

Efecto de la luz sobre el desarrollo de conidiasporas en *Metharizhium anisopliae* (Hipocreales: Clavicipitaceae)

Selene Lucero Aguilar-Gordillo^{1,2}, Juan Carlos Torres-Guzmán²,
Gloria Angélica Hernández-González², Miguel Ángel Hernández-Espinosa¹.

¹Centro de Investigaciones Costeras, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150, colonia Lajas Maciel, 29, 000 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. | ²Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato Noria Alta s/n, colonia Noria Alta, 36050 Guanajuato, Guanajuato, México. selene.aguilar@unicach.mx

RESUMEN

En la mayoría de los hongos la luz juega un papel fundamental en sus procesos biológicos, tales como la conidiación, proceso por el cual se generan estructuras denominadas esporas que tienen como función propagarse, adherirse e iniciar el ciclo invasivo de estos hongos sobre su huésped. En este estudio se realizaron ensayos de exposición a luz ultravioleta (UV) en el hongo entomopatógeno *Metharizhium anisopliae*, para conocer su respuesta a este estímulo y determinar su participación en la conidiación. Confirmando que *M. anisopliae* responde a la presencia de luz azul preferentemente y a luz roja. A su vez estudiamos factores independientes de luz azul que detonaran la conidiación, indicando que existen factores como: choque térmico, peróxido de hidrógeno, daño mecánico y UV que detonan la conidiación en este organismo, y el estrés osmótico con NaCl y KCl incluso a altas concentraciones no activan este proceso, pero sí reducen la conidiación y crecimiento micelial durante fotoperíodos. Información elemental si se pretende generar un control biológico sobre insectos plagas y reducir los impactos ambientales que se generan al pretender controlarlos empleando productos químicos dañinos para la salud y el medio ambiente.

Palabras clave: luz ultravioleta, ciclo circadiano, *Metharizhium anisopliae*, fotoperíodos, conidiación.

ABSTRACT

In most fungi light plays a fundamental role in biological processes such as conidiation, the process by which structures called spores whose function is to spread, join and start the invasive cycle of these fungi on the host. In this study were performed tests exposure to ultraviolet light (UV) in the entomopathogenic fungus *Metharizhium anisopliae*, for to know your response to this stimulus and determine their participation in conidiation. Confirming that *M. anisopliae* responds to the presence preferably of blue light and red light. In turn studied independent factors of blue light that detonate conidiation, indicating that exist factors such as heat shock, hydrogen peroxide, mechanical damage and UV detonating conidiation in this organism, and osmotic stress with NaCl and KCl even at high concentrations do not activate this process, but if they reduce conidiation and mycelial growth during photoperiod. Basic information if it is to generate a biological control of insect pests and reduce environmental impacts generated by attempting to control them using chemicals harmful to health and the environment.

Key words: ultraviolet light, circadian cycle, *Metharizhium anisopliae*, photoperiod, conidiation.

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, y que a diferencia de virus y bacterias no requieren ser ingeridos para infectar a su hospedero. Su mecanismo de acción es la penetración directa a través del integumento introduciendo el tubo germinativo de un conidio, además abarcan un amplio rango de hospederos y son capaces de infectar a estos en sus diferentes estados de desarrollo (Ferron, 1978; Hajek y St. Leger, 1994). Dentro de los

hongos entomopatógenos se encuentran *Metharizhium anisopliae*, un hongo saprofito hifomicete, de distribución mundial (aislado de insectos infectados y suelo de todos los continentes, excepto de la antártica) y usado en el control de insectos plaga entre ellas: *Phyllophaga ravidia* (gallina ciega), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Oebalus mexicana* (chinche café del sorgo), *Bemisia* spp. (mosquita blanca), invadiendo a más de 200 especies de insectos, con aislados especie-específicos (Paris *et al.*, 2003; Sandino, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Rangel *et al.*, 2008A). Los conidios o esporas son estructuras especializadas

que le permiten a *M. anisopliae* dispersarse fácilmente hasta llegar a su huésped (insectos plaga de cultivos como crucíferas y maíz principalmente), crecer y desarrollarse hasta completar su ciclo de vida e iniciar nuevamente con la liberación de esporas. En campo se le puede identificar fácilmente por la presencia de conidios sobre la cutícula del insecto de color verde olivo, por lo cual se le conoce como “muerte verde” (St. Leger *et al.*, 1997; Sandino, 2003; Moon *et al.*, 2008).

La luz, al igual que en otros hongos parece estimular el desarrollo de conidios. La luz es un factor abiótico que es percibido por proteínas de unión a cromóforos que actúan como fotoreceptores, los cuales traducen la señal para la expresión de genes involucrados en funciones morfogénicas y procesos de reproducción como el fototropismo, habilidad para producir conidios y el desarrollo de estructuras sexual y asexual (Roberts y St. Leger, 2004; Schuster *et al.*, 2007). Los fotoreceptores o receptores de luz, generalmente son complejos proteína/cofactor (proteína/cromóforo) y se han identificado en bacterias, arqueobacterias y eucariotes. Estudios en sistemas eucarióticos han permitido identificar varios tipos de fotoreceptores para la luz azul y roja (Froehlich *et al.*, 2005; Kurti y Keyhani, 2008).

En otros organismos como en el ascomiceto *Neurospora crassa* (moho naranja del pan) se ha estudiado a fondo los mecanismos moleculares implicados en el control de las distintas respuestas a la luz, donde muchas de las respuestas a la luz en *Neurospora* son el resultado de la transcripción de genes involucrados en diferentes procesos fisiológicos, tales como la biosíntesis de carotenos (genes *al-1*, *al-2* y *al-3*), conidiación (gen *con*) y el reinicio del ciclo circadiano (gen *frq*) (Corrochano *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2003; He y Liu, 2005; Esquivel-Naranjo y Herrera Estrella, 2007).

En el caso del hongo *Trichoderma atroviride* es utilizado como agente de biocontrol de una variedad de hongos fitopatógenos. Además, se ser útil como modelo fotomorfológico debido a la esporulación sincronizada que presenta tras un pulso de luz azul (400-480 nm). En condiciones de total oscuridad y con los nutrientes necesarios *T. atroviride* crece indefinidamente como micelio, sin embargo la limitación de nutrientes y la luz detonan el desarrollo de estructuras reproductoras asexuales especializadas (conidios) (Casas-Flores *et al.*, 2004).

Ortíz-Meza (2010) aisló el gen *cie1* (elemento involucrado en la conidiación) de la cepa CARO4 de *M. anisopliae* y obtuvo una cepa transformante por antisentido del gen *cie1* denominado T15. En las que observó que la cepa silvestre CARO4 responde al estímulo luminoso formando anillos de conidiación en fotoperiodos de 12 h luz-12 h oscuridad,

contrario a lo observado con la cepa T15, la cual fue capaz de hiperconidiar en presencia o ausencia del estímulo luminoso, lo que llevó a sugerir que el gen *cie1* es un posible regulador negativo de la conidiación.

En este trabajo, se pretende determinar la participación del gen *cie1* frente al estímulo luminoso y durante el proceso de conidiación a través de ensayos con luz ultravioleta de amplio y bajo espectro.

METODOLOGÍA

Cepas

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron: la cepa silvestre de *M. anisopliae* CARO4 originaria de la región del Bajío, aislada en el Departamento de Ciencias Naturales y Exactas de la División de Ciencias de la Vida, Colima y la cepa T15, transformante que lleva el antisentido del gen *cie1* derivada de la cepa CARO4 obtenida en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato.

Medios de cultivo sólidos y líquidos

Los medios de cultivo empleados para *M. anisopliae* fueron: Medio Mínimo (MM), Medio Dextrosa Sabourad (MDS) y para los medios de cultivo sólido se adicionaron 20 g de agar bacteriológico (Bioxon) por litro de medio de cultivo, con un pH final de 5.7 ± 0.2 . En el Cultivo en Medio Sólido se sembraron 500 conidios/mL de *M. anisopliae*, incubando a 28°C durante 10 días para la producción de conidios y en los Cultivos en Medio Líquido. Los conidios de *M. anisopliae* se sembraron en 100 mL de MDS líquido a una concentración de 1×10^6 conidios/mL, se incubaron por 48 h a 28°C, en agitación constante de 160 rpm.

Obtención de micelio y cuantificación de conidios

Se obtuvo micelio crecido en medio líquido a las 48 h de incubación el cual fue almacenado a -70°C. Los conidios obtenidos pos medio sólido se resuspendieron en 20 mL de agua desionizada estéril con Tritón X-100 al 0.01 %, se almacenaron a 4°C y fueron contabilizados en cámara de Neubauer.

Ensayos de luz UV

Para evaluar el efecto de la luz en el crecimiento y esporulación de la cepa CARO4 *M. anisopliae* y de la transformantes en antisentido del gen *cie1* (T15), 500 conidios de la cepa silvestre o de la transformante fueron inoculadas en cada placa de medio mínimo. Las placas fueron incubadas en periodos de 12 h de luz blanca-12 h oscuridad o en oscuridad constante (placas cubiertas con papel aluminio)

durante 10 días a 28°C en un incubador (Low Temperature Illuminate Incubator, Precision Scientific).

Para los ensayos de pulsos de luz azul, de la cepa CARO4 de *M. anisopliae*, se inocularon 500 conidios, contenidos en 100 µL, en cada caja de MM, se incubaron a 28°C por 48 h en oscuridad, transcurrido este tiempo se expusieron a un pulso de luz azul o roja (5.8 µm/s/m²) por 3 min o 5 min. Posterior al pulso se incubaron a 28°C por 168 h en oscuridad.

Ensayos con factores de estrés

Todos los ensayos de estrés se realizaron inoculando 500 conidios de la cepa CARO4 (contenidos en 100 µL) en cajas de MM, incubadas a 28°C por 48 h en total oscuridad, 1) Peróxido de hidrógeno: transcurridas las 48 h de incubación en total oscuridad, se colocó sobre el micelio formado 100 µL de peróxido de hidrógeno 2 mM y se dejó secar por 5 min.; 2) Luz ultravioleta: tras las 48 h de incubación en total oscuridad, se expuso a la cepa CARO4 por 1 min a 1600 Joules/m² a UVA y UVC; 3) Choque térmico: posterior a las 48 h en total oscuridad, se expuso a la cepa CARO4 a 37°C durante 2 h; 4) Daño mecánico: El micelio crecido por 48 h en total oscuridad fue cortado con la hoja de un bisturí estéril. Una vez realizado el ensayo de estrés sobre las cepa CARO4, se incubó a 28°C durante 8 días en total oscuridad, al término del periodo de incubación se cuantificaron las esporas.

Para los ensayos de estrés osmótico se preparó MM adicionado con NaCl o KCl, en las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 y 2 M. Posteriormente se inocularon 500 conidios de la cepa CARO4 (contenidos en 100 µL) en cada uno de los medios y se incubaron a 28°C por 48 horas en total oscuridad o fotoperiodos (12 h luz-12 h oscuridad).

RESULTADOS

Respuesta a luz de la cepa CARO4 de *M. Anisopliae*

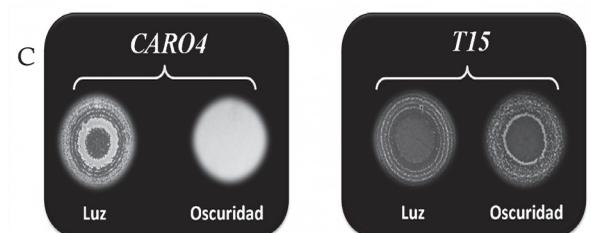
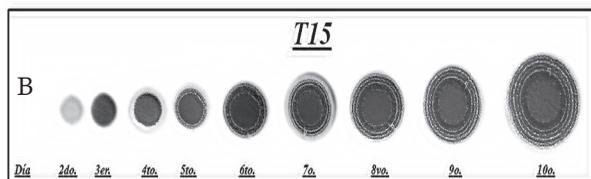
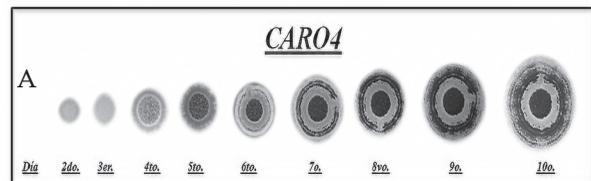
El fenotipo de la cepa silvestre CARO4 responde a los fotoperiodos (12 h luz-12 h oscuridad), en tanto que la cepa silvestre no es capaz de formar conidios en total oscuridad (figuras 1 C, E), pero cuando es expuesta a los fotoperiodos forma anillos de conidiación en respuesta al estímulo luminoso (figuras 1 A, C y D). La cepa transformante T15, es capaz de hiperesporular en presencia (formando anillos de conidiación) (figuras 1 B, C y D) o ausencia (conidiación no sincronizada) del estímulo luminoso (figuras 1 C y E).

En presencia de luz la transformante T15 produjo tres veces más conidios, que la cepa silvestre (6.02 x 10⁸ c/mL vs 2.06 x 10⁸ c/mL). En oscuridad la cepa CARO4

no conidió, y la transformante T15 produjo 5.78 x 10⁸ conidios/mL (figuras 1 D, E). Independientemente del estímulo luminoso la producción de conidios de la cepa T15 en ambas condiciones es similar (6.02 x 10⁸ c/mL en luz y 5.78 x 10⁸ c/mL en oscuridad).

Ensayos de respuesta a luz azul y roja con la cepa CARO4 de *M. Anisopliae*

Evidencia bioquímica y molecular de la existencia de una ruta de percepción de luz azul ha sido reportado en algunos hongos como *T. atroviride* (Berrocal-Tito *et al.*, 2000; Casas-Flores *et al.*, 2006; Rosales-Saavedra *et al.*, 2006; Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007), la cual es necesaria en la regulación de la fotoconidiación, por lo que se decidió exponer a pulsos de luz azul (450-495 nm) y luz roja (620-750 nm) a la cepa silvestre CARO4 de *M. anisopliae*, con el fin de analizar si este hongo responde a un estímulo luminoso específico. Cultivos de 48 h en medio mínimo en total oscuridad fueron expuestos al pulso de luz azul o roja durante 3 o 5 min, e incubados adicionalmente por 7 días en total oscuridad. La cepa silvestre CARO4 respondió a los pulsos de luz azul y roja formando conidios específicamente en el centro de la colonia, a diferencia del control negativo donde se observó que no formó conidios, indicando que la conidiación es específica del estímulo luminoso, ya sea por luz azul o roja (figura 2).



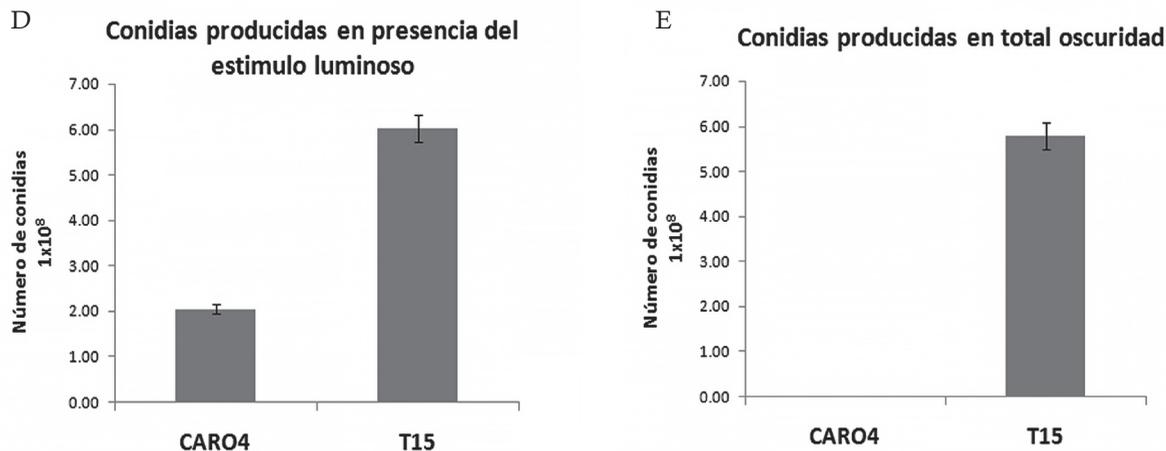


FIGURA 1

Efecto del fotoperíodo 12 h luz-12 h oscuridad en la conidiación de las cepas CARO4 y T15 de *M. anisopliae*. A) y B) Fenotipo de la cepa silvestre CARO4 y T15 durante 10 días de fotoperíodos, respectivamente. C) Fenotipo de la cepa CARO4 y T15 observado al término de los 10 días en los fotoperíodos y en total oscuridad. D) Conidias producidas por las cepas CARO4 y T15 al término de los 10 días de fotoperíodo. E) Conidias producidas al décimo día de total oscuridad por CARO4 y T15. Datos expresados como la media de tres repeticiones experimentales \pm DS.

La mejor respuesta con base en número de conidios producidos fue con el pulso de luz azul, que fue cinco veces mayor con respecto a la respuesta dada al pulso de luz roja, independientemente del tiempo de exposición de 3 o 5 min. En luz azul se produjeron un promedio de 1.6×10^8 conidios/mL, similar al producido en respuesta a la luz blanca. En tanto que en luz roja fue entre 3.17×10^7 y 3.33×10^7 conidios/mL.

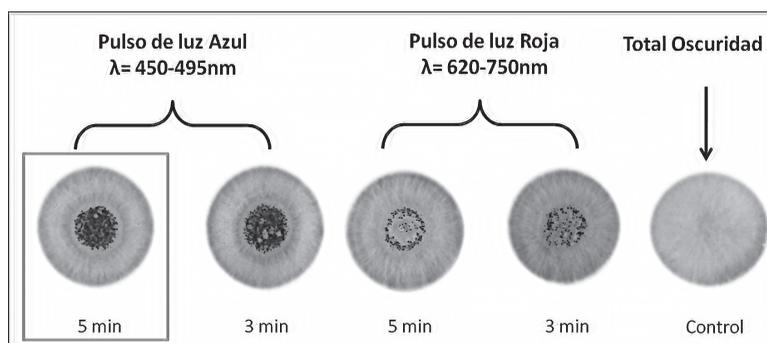


FIGURA 2

Ensayo de fotoconidiación de la cepa silvestre CARO4. Respuesta de la cepa silvestre al pulso de luz azul o roja, el control permaneció en total oscuridad durante nueve días.

Y con el fin de evaluar la intensidad máxima de luz azul a la que responde la cepa CARO4 se realizó un ensayo dosis-respuesta. Para este ensayo los cultivos de 48 h en total oscuridad, donde se expusieron a diferentes intensidades de luz azul 1 % ($0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$), 3 % ($0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$), 6 % ($1.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$), 12 % ($2.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$), 25 % ($5.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$) y 50 % ($11.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Observándose la detonación de la conidiación en todas las intensidades de luz azul

empleadas (1-50 %), encontrando una mayor respuesta con base en número de conidios a una intensidad de luz azul del 25 % ($5.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$) y una respuesta saturante a una intensidad del 50 % ($11.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (figuras 3A, B). Esto podría ser de utilidad cuando se requiera analizar la expresión a tiempos cortos del gen *cie1* mediante RT-PCR o PCR en tiempo real.

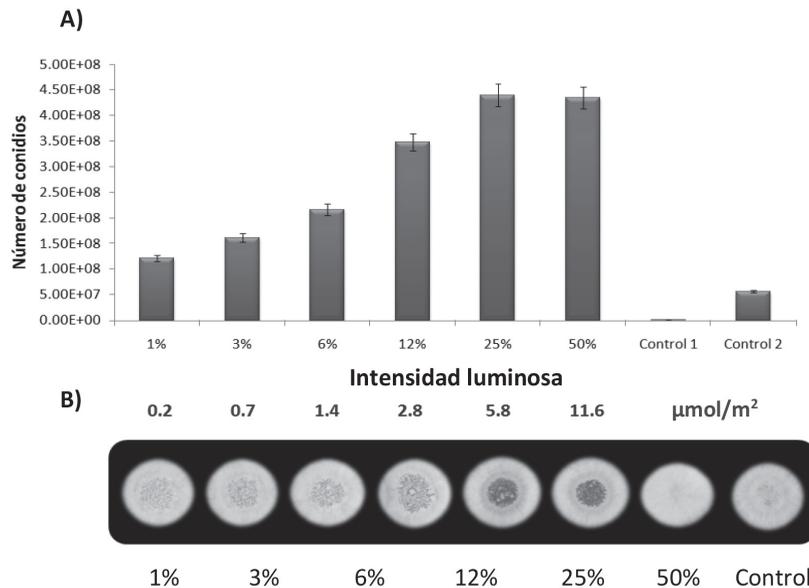


FIGURA 3

Ensayo Dosis-Respuesta de la cepa CARO4 a luz azul. A) Cuantificación de conidios de la cepa CARO4 expuesta a diferentes Intensidades de luz azul. El control 1 permaneció en total oscuridad y el control 2 se expuso a la luz de seguridad. B) Fenotipo observado de la cepa CARO4 expuesta a luz azul. Datos expresados como la media de tres repeticiones experimentales \pm DS.

Efecto de diversos detonantes de estrés en la conidiación de la cepa CARO4.

En *T. atroviride* se sabe que los genes BRL-1 y BLR-2 no son los únicos genes que favorecen la conidiación, ya que aun en las mutantes Δblr el estrés por daño mecánico es capaz de detonar este proceso de diferenciación. Por lo que para identificar factores que pudieran detonar la conidiación en la cepa CARO4 de *M. anisopliae* independientes del estímulo luminoso, se probó el estrés del tipo osmótico, estrés nutricional variando fuentes de carbono, estrés por choque térmico, estrés por daño mecánico y estrés oxidativo.

Para el estrés osmótico se inocularon conidios de CARO4, en medios que contenían KCl o NaCl, utilizando concentraciones de 0.2M a 2 M. Se observó que tanto el KCl y el NaCl en total oscuridad no son capaces de detonar la conidiación figuras 4A, 5A) pero sí causaron reducción del crecimiento radial. El NaCl inhibió el crecimiento a partir de 1.8 M (figuras 4B, 5B). En cuanto a la conidiación se observó una disminución de la conidiación a partir de 0.2 M con KCl y NaCl (1.8×10^8 c/mL y 1.38×10^8 c/mL) con respecto a la cepa silvestre (2.18×10^8 c/mL). La

inhibición total de la conidiación se dio a partir de 1 M de KCl y a 0.6 M de NaCl (figuras 4E, 5E).

El estrés por daño mecánico, choque térmico y estrés oxidativo (peróxido de hidrogeno, UV-A y UV-C), detonan la conidiación en la cepa CARO4 en total oscuridad (figuras 6). El estrés por peróxido de hidrógeno [2mM] produjo una mayor cantidad de conidios 6.14×10^8 c/mL, con respecto al daño mecánico que produce 5.7×10^8 c/mL, la luz UV-C que generan 3.68×10^8 c/mL, el estrés por temperatura que produce 3.43×10^8 c/mL, y finalmente el estrés que menor conidios genera en la cepa CARO4 fue la luz UV-A con 2.90×10^8 c/mL (figura 6C).

Los datos del crecimiento radial muestran, que el estrés donde se genera una drástica reducción con respecto a la cepa silvestre (4.6 cm) fue la luz UV-C con una reducción del 41.7 % (2.6 cm), al que le sigue el peróxido de hidrógeno con una reducción del 13.5 % (3.9 cm), y sin cambios significativos con respecto a la cepa silvestre se encuentran la luz UV-A que muestra una reducción del 1 % (4.52 cm), el daño mecánico con 0.26 % (4.59 cm) y el estrés por temperatura con 0.14 % (4.59 cm) (figura 6B).

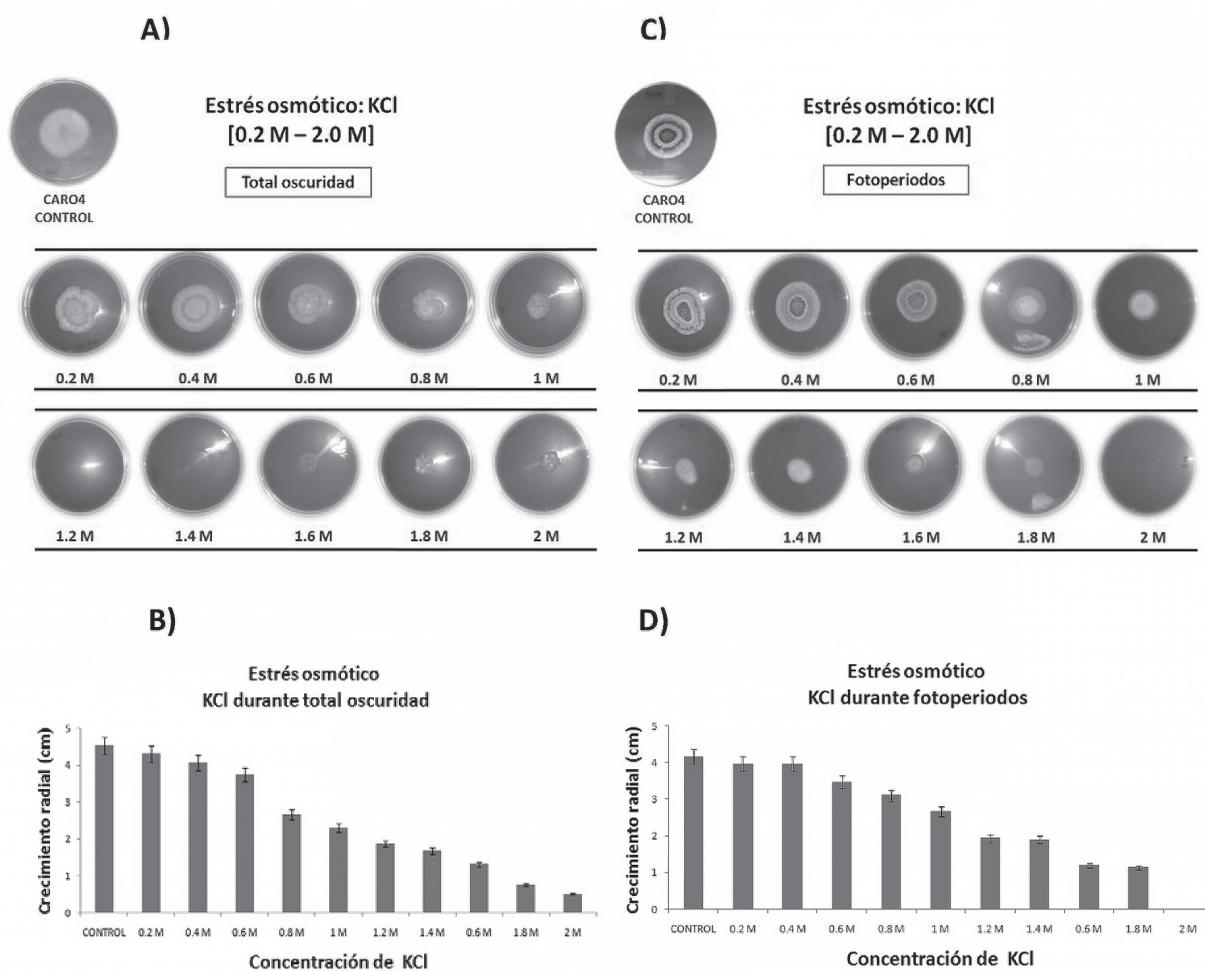


FIGURA 4

Efecto del estrés osmótico con KCl, en total oscuridad o durante fotoperiodos, en la conidiación y crecimiento de *M. anisopliae* cepa CAR04. A) Fenotipos observados bajo estrés con KCl y en total oscuridad. B) Reducción del crecimiento radial en total oscuridad. C) Fenotipos observados bajo estrés con KCl y fotoperiodos. D) Reducción del crecimiento radial durante fotoperiodos. E) Producción de conidios durante fotoperiodos. Los datos son la media de cuatro repeticiones experimentales independientes por cuadruplicado \pm DS.

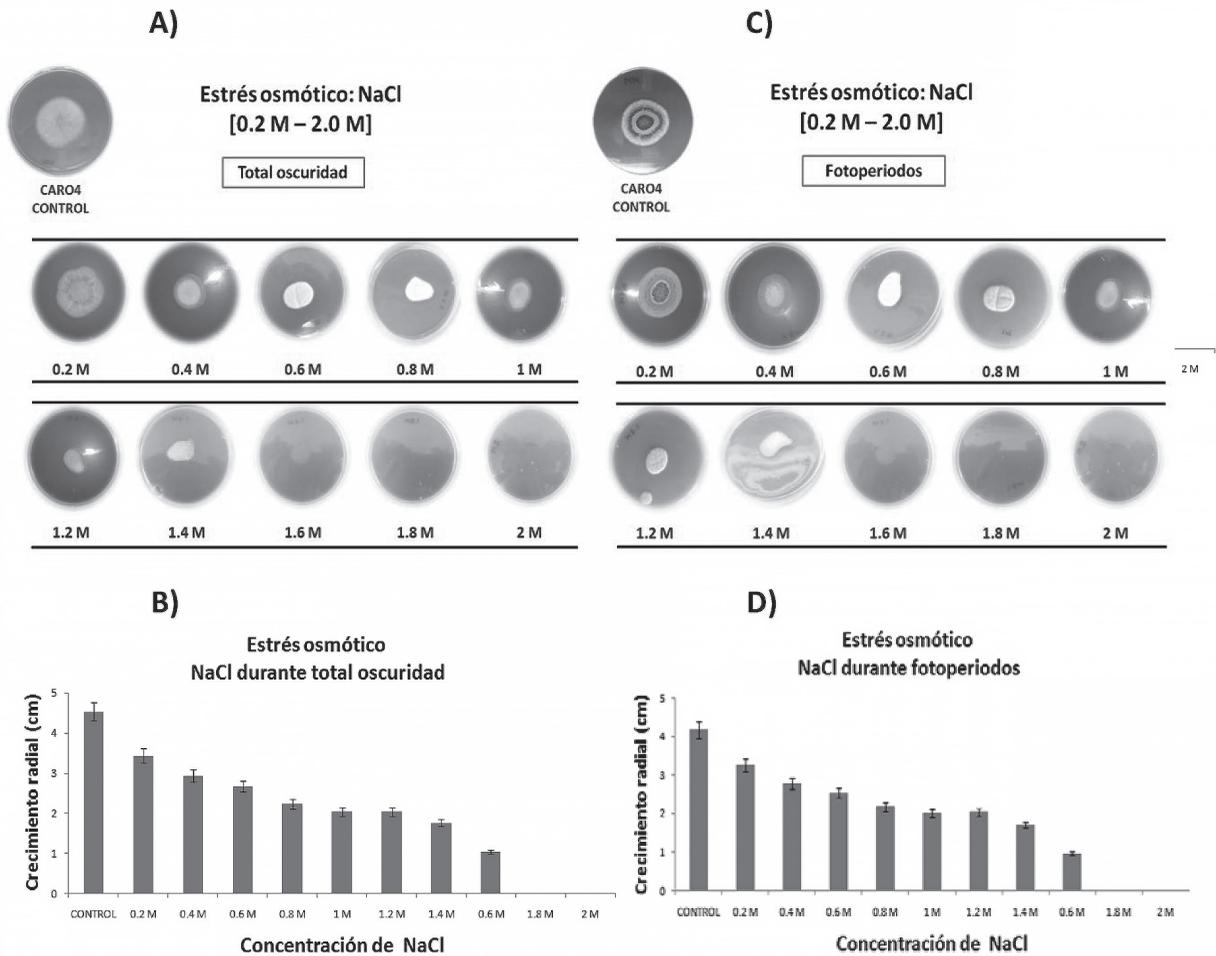


FIGURA 5

Efecto del estrés osmótico con NaCl, en total oscuridad y durante fotoperiodos, en la conidiación y crecimiento en la cepa CARO4 de *M. anisopliae*. A) Fenotipos observados bajo estrés con NaCl y en total oscuridad. B) Reducción del crecimiento radial en total oscuridad. C) Fenotipos observados bajo es estrés con NaCl y fotoperiodos. D) Reducción del crecimiento radial durante fotoperiodos. E) Producción de conidios bajo estrés y durante fotoperiodos. Datos expresados como la media de cuatro repeticiones experimentales independientes por cuadruplicado \pm DS.

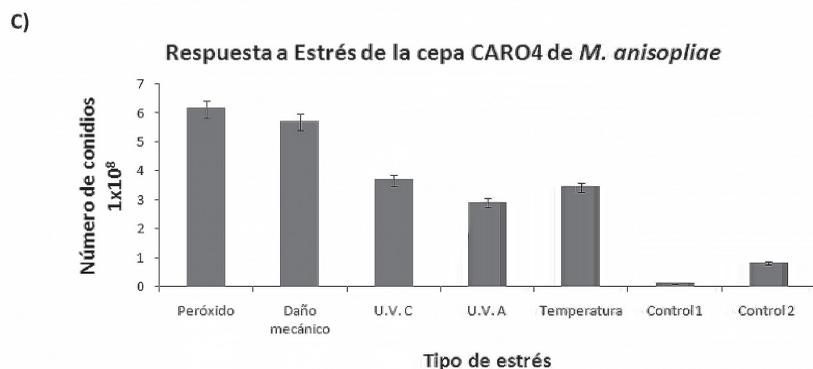
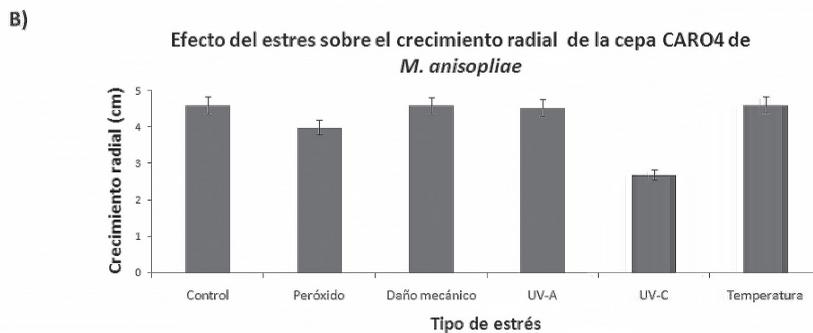
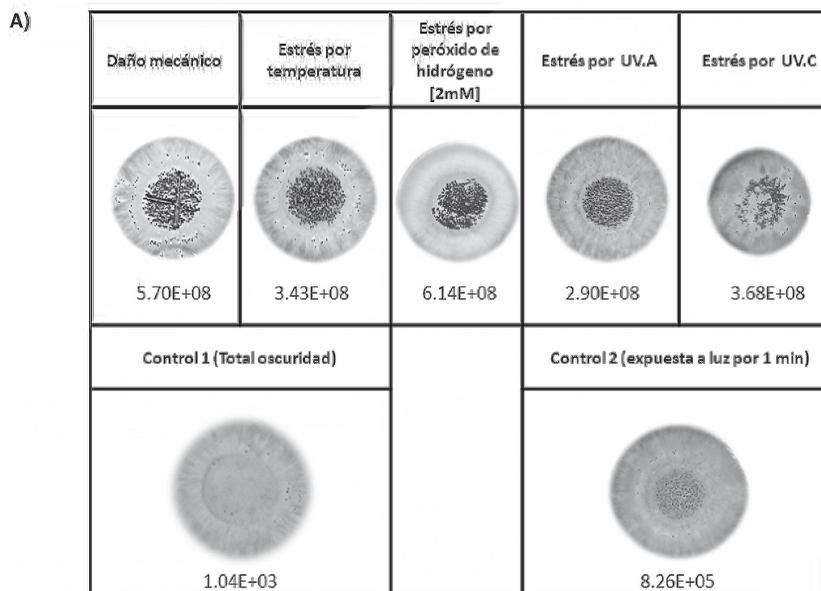


FIGURA 6

Efecto del estrés mediante daño mecánico, choque térmico y estrés oxidativo en la conidiación y crecimiento de la cepa CARO4 de *M. anisopliae*. A) Fenotipos observados al término de los 10 días de incubación en oscuridad tras haber sido sometidas a diferentes condiciones de estrés como se indica en material y métodos. B) Reducción del crecimiento radial. C) Producción de conidios. Los datos están expresados como la media de cuatro repeticiones experimentales \pm DS.

DISCUSIÓN

Respuesta de *M. anisopliae* al estímulo luminoso

En hongos se ha registrado que varios de los procesos fisiológicos y de desarrollo son influenciados por la luz (Schwerdtfeger & Linden 2003; Rosales-Saavedra *et al.*, 2006), principalmente en *N. crassa* y *T. atroviride*. En el ascomiceto *N. crassa*, todas las respuestas a la luz descritas hasta ahora, son detonadas por luz azul (Chen *et al.*, 2009) e incluyen la síntesis de carotenos, entrada al ciclo circadiano, fototropismo y formación de conidios (Chen *et al.*, 2009; Schwerdtfeger & Linden 2003; Linden *et al.*, 1997). En *T. atroviride*, modelo fotomorfo-genético, se demostró que su conidiación y crecimiento micelial son procesos regulados por la luz y la disponibilidad de nutrientes (Casa-Flores *et al.*, 2004; Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007); en tanto que en *M. anisopliae* la fotoconidiación no ha sido reportada, sin embargo, se sabe que la luz influye en el crecimiento micelial (Rangel *et al.*, 2008-A).

En la cepa CARO4 de *M. anisopliae* se observó su capacidad de responder al estímulo luminoso indicado por la formación de anillos de conidiación, así como su respuesta preferencial al pulso de luz azul. Interesantemente la cepa CARO4 responde también al estímulo de luz roja aunque con menor intensidad. Este mismo patrón de respuesta a luz azul y roja ha sido descrito en *T. atroviride* (Casas-Flores *et al.*, 2004). Esto sugiere la existencia de una posible ruta alterna de percepción y señalización inducida por la luz en la cepa CARO4 de *M. anisopliae*, como se ha descrito en *T. atroviride*, donde se observó el incremento de la expresión de los genes *blu-4*, *blu-15* y *blu-8* posterior a la exposición con luz roja, indicando la existencia de una ruta de señalización inducida por luz independiente de las proteínas BLR; también se ha demostrado que la luz roja puede tener un efecto positivo en la expresión de los genes como sucede con *blu-8*, en tanto que la luz azul tiene un efecto negativo en la expresión de este gen; también se demostró que los genes *blu-4* y *blu-15* pueden estar bajo el control de luz roja y azul (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006). En *Aspergillus nidulans* se ha reportado que la luz roja tiene un efecto positivo en el desarrollo sexual (Blumenstein *et al.*, 2005), en la cepa CARO4 no hemos evaluado la participación de la luz roja en este proceso.

Otros Factores Involucrados en la Conidiación

Conocer los niveles de expresión del gen *cie1* y su posible participación como regulador negativo, así como la respuesta a la luz de la cepa CARO4, nos llevó a preguntarnos qué otros factores podrían detonar la conidiación en la cepa CARO4 crecida en total oscuridad.

El estrés osmótico (NaCl y KCl), del cual se ha reportado que en *M. anisopliae* cepa 2575 disminuye la producción de esporas (Rangel *et al.*, 2008-A). en la cepa CARO4 se observó que provoca una reducción en el crecimiento radial durante fotoperiodos y en total oscuridad, y no es capaz de detonar la conidiación en total oscuridad y además se ve disminuida durante fotoperiodos. Aunque pareciera que el estrés osmótico tiene un efecto nocivo en el hongo, también se sabe que este tipo de estrés induce una protección cruzada (resistencia) al choque térmico y UVB (Rangel *et al.*, 2008-B).

El estrés por daño mecánico, choque térmico, peróxido de hidrógeno, UV-A y UV-C, detonaron la conidiación en la cepa CARO4 en total oscuridad. Posiblemente como un fenómeno de protección cruzada que le permita al hongo sobrevivir y tomar ventajas de otros tipos de estrés que podrían estar afectándolo. Además, se ha reportado que en *M. anisopliae* el choque térmico también induce una protección cruzada en hongos a estrés oxidativo, choque térmico y radiación UV (Kapoor & Chakraborty, 1990; Park *et al.*, 1997; Rangel *et al.*, 2008-B). Se ha descrito que la exposición a radiación UV y al calor puede inducir la producción de conidios en hongos expuestos a estos agentes durante el crecimiento micelial (Rangel *et al.*, 2008-B). Se observó también una drástica reducción del crecimiento radial por efecto de UV-C y peróxido de hidrógeno; en tanto que con luz UV-A, daño mecánico y el estrés por temperatura no lo afectaron significativamente.

CONCLUSIONES

La cepa CARO4 de *M. anisopliae* al igual que otros hongos como *T. atroviride* responde al estímulo luminoso formando anillos de conidiación, y aunque responde al espectro de luz roja, la respuesta es de mayor grado al espectro de luz azul, con lo que se podría generar una mayor esporulación de estas cepas con respecto a las silvestre. Existen diversos factores, adicionales al estímulo luminoso, que detonan la conidiación en total oscuridad, como lo son el daño mecánico, choque térmico, estrés por luz ultravioleta (A y C), así como el estrés por peróxido de hidrógeno posiblemente debido a un efecto de protección cruzada.

El estrés osmótico con NaCl y KCl no detonan la conidiación, aunque tienen como efecto la reducción del crecimiento radial y la inhibición de la conidiación durante fotoperiodos. La luz favorece el desarrollo de conidios en la cepa silvestre CARO4 incrementando su posibilidad de acción y efectividad frente a los insectos plaga. Además, con base en los estudios con diversos detonantes de estrés nos sugieren que el proceso de conidiación podría estar dado por rutas de señalización distintas a la originada por el estímulo luminoso.

LITERATURA CITADA

- BLUMENSTEIN A., K. VIENKEN, R. TASLER, J. PURSCHWITZ, D. VEITH, N. FRANKENBERG-DINKEL & R. FISCHER, 2005. The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Current Biology* 15: 1833–1838.
- CASAS-FLORES S., M. RIOS-MOMBERG, M. BIBBINS, P. PONCE-NOYOLA & A. HERRERA-ESTRELLA, 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150: 3561–3569.
- CHEN C., C. RINGELBERG, R. GROSS, J. DUNLAP & J. LOROS, 2009. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO Journal* 28: 1029-42.
- CORROCHANO L., F. LAUTER, D. EBBOLE & C. YANOFSKY, 1995. Light and developmental regulation of the gene con-10 of *Neurospora crassa*. *Developmental Biology* 167: 190-200.
- ESQUIVEL-NARANJO E. & A. HERRERA-ESTRELLA, 2007. Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by blr-2 overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 153: 3909–3922.
- FERRON P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
- FROEHLICH A., B. NOH, R. VIERSTRA, J. LOROS & J. DUNLAP, 2005. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 4: 2140–2152.
- HE Q. & Y. LIU, 2005. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes & Development* 19:2888.
- HAJEK A. & R. ST. LEGER, 1994. Interaction between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- KAPOOR M. & B. CHAKRABORTY, 1990. Transformation of filamentous fungi by electroporation. *Nucleic Acids Research* 18: 6737- 1990.
- KURTTI T. & N. KEYHANI, 2008. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 154: 1700–1709.
- LINDEN H., P. BALLARIO & G. MACINO, 1997. Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 22: 141–150.
- LIU Y., Q. HE & P. CHENG, 2003. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two white collar proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 2131–2138.
- MOON Y., B. DONZELLI, S. KRASNOFF, H. MCLANE, M. GRIGGS, P. COOKE, D. VANDENBERG, D. GIBSON & A. CHURCHILL, 2008. *Agrobacterium*-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4366-4380.
- ORTIZ MEZA, A. 2010. Aislamiento de cDNAs de expresión diferencial durante el crecimiento de *Metarhizium anisopliae* en cutícula de *Phyllophaga ravidia* mediante la técnica RDA (análisis diferencial representativo). Tesis Doctorado. Universidad de Guanajuato. 102 p.

- PARIS S., D. WYSONG, J. DEBEAUPUIS, K. SHIBUYA, B. PHILIPPE, R. DIAMOND & P. LATGÉ, 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* 71: 3551–3562.
- PARK J., C. GRANT, P. ATTFIELD, I. DAWES, 1997. The freeze–thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3818–3824.
- RANGEL D., D. ALSTON & D. ROBERTS, 2008-A. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research* 112: 1355-1361.
- RANGEL D., A. ANDERSON & D. ROBERTS, 2008-B. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological Research* 112: 1362-1372.
- ROBERTS D. Y R. ST. LEGER, 2004. *Metarhizium* spp. Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: micological aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54:1-70.
- ROSALES-SAAVEDRA T., E. ESQUIVEL-NARANJO, S. CASAS-FLORES, P. MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, E. IBARRA-LACLETTE, C. CORTES-PENAGOS & A. HERRERA-ESTRELLA, 2006. Novel light-regulated genes in *T. atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152: 3305–3317.
- SANDINO, V. M., 2003. Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar. Nicaragua. FUNICA/UNA/CATIE, 26 p.
- SCHUSTER A, C. KUBICEK, M. FRIEDL, I. DRUZHININA & M. SCHMOLL, 2007. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. *BMC Genomics* 8: 449.
- SCHWERDTFEGER C. & H. LINDEN, 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO Journal* 22: 4846–4855.
- ST. LEGER R., L. JOSHI & D. ROBERTS, 1997. Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* 143: 1983-92.
- ZHANG Z., C. HENDERSON & S. GURR, 2004. *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defence. *Molecular Plant Pathology* 5:537-547.

