C. A. Jr. Janeway. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9.
- Meirelles, L. D. P; A. M. V. Boas and J. L. Acevedo 1997. Obtention and evaluation of pathogenicity of ultraviolet resistant mutants in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Rev. Microbiol.* 28: 121-124.
- Meister, M; C. Hetru and J. A. Hoffmann. 2000. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. ,in: L. Du Pasquier, G.W. Litman (Eds.), Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System, Current Topics in Microbiology, vol. 248, Springer-Verlag, Berlin. pp. 17–36.
- Michel, T; J. M. Reichhart; J. A. Hoffmann and J. Royet. 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414: 756-759.
- Miller, J. S., R. W. Howard; R. L. Rana; H. Tunaz and D. W. Stanley. 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis*. *J Insect Physiol* 45: 75-83.
- Mohanty. S. S; K. Raghavendra; P. K Mittal and A. P. Dash. 2008. Induction of chymoelastase (Pr1) of *Metarhizium anisopliae* and its role causing mortality to mosquito larvae. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 24(10): 2283-2288.
- Moita, L. F; G. Vriend; V. Mahairaki; C. Louis and F. C. Kafatos. 2006. Integrins of *Anopheles gambiae* and a putative role of a new beta integrin, BINT2, in phagocytosis of *E. coli*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 282-290.
- Montesinos-Matías R; G. Viniestra-González, R. Alatorre- Rosas and Loera O. 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. *World J Microbiol Biotechnol.* 27:2095–2102.
- Montesinos-Matías, R. 2008. Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F. 84 pp.
- Montesinos-Matías, R. 2011. Relación de la inducción/represión de enzimas hidrolíticas con la infectividad en cepas de *Beauveria bassiana* resistentes a 2-Desoxi-D-glucosa. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D. F. 98 pp.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).*63: 95-103.

- Nappi A. J. and B. M. Christensen. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:443-459.
- Nappi, A; M. Poirié and Y. Carton. 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv. Parasitol.* 70: 99-121.
- Nappi, A. J; E. Vass; F. Frey and Y. Carton. 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4: 423-430.
- Nappi, A. J. and E. Vass. 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research.* 6: 117-126.
- Nimrichter, L; M. L. Rodríguez; E. G. Rodrigues and L. R. Travassos. 2005. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* 7: 789-798.
- Orduño-Cruz, N. 2009. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre picudo del nopal *Metamasius spinolae*. Tesis de maestría, Campus Montecillo. 79 pp.
- Palusińska-Szys, M; A. Zdybicka-Barabas A; B. Pawlikowska-Pawłęga; P. Mak and M. Cytryńska. 2012. Anti-*Legionella dumoffii* activity of *Galleria mellonella* defensin and apolipophorin III. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 17048-17064.
- Parvez. S; M. I. Rajoka; M. N. Ahmed; F. Latif; R. Shahid and K. A. Malik. 1998. 2 deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica.* 43(1): 59-62.
- Payne, R.W., Murray, D.M., Harding, S.A., Baird, D.B. and Soutar, D.M. 2005. *GenStat for Windows (8th Edition) Introduction.* VSN International, Hemel Hempstead.
- Pendland, J. C., S. Y. Hung and D. G. Boucias. 1993. Evasion of host defense by *in vivo*-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. *J Bacteriol.* 175: 5962–5969.
- Piao, S., Y. L. Song; J. H. Kim; S. Y. Park; J. W. Park; B. L. Lee; B. H. Oh and N. C. Ha. 2005. Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *EMBO J.* 24: 4404–4414.
- Pontón, J; M. J. Omaetxebarria; N. Elguezabal; M. Alvarez and M. D. Moragues. 2001. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med. Mycol.* 39 (Supl. 1): 101- 110.
- Pontón, J. 2008. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 78-82.

- Posada, F.J. and F. E. Vega. 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science*, 5:37.
- Powning, R.F and W. J Davidson. 1976. Studies on the insect bacteriolytic enzymes-II. Some physical and enzymatic properties of lysozyme from haemolymph of *Galleria mellonella*. *Comp. Biochem. Physiol.* 55:221–28.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Randez-Gil, F; A. Blasco; J. A. Prieto, and P. Sanz. 1995. Title DOG<sup>R</sup>1 and DOG<sup>R</sup>2: Two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2–deoxyglucose resistance when overexpressed. *Yeast* 11: 1233–1240.
- Robledo-Monterrubio, R; R. Alatorre-Rosas; G. Viniegra-González and O. Loera. 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Strains based on 2-deoxi-D glucose resistance and physiological analysis. *J. Inv. Pathol.* 101:222-227.
- Rodríguez-Gómez D; O. Loera; G. Saucedo-Castañeda and G. Viniegra-González. 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and of *Tenebrio mellitor*. *World J. Microb. Biot.* 25:513-518.
- Sideri, M; S. Tsakas; E. Markoutsas; M. Lampropoulou and V. J. Marmaras. 2008. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase- dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology* 123: 528-537.
- Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50:529-551.
- Shrestha. S; Y. Park; D. Stanley and Y. Kim. 2010. Genes encoding phospholipases A2 mediate insect nodulation reactions to bacterial challenge. *J. Insect Physiol.* 56: 324-332.
- Rojas, F. 2010. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 658-684.
- Smith, R.J; S. Pehrul and E. A. Grula. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* 38:335–344.
- Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization a recognition system of arthropods? A Review. *Develop. Comp. Immunol.* 6(4): 601-611.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 10: 23-28.

- St Leger R. J. and C. S. Wang. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pest. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:901-907.
- St Leger, R. 1995. The role of cuticle degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73 (Supp.1): S1119-1125.
- St Leger, R. J; A. K. Charnley and R. M. Cooper. 1986a. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 48:85-95.
- St Leger, R. J; L. Jhosy; M. J. Bidochka and D. W. Roberts. 1996a. Costruction of an improvement mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:6349-6354.
- St Leger, R. J; L. Joshi; M. J. Bidochka; N. W. Rizzo and D. W. Roberts. 1996b. 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.* 62:907-912.
- St Leger, R. J; P. K. Durrands; A. K. Charnley and R. M. Cooper. 1988b. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* 52:285-293.
- St Leger, R.J; R. M. Cooper and A. K. Charnley. 1986b. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1509-1517.
- St Leger, R.J. 1993. In *Parasites and Pathogens of Insects*, eds. Beckage, N.C., Thompson, S.N. & Federici, B.A. Academic, San Diego. Vol. 2, pp. 211-229.
- Steiner, H; D. Hultmark; A. Engstrom; H. Bennich and H. G. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.* 292:246-248.
- Stephens, J. M. 1962. Bactericidal activity of the blood of actively immunized wax moth larvae. *Can. J. Microbiol.* 8:491-499.
- Strand, M. R. 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. In: Beckage N. (Ed.). *Insect Immunology*. Academia Press. pp. 41.
- Sussman, A. 1949. The functions of tyrosinase in insects. *Quarterly Review of Biology* 24: 328-341.

- Suzuki, A; S. Sarangbin; K. Kirimura and S. Usami. 1996. Direct production of citric acid from starch by a 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. *Ferment Bioeng.* 81(4): 320-323.
- Terenius, O; R. Bettencourt; S. Y. Lee; W. Li; K. Söderhäll and I. Fayne. 2007. RNA interference of Hemolin causes depletion of phenoloxidase activity in *Hyalophora cecropia*. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 571-575.
- Thomas, M. B. and A. F. Read. 2007. Fungal bioinsecticide with a sting. *Nature Biotechnol.* 25(12): 1367-1368.
- Tsakas, S. and V. J. Marmaras. 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. *ISJ.* 7:228-238.
- Upadhyay. R. Y; K. G. Mukergi and B. P. Chamola. 2001. Biocontrol potential and its exploitation in sustainable Agriculture. Plenum Publishers. New York Vol II pp 40-43.
- Vass, E. and A. J. Nappi. 2001. Fruit fly immunity. *BioScience* 51(7): 529-535.
- Vey, A., R. E. Hoagland and T. M. Butt. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 311-346.
- Viljakainen, L. And P. Pamilo. 2008. Selection on an antimicrobial peptide defending in ants. *J. Mol. Evol.* 67:643-652.
- Vinson, S.B., 1991. Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. In: Pathak, J.P.N. (Ed.), *Insect immunity*. Dordrecht, Boston and London: Kluwer Academic Publishers. pp. 171-187.
- Vizioli J. and M. Salzet. 2002. Review. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci.* 23:494-6.
- Volkoff, A.N; J. Rocher; E. d'Alencon; M. Bouton; I. Landais; E. Quesada-Moraga; A. Vey; P. Fournier; K. Mita and G. Devauchelle. 2003. Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine-rich peptides. A new class of defensin-like genes from lepidopteran insects? *Gene.* 319:43-53.
- Von Döhren, H. 2004. Biochemistry and general genetics of nonribosomal peptide synthetases in fungi. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 88: 217-264.
- Wang, C. S, and R. J. St. Leger. 2007. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nat Biotechnol.* 25:1455-1456.

- Wang, C; M. A. Typas and T.M. Butt. 2002. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol Lett 213:251–255.
- Wang, X; R. Aliyari; W. Li; H. Li; K. Kim; R. Carthew; P. Atkinson and S. Ding. 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adults *Drosophila*. Science. 312: 445-454.
- Westergaard, S.L; A. P. Oliveira; C. Bro; L. Olsson and J. Nielsen. 2007. A systems biology approach to study glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering.96(1):134-145.
- Wilson, K; R. Knell; M. Boots and J. Koch-Osborne. 2003. Group living and investment in immune defense: an interspecific analysis. J. Anim. Ecol. 72: 133-143.
- Wojda I; P.Kowalsky and T. Jacobowicz. 2009. Humoral response of *Galleria mellonella* larvae after infection under optimal and heat-shock conditions. J. Ins. Physiol. 55:525-521.
- Wyatt, G. 1961. The biochemistry of insect hemolymph. Ann. Rev. Entomol. 6: 75–102.
- Yount, N. Y and M. R. Yeaman. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 7363-7368.
- Zambon, R. A; M. Nandakumar; V. M. Vakharia and L. P Wu. 2005. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(20): 7257-7262.
- Zaslhoff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 415: 389-395.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Bioc. Scien. Technol. 17: 553-596.