

## 7.0 DISCUSION

En el presente trabajo el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cepa BbCh 1, fue expuesto a luz ultravioleta, obteniéndose colonias mutantes (136), de las cuales fueron seleccionaron 6 cepas mutantes que mostraron mayor actividad proteasa que la cepa paterna. La estabilidad bioquímica y genética fue verificada mediante resiembras sucesivas y alternadas en agar caseína y agar YPD, así como también la producción de proteína y actividad enzimática al crecerlas en un medio inductor de proteasas, su perfil de producción de proteasas y el tipo de actividad, por último, fue determinada por medio de PCR la presencia y tipo de proteasa en las cepas paterna y mutante M82.

Los datos de sobrevivencia del 1.0 % obtenidos a 4 min de exposición a la luz UV, resultaron ser más bajos al 5 y 10% obtenidos con otras cepas de *B. bassiana* (Okino *et al.*, 1978; Vasseur *et al.*, 1990; Hegedus y Khachatourians, 1994) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Hernández-Torres, *et al.*, 2004), respectivamente.

A pesar que este tipo de evento es aleatorio, el ensayo de mutagénesis reportó alrededor de 10, 000 colonias mutantes que fueron examinadas en su producción de halos de hidrólisis. Esta técnica resultó ser un buen método de selección, ya que permite un rápido examen de cantidades grandes de colonias después de la mutagénesis y así evaluar, en una forma indirecta, la producción de proteasa de una cepa en particular, además, el espectro de proteasas producidas en este medio que contiene leche descremada, es muy similar al obtenido en cultivos con cutícula de insecto (St. Leger *et al.*, 1987; 1994).

Las técnicas empleadas para llevar a cabo la mutagénesis junto con las utilizadas para seleccionar las cepas mutantes sobreproductoras de proteasas, son relativamente sencillas y con buenos porcentajes de recuperación de mutantes, esto

debido a la habilidad de la luz UV tiende a generar mutaciones puntuales en vez de daños mas grandes al DNA, tales como deleciones (Bidochka y Khachatourians, 1990; 1993).

Al comparar el aspecto morfológico de las cepas mutantes, algunas cepas, aunque presentaban un halo de hidrólisis mayor al de la paterna, el crecimiento era muy pobre, caso concreto el de las mutantes M-24 y M-82; todas las mutantes seleccionadas presentaron abundante esporulación excepto la mutante M-82, cuya esporulación fue muy pobre, la decisión de seguir trabajando con la mutante M-82, a pesar de que el crecimiento y esporulación pobre que presentó, fue debido a que esta cepa produjo uno de los mayores halos de hidrólisis, además, de que presentó un perfil de producción de proteasas muy diferente al de la cepa paterna.

Seis cepas mutantes produjeron los halos de hidrólisis mayores que el de la paterna cuando se crecieron en placas de AC y fueron estables al menos a 5 subcultivos en AC y agar YPD; las mutantes M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 y M-82 las cuales fueron sembradas en un medio inductor de proteasas, en el cual la producción de proteína fue muy similar para todas las cepas, en cuanto a la actividad enzimática, la máxima alcanzada a las 72 h en todas las cepas estudiadas, excepto en la mutante M-82, que presentó la mayor actividad enzimática a las 48 h, hecho por demás interesante y por lo cual se decidió, además del halo de hidrólisis que producía, realizar los ensayos de regulación en esta cepa.

Alguna de las cepas mutantes, mostraron un perfil de producción de proteasa diferente al de la cepa paterna. Las mutantes M-24 y M-41 presentaron el mismo perfil de producción de proteasas que la cepa paterna, pero con una actividad mayor. Las diferencias que muestran algunas de las cepas mutantes que obtuvimos, puede deberse entre otras cosas, a la desregulación de diversos genes de otro tipo de proteasas, ya que la mutación por luz UV es un evento completamente al azar.

Aunque algunas cepas mutantes presentan un numero mas elevado de proteasas, esto no significa que todas sean tóxicas contra insectos, porque aunque Kucera y Samsinakova (1968) reportaron proteasas de alto y bajo peso molecular, producidas por una cepa de *B. bassiana*, Kucera (1971) reportó que la producción de dichas proteasas esta influenciada por el tipo de fuente de nitrógeno; en todas las

cepas puede observarse una banda de actividad principal de entre 29 y 36 kDa, que corresponde a una proteasa reportada por Bidochka y Khachatourians (1987), que reportaron una sola proteasa producida por *B. bassiana* en cultivos con cutícula, con un peso molecular de 36 kDa y la cual determinaron que era tóxica contra insectos.

De acuerdo a los ensayos de actividad en soporte, las proteasas de las cepas paterna, así como también las de las cepas mutantes mostraron actividad tipo quimioproteasa y tipo elastasa. Han sido aisladas quimioelastasas de varios fluidos de cultivos de hongos, en aislados patógenos de *B. bassiana*, *V. lecanii*, *Nomuraea rileyi* y *Aschersonia aleyrodis* (St. Leger *et al.*, 1987), indicando que este tipo de enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Cabe mencionar que ninguna de las proteasas de ninguna cepa mostraron actividad tipo tripsina, ya que no hidrolizaron el sustrato BApNA, estos resultados son similares a los reportados para otras proteasas purificadas de *B. bassiana* (Bidochka y Khachatourians, 1987; St. Leger *et al.*, 1986; Urtz, 2000), en contraste con otras proteasa producidas por otros hongos entomopatógenos, como *Lagenidium giganteum* (Dean, 1983) y *M. anisopliae* (St. Leger, 1986).

Por otra parte, de acuerdo al ensayo de inhibición enzimática en soporte, el tipo de actividad en la totalidad de las proteasas producidas por las diferentes cepas, paterna y mutantes, fue inhibida al usar PMSF, indicando que hay un residuo de serina en el sitio activo, por lo que las proteasas producidas por la cepa paterna y las cepas mutantes, pertenecen a la familia de las serino proteasas. En medios con gelatina, como inductor, *B. bassiana* cepa GK 2016 produce una serino proteasa extracelular de cerca de 35 kDa (Bidochka y Khachatourians, 1987). Las serino proteasas se encuentran ampliamente distribuidas entre casi todas las especies de hongos y casi todas ellas son extracelulares, sus pesos moleculares oscilan comúnmente en el rango de 18.5 a 35.0 kDa y su pH óptimo de actividad es alcalino (Rao *et al.*, 1998).

En los ensayos de inducción-represión bioquímica, en medio inductor, ambas cepas presentaron una actividad notable, la cepa mutante 24 h antes que la cepa paterna. *M. anisopliae* y *B. bassiana* regulan la producción de sus proteasas por los niveles de acetyl-D-glucosamina en el medio mediante una acción de inducción-represión (Smith y Grula, 1983; St. Leger *et al.*, 1986). Además, la adición de nitrato

de amonio a medios que contienen glucosa y gelatina reprimen la producción de proteasas por milígramo de peso seco (Bidochka y Khachatourians, 1988). Esto sugiere que la producción de proteasas por *B. bassiana* no solo es regulada por un simple circuito de catabolismo de carbono como la glucosa. Una proteasa, que es una glicoproteína, que ha sido extensamente estudiada en *N. crassa* (Abbot y Marzuff, 1984), esta sujeta a un circuito de multirregulación, donde tres genes regulatorios independientes están reprimidos por cisteína, glutamina y algunos productos de glucosa (Hanson y Marzuff, 1975).

La presencia ya sea de glucosa, manitol, glicerol o trehalosa, con amonio en un medio conteniendo gelatina reprime la producción de la proteasa. Algunos experimentos muestran que cAMP (5 Mm) libera glucosa e induce la represión de la producción de la proteasa (Bidochka y Khachatourians, 1988) por lo tanto podemos pensar que la producción de proteasas esta sujeta a una represión por catabolito, como ocurre con el operón *lac*. Como el comportamiento en los diferentes medios (inductor y represor) tanto de la cepa mutante como de la cepa paterna fue muy similar en cuanto a la producción de enzima, se puede decir que su sistema de producción de proteasa no esta desregulado, y que la mutación no fue lo suficientemente significativa para este efecto.

Por último fue determinado el tipo de proteasa presente en las cepas, al hacer una comparación de la secuencia de aminoácidos de tres proteasas reportadas (Pr1, Bsn1 y CDEP-2. Figura 14), el análisis demostró que las secuencias son muy similares entre si, teniendo en algunas partes, algunas variaciones, mismas que no representan diferencias importantes, cabe mencionar que los residuos (D, H y S) del sitio activo están conservados en todas las proteínas analizadas, así como también los sitios de procesamiento de propéptido y péptido maduro, tres de las proteínas son mas parecidas más entre si, Bsn1, CDEP-1 y CDEP-2, Pr1 muestra algunas diferencias con estas tres sobre todo en el extremo carboxilo terminal.

La identificación de proteasas comenzó con el diseño de iniciadores basados en la secuencia nucleotídica de la proteasa Pr1, que ha sido más ampliamente reportada y estudiada (Bidochka, 1987; Bidochka y Khachatourians, 1994; St Leger, *et al.*, 1987; Joshi *et al.*, 1995). Se diseñaron dos pares de iniciadores basados en

dicha secuencia, pero con ninguno de ello fue posible amplificar el fragmento esperado.

Al no amplificar ningún fragmento con los iniciadores basados en la secuencia nucleotídica de Pr1 se diseñaron nuevos iniciadores para una secuencia de una proteasa denominada Bsn1 y reportada por Kim *et al.* (1999), estos iniciadores se localizaron en la parte inicial del gen (+6-+524 pb) y llamados AAP3 y otro par en la parte final del gen (+990-+1391 pb), AAP4. Solo con los iniciadores AAP3, fue posible amplificar un fragmento esperado de 519 pb, localizado en la parte inicial del gen, mientras que al emplear los iniciadores AAP4 no amplificó ningún producto.

Al utilizar un iniciador basado en Pr1, (AAP1, localizado en -60/-34) y otro basado en Bsn1 (AAP3r, localizado en +505/+524) fue posible amplificar un fragmento de alrededor de 600 pb, pero al utilizar cualquier otro iniciador localizado hacia el final de cualquiera de las dos secuencias reportadas, no amplificó ningún producto.

En base a estos resultados, se pensó entonces en la posibilidad de que se tratara de una proteasa diferente a Pr1 y Bsn 1 y que por lo tanto las diferencias importantes estaban localizadas en la parte final de la secuencia nucleotídica. En este punto de la investigación se buscaron nuevas secuencias reportadas para alguna proteasa diferente a Pr1 y Bsn1, descubriendo en el GeneBank una nueva secuencia reportada para una proteína degradadora de cutícula denominada CDEP-2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=124110803>) en el último trimestre del 2006. por lo que se realizó una nueva comparación tomando en cuenta esta nueva secuencia reportada por medio del programa Clustal W. El análisis de dichas secuencias dio como resultado el diseño del iniciador CGS 1, basado en la secuencia de la proteína CDEP- 2.

La localización de los iniciadores puede observarse en la figura 20, es de notarse que todos los iniciadores diseñados en las partes inicial de los genes (extremo 5'), pueden usarse arbitrariamente, ya que en esta parte, los genes que codifican las tres proteínas son exactamente iguales, mientras que todos los iniciadores diseñados hacia el final de la secuencia nucleotídica (extremo 3') no, ya que es ahí donde se

encuentran las mayores diferencias entre los genes; las secuencias de Bsn1, CDEP-2 y CDEP-1 fueron muy parecidas entre si, excepto la de Pr1, que mostró las mayores diferencias sobre todo en la parte final del gen, por dicha situación no amplificó ningún fragmento con los iniciadores diseñados en base a dicha secuencia, concluyendo entonces, que las proteasas producidas por las cepas analizadas no son del tipo Pr1 y que muy probablemente sean de la familia de las CDEP ó Bsn1, esto no lo podemos concluir, debido a que las secuencias de nucleótidos de estas tres proteínas es muy similar, además, que la comparación no fue llevada a cabo de manera completa, ya que para una de las proteínas CDEP, solamente existe reportada la secuencia de mRNA.

En años pasados muchas de las investigaciones sobre hongos entomopatógenos han sido enfocadas al mejor entendimiento del modo de acción y para determinar el rol preciso de cada una de las enzimas involucradas en el proceso de infección, en especial de proteasas y quitinasas. El desarrollo mediante mutación con luz ultravioleta de cepas de *B. bassiana* deficientes en la producción de proteasa, ha sido una herramienta importante para determinar el papel que juegan las proteasas en la patogenicidad (Bidochka y Khachatourians, 1990).

Por otro lado, es una buena herramienta para generar cepas mejoradas de hongos entomopatógenos, Vasseur (1990) usó luz UV para producir mutantes sobreproductoras de quitinasas de *Aphanocladium album*, Hernández-Torres y colaboradores (2004), obtuvo una cepa mutante sobreproductora de quitinasas de *P. fumosoroseus* mediante el uso de luz UV además de correlacionarla con la virulencia contra larvas del insecto *Bemisia tabaci*., ya que las cepas con actividad proteolítica incrementada, pueden ser consideradas buenas herramientas para el control biológico de insectos plaga, ya que como se mencionó anteriormente, las proteasas tienen un papel muy importante en los eventos de penetración de la cutícula (St. Leger *et al.*, 1987, 1995; Bidochka y Khachatourians, 1990), además que se ha demostrado que utilizando cepas sobreproductoras de proteasas, se disminuye considerablemente el tiempo de infección y muerte del insecto (St. Leger *et al.*, 1996).

## 8.0 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante la presente investigación y bajo las condiciones en que se realizó, se concluye lo siguiente:

- Se estableció un sistema de mutagénesis y detección de mutantes con mayor actividad proteolítica.
- Fueron aisladas 6 cepas mutantes (M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 y M-82), las cuales presentaron mayor actividad enzimática que la cepa paterna.
- La producción de enzimas fue similar todas las cepas, salvo que en la cepa mutante M 82, la aparición de actividad se presentó 24 h antes que en la paterna.
- Las mutantes M-7, M-36 y M-82 presentaron un perfil de producción de proteasas diferente al de la cepa paterna.
- Todas las proteasas de las cepas analizadas presentaron actividad tipo quimiotripsina y tipo elastasa.

- Ninguna de las proteasas producidas por las cepas analizadas presentó actividad tipo tripsina.
- Las proteasas producidas por las cepas paterna y mutantes pertenecen a la familia de las serino proteasas al ser inhibida su actividad por PMSF.
- El mecanismo de regulación de la proteasa de interés no fue afectado por la mutación.
- La producción de la proteasa presenta un mecanismo de regulación catabólica.
- Ninguna de las proteasas producidas por las cepas analizadas son del tipo Pr1.
- Nuestros resultados sugieren que la proteasa encontrada en la cepa paterna y en la mutante M-82 pertenece al grupo de las proteasas CDEP.



## 9.0 LITERATURA CITADA

1. Abbot, R. J. y G. A. Marzluf. 1984. Major extracellular protease of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 159:505-510.
2. Al-Aidroos, K. y Roberts, D.W. 1976. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. Can. J. Genet. Cytol. 20: 211-219.
3. Arst, H. N. y M. A. Peñalva. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 426-446.
4. Baret, A.J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods enzymol. 244:145.
5. Baret, A.J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods Enzymol. 244:145.
6. Bateman, R.P. 1992. Controlled droplet application of mycopesticides to locusts. En Lomer, C.J. y Prior, C. (Eds). Biological control of locusts and grasshoppers (pp. 249-254). CAB International. Redwood press Ltd, Melkshan. UK p 394.
7. Bateman, R.; Carey, M.; Moore, D. y Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Annals of Applied Biology. 122: 145-152.

8. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1993. Oxalic acid hyperproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to an utilizable carbon source but not to virulence. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 53-57.
9. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1679-1684.
10. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1988. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Micol.* 12:161-168.
11. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 165-173.
12. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 165-173.
13. Bidochka, M.J. 1989. Interaction of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*: a systematic study of pathogenesis. Ph. D. Thesis. University of Saskatchewan. Canada.
14. Bidochka, M.J. y Khachatourianas, G.G. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 64:26-32.
15. Blackwell, J. y Weih, M.A. 1980. Structure of chitin-protein complexes: ovipositor of the ichneumon fly *Megarthyssa*. *J. Mol.Biol.* 137: 49-60

16. Boucias, D.G. y Pendland, J. C. 1991. The cell fungal wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts, p. 303-316. En J.-P. y D. Latge G. Boucias (ed.), Fungal cell wall and immune response. Springer-Verlag KG, Heidelberg.
17. Boucias, D.G.: Pendland, J.C. y Latge, J.P. 1988. Nonspecific factors in attachment of enthomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 54:1795-1805.
18. Bradfish, G. A. y Harper, S. L. 1990. Omega-Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). Toxicon 28:1249-54.
19. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
20. Bradley, C.A.; Black, W.E.; Kearns, R. y Wood, P. 1992. Role of production technology in Mycoinsecticide development. En: Leatham, G.F. Ed. Frontiers in industrial mycology. Chapman and Hall, New York, pp 160-173.
21. Burges, H.D. 2000. Techniques for testing microbials for control of arthropod pests in greenhouses. En: "Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests" (L.A. Lacey y H.K. Kaya Eds.), 505-526. Kluwer Academic, Dordrecht.
22. Butt, T.M. y Copping, L.G. 2000. Fungal Biological control agents. Pesticide outlook. October. 186-191.
23. Caddick MX; Arst HN; Taylor LH; Johnson RI. y Brownlee AG. 1986. Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. EMBO J. 5:1087-1090.

24. Cenis, J.L., 1992: Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20:2380.
25. Charnley, A.K. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In *The biotechnology of fungi for improving plant growth*. Ed. J.M. Whipps, R.D. Lumsden. pp 85-125. London: Cambridge Univ. Press.
26. Charnley, A.K. 1992. Mechanisms of Fungal Pathogens of Pest Insects with Particular Reference to Locusts. In *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. Edited by C.J. Lomer y C. Prior CAB International, Wallingford, U.K. pp. 181-190.
27. Charnley, A.K. y St. Leger, R.J. 1991. The role of the cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In *the fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Ed. Cole, G.T.; Hoch, H.C. pp 267-286. New York: Plenum.
28. Clark, T.B.; Kellen, W.R.; Fukuda, T. y Lindegren, J.E. 1968. Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 1-7.
29. Clarkson, J.M. y Charnley, A.K. 1996. New insights into the mechanism of fungal pathogenesis in insects. *Trends. Microbiol.* 4:197-203.
30. Cox, D. y Willis, J. H. 1987. Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with two dimensional electrophoresis. *Insect Biochem.* 17: 457-468.
31. Dean D. D. y A. J. Domnas. 1983. Extracellular enzymes of the mosquito parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. *Exp. Mycol.* 7:31-39.
32. Delgado, J.H.; Britton, M.L.; Lobo-Lima y Razafindratiana, E. 1997. Field and laboratory evaluations of leading entomopathogenic fungi isolated from *Locusta*

*migratoriato* Sauss in Madagascar. Memoirs of the Entomological society of Canada. 171:323-328.

33. Dever, T.E.; Feng, L.; Wek, R. C.; Cigan, A. M.; Donahue, T.F y A.G. Hinnebusch. 1992. Phosphorylation of initiation factor 2 $\alpha$  by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GON 4 in yeast. Cell 68:585-596.
34. El-Sayed, G. N., Coudron, T. A., Ignoffo, C. M. y Riba, G. 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 54: 394-403.
35. Eyal, J.; Mabud, A.; Fischbein K.L.; Walter, J.F.; Osborne, L.S. y Landa, Z. 1994. Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 Strain Wich Produces a Red Pigment for Microbial Control. App. Biochem. Biotech. 44: pp 65-80.
36. Feng, M.G.; Popraski, T.J. y Khachatourians, G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Sci. Technol. 4: 4-34.
37. Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annu. Rev. Entomol. 23:701-714.
38. Forst, S. y D. Clarke 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. Entomopathogenic Nematology. R. Gaugler. CAB International, Wallingford. Oxon. UK., CABI Publishing: 57-78.
39. Gabriel, B. P. 1968. Histochemical study of the insect cuticle infected by *Entomophthora coronata*. J. Invertebr. Pathol. 11: 82.
40. Gielkens, M.C.C.; Dekkers, E.; Visser, J. y Graaf, L.H. 1999. Two cellobiohydrolase-D-xylose and the xylanolytic transcriptional encoding genes from

*Aspergillus niger* require activator *XlnR* for their expression. Applied Environmental Microbiology, 64:4340-4345.

41. Godfrey, T. y west, S. 1996. Industrial enzymology. 2<sup>nd</sup>. Ed. P 3. Mac Millan publishers Inc. New York. NY.
42. Goettel, M. S. y St Leger, R. J.. 1990. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. Curr. Genet. 17: 129-132.
43. Goettel, M.S. y Jaronski, S.T. 1997. Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological society of Canada. 171:83-99.
44. Goettel, M.S. y Johnson, D.L. 1992. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents. En Lomer, C.J. y Prior, C. (Eds). Biological control of locusts and grasshoppers (pp 356-361). CAB International, Redwood Press Ltd, Melkshan, UK.
45. Goettel, M.S.: St. Leger, R.J.: Rizzo, N.W.: Staples, R.C. y Roberts, D.W. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. J. Gen. Microbiol. 135: 2233-2239.
46. Griesch, J. y Vilcinskas, A. 1998. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth. *Galleria mellonella*. Biocontr. Sci. Technol. 8: 517-531.
47. Gunnarsson, S.G.S. 1988. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. J. Invertebr. Pathol. 52: 9-17.

48. Gupta, S.C.; Leathers, T.D.; El-Sayed, G.N. e Ignoffo, C.M. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 64:13-17.
49. Gupta, A.P. 1986. Hemocytic and humoral immunity in arthropods. Wiley, New York. U.S.A.
50. Gupta, S. C., Leathers, T. D., El-Sayed, G. N. e Ignoffo, C. M. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 64: 13-17.
51. Hajek, A.E. y St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.
52. Hall, R.A. 1980. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 36:216-222.
53. Hanson MA y Marzluf GA. 1975. Control of the synthesis of a single enzyme by multiple regulatory circuits in *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci. 72:1240-1244
54. Hartley, B.S. 1960. Proteolytic enzymes. Annu. Rev. Biochem. 29:45-72.
55. Hayden, T.P.; Bidochka, M.J. y Khachatourians, G.G. 1992. Entomopathogenicity of several fungi toward the English grain aphid (Homoptera:Aphididae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. J. Econ. Entomol. 85: 58-64.

56. Hegedus, D. D. y G. G. Khachatourians. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Review. *Biotechnology Advances*, 13:455-490.
57. Hegedus, D. D., T. A. Pfeifer. 1991. Cloning and analysis of five mitochondrial tRNA- encoding genes from the fungus *Beauveria bassiana*. *Gene* 109: 149-54.
58. Hepburn, H. R. 1985. Structure of the integument. En: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G.A. Kerkut y L.I. Gilbert, Eds.). 3. 1-58. Pergamon, Oxford.
59. Hernández-Crespo, P y Santiago-Alvarez, C. 1997. Entomopathogenic fungi associated with natural populations of the Moroccan locust *Docostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Gomphocerinae and other Acridoidea in Spain. *Biocontrol Science and Technology*. 7:357-363.
60. Hernández-Torres, I., Iracheta, M., Galán-Wong, L., Hernández, C., Contreras, J., Jackson, M., y Pereyra-Alfárez, B. 2004. A *Paecilomyces fumosoroseus* mutant over-producing chitinase displays enhanced virulence against *Bemisia tabaci*. *W.J. Microbiol. Biotechnol.* 20:307-310.
61. Hernández-Velazquez, V.M. y Berlanga-Padilla, A.M. 1996. Control microbiano de hongos entomopatógenos. Memoria. II Curso de actualización en control biológico. Tecmán Colima. Pp. 94-106.
62. Hüber, J. 1958. Untersuchungen zur physiologie insektentötender pilze *Beauveria bassiana*. *Arch. Microbiol.* 29: 257.
63. Humber, R.A. 1981. Collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of strains, 1992. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-110, pp 177.



64. Hung, S.Y.; Boucias, D.G. y Vey, A.J. 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. J. invertebr. Pathol. 61: 179-187.
65. Hung, S.Y.; Boucias, D.G. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworms *Spodoptera exigua*. J. invertebr. Pathol. 60: 152-158.
66. Hupmhreys, A.M.; Matewele, P.; Cunlife, B. y Trinci, A. 1990. Comparison of sporulation of *Paecilomyces farinosus* and *Beauveria bassiana* in batch and fed-batch culture. Mycological research. 94: 1046-1050.
67. Huxham, I.M.; Samuels, K.D.Z.; Heale, J.B. y Mc Corkindale, N.J. 1989b. in vivo and in vitro assays for pathogenicity of wild type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. J. invertebr. Pathol. 53: 143-151.
68. Huxham, I.M.; Lackie, A.M. y McCorkindale, M.J. 1989a. Inhibitory effects of cyclopeptides, dextruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity in insects. J. insect Physiol. 35: 97-105.
69. Ignoffo, C.M. 1979. Bioinsecticides. Chap. 1. En: Microbial Technology. Microbial Processes. Vol.1 Pipler and Perlan Ed. Academic. Press: 1-27.
70. Ignoffo, C.M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomol. 75:516-525.
71. Ignoffo, C.M.; García, C.; Kroha, M. y Couch, T.L. 1982. Use of larvae of *Trichoplusia ni* to bioassay conidia of *Beauveria bassiana*. J. Econom. Entomol. 75: 275-276.

72. Jackson, M. A. y R. J. Botahst. 1990. Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3435-3438.
73. Jarai, G., y F. Buxton. 1994. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* 26: 238-244.
74. Jeffs, L.B. y Khachatourians, G.G. 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium* y *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Can. J. Microbiol.* 43: 23-28.
75. Jenkins, N.F.; Prior, C. 1993. Growth and formulation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycology research*, 97(12):1489-1494,
76. Jenkins, N.E. y Goettel, M.S. 1997. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological society of Canada.* 171:37-48.
77. Jenkis, N.E.; Heviefo, G.; Langewald, J.; Cherry, A.J. y Lomer, C.J. 1998. Development of a mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticide. *Biocontrol News and Information* 19(1):21N-31N.
78. Joshi, L., St. Leger, R. J., Bidochka, M. J. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 125:211-218.
79. Khachatourians, G. G. 1986. Production and use of biological pest control agents. *TIBTECH*: 120-124.

80. Kim, H.K.; Hyang-Sook, H.; Dong Sang, S.; Sun Chul, K.; Churwon, H. y Suk-Tae, K. 1999. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. *Biotechnology Letters*. 21:777-785.
81. Kucera M. 1971. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture.. *J Invertebr Pathol*. 17:211–215.
82. Kucera, M., y Samsinakova, A. 1968. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Innvertebr. Pathol*. 12: 680-685.
83. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-683.
84. Leopold, J. y Samsinakova, S. 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *J. Invertebr. Pathol*. 15: 34.
85. Lomer, C.J.; Prior, C. y Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological society of Canada*. 171:265-286.
86. MacCabe, A.P., M. Orejas, J.A. Perez-Gonzalez, y D. Ramon.1998. Opposite patterns of *Aspergillus nidulans* expression of two xylanase genes with respect to ambient pH. *J. Bact*. 180: 1331-1333.
87. Magasanik, B. 1992. Regulation of nitrogen utilization. En E. W. Jones, J. R. Pringle, y J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

88. Marmaras, V.J. Chacalambidis, N.P. y Zervas, C.G. 1996. Immune response in insects: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 119-133.
89. Messias, C.L.; Daoust, R.A. y Roberts, D.W. 1986. Virulence of natural isolate, auxotrophic mutants, and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 47:231-233.
90. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
91. Milner R.J., Prior C. 1994. Susceptibility of Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*, and the wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*, to the fungi, *Metarhizium* spp. *Biological Control* 4: 132-137.
92. Miranpuri, G.S. y Khachatourians, G.G. 1991. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomol. Exp. Appl.* 59:19-27.
93. Okino, L.A.; Silva, J.C.; Santos, A.L.L.; Messias, C.L.; Azevedo, J.L.1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *O Solo.*70:32-36.
94. Old, R. W. y Primrose, S. B. 1985. Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
95. Pendland, J.C. y Boucias, D.G. 1984. Production and regeneration of protoplasts in the entomogenous hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 43:285-287.

96. Pendland, J.C.; Heat, M.A. y Boucias, D.G. 1988. Function of a galactose-binding lectin from *Spodoptera exigua* larval hemolymph: opsonization of blastospores from entomogenous hyphomycetes. *J. Invertebr. Physiol.* 34:533-540.
97. Pfeifer, T.A. y Khachatourians, G.G. 1992. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:376-381.
98. Phadarate, S.U.; Srinivasab, M.C. y Deshpande, V.V. 1992. Evidence for controlled autoproteolysis of alkaline protease: a mechanism for physiological regulation of conidial discharge in *Conidiobolus coronatus*. *Eur. J. Biochem.* 205:679-686.
99. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge y V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.
100. Rath, A.C.; Guy, P.L. y Webb, W.R. 1995. *Metarhizium* spore surface antigens are correlated with pathogenicity. *Mycol. Res.* 100:57-62.
101. Romanowski, V. 2002. Engineered baculovirus insecticides. The 35th annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Foz Do Iguassu, Brazil.
102. Samsinakova, A y Kalalova, S. 1983. The influence of a single spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. 42:156-161.
103. Samsinakova, A.; Misikova, S. y Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *J. Invertebr. Pathol.* 18, 322-330.

104. Samuels, K.D.Z.; Heale, J.B. y Llewellyn, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Niaparvata lugens*. J. Invertebr. Pathol. 53:25-31.
105. Samuels, R.I., Charnley, A.K. y Reynolds, S.E. 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Mycopathologia 104: 51-58.
106. Saul, S.J. y Sugumaran, M. 1987. Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 5:1-11.
107. Saunders, V.A. y Saunders, J.R. 1987. In vivo and in vitro mutagenesis in Microbial Genetics Applied to Biotechnology (Saunders, V.A. and Saunders, J.R., eds.) pp. 163–218, MacMillan, New York
108. Schmit AR, Ratcliffe NA. 1977. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. J Insect Physiol.23:175–184.
109. Schmith, A.R.; Rowley, A.F. y Ratcliffe, N.A. 1977. The role of *Galleria mellonella* hemocytes in melanin formation. J. Invertebr. Pathol. 29: 232-234.
110. Secades, P. y Guijarro, J.A. 1999. Characterization and purification of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Applied and Environmental Microbiology. 65:3969-3975.
111. Shah, P.A. y Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:413-423.

112. Shah, P.A.; Godonou, I.; Gbongboui, C y Lomer, C.J. 1994. Natural leaves fungal infections in grasshoppers in northern Benin. *Biocontrol Science and Technology*, 4:331-341.
113. Shimizu, S. y Hayata, C. 1990. Cryopreservation of protoplast of an entomogenous fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invertebr. Pathol.* 56:283-285.
114. Shortle D, DiMaio D. y Nathans D. 1981. Directed mutagenesis. *Annu Rev Genet.* 15:265-294.
115. Siebeneicher, S.R.; Vinson, S.B. y Kenerly, C.M. 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *J. Invertebr. Pathol.* 59:280-285.
116. Smith, R.J. y Grula, E.A. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 42:319-326.
117. Smith, R.J.; Pekar, S. y Grula, E.A. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* 38: 335-344.
118. Soderhall, K. y Smith, V.S. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition and defense system in arthropods. En: "Humoral and cellular immunity in arthropods". (P. Gupta, Ed.). pp. 251-285. Wiley, New York.
119. St Leger, R. J. y D. W. Roberts. 1991. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol* 57: 299-310.
120. St Leger, R. J., Frank, D.C.; Roberts, D.W. y Staples, R.C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading- protease structural gene

from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Eur J Biochem 204(3): 991-1001.

121. St Leger, R., Joshi, L.; Bidochka, M.J. y Roberts, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proc Natl Acad Sci USA 93:6349-6354
122. St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W. y Roberts, D. W. 1996a. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 62: 907-912.
123. St. Leger, R.J. 1991. Integument as a barrier to microbial infections. In The physiology of insect epidermis. Ed. A. Retnakaran, K. Binnington. pp. 286-308. Australia CSIRO.
124. St. Leger, R.J., Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. J. Invertebr. Pathol. 48: 85-95.
125. St. Leger, R.J., Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. J. Invertebr. Pathol. 47: 167-177.
126. St. Leger, R.J., Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 198c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. . J. Invertebr. Pathol. 47: 295-302.
127. St. Leger, R.J., Durrands, P.K., Charnley, A.K. y Cooper, R.M. 1988 Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 52: 285-293.



128. St. Leger, R.J.; Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 1987. Production of cuticle degrading enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. J. Gen. Microbiol. 133: 1371-1382.
129. St. Leger, R.J.; Nelson, J.D. y Screen, S.E. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. Microbiology. 145:2691-2699.
130. St. Leger, R.J.; Staples, R.C. y Roberts, D.W. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. J. Invertebr. Pathol. 61:81-84.
131. Tamez-Guerra, P., L. J. Galán-Wong, H. Medrano-Roldán, C. García-Gutiérrez, C. Rodríguez-Padilla, R. A. Gómez-Flores y R. S. Tamez-Guerra. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*. 4: 143-152.
132. Tanada, Y. y Kaya, H.K. 1993. Insect pathology. Academic Press. San Diego, CA, U.S.A. pp 666.
133. Urtz, B.E. y Rice, W.C. 2000. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. Mycol Res 104, 180-186.
134. Vasseur, V., Arigoni, F., Andersen, H., Defago, G., Bompeix, G. y Seng, J. M. 1990. Isolation and characterization of *Aphanocladium album* chitinase-overproducing mutants. J. Gen. Microbiol. 136: 2561-2567.
135. Veen, K. H. 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 9: 276-278.

136. Vinokurov, K. S., B. Oppert y E. N. Elpidina. 2005. An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates. *Anal. Biochem.* 337:164-166.
137. Waldschmidt, A., Salomao, y Barros, T.E. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apiadae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.* 20, no.3. ISSN 0100-8455
138. Williams, T. 2002. Development of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus as a bioinsecticide in Mexico and Central America. The 35th annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Foz Do Iguassu, Brazil.
139. Yanagita, T. 1987. Studies on oral infection of larvae of the silkworm *Bombix mori*, with *Beauveria bassiana*. *J. Sci. Jpn.* 56: 279-284
140. Yeo, H.; Pell, J.K.; Alderson, P.G.; Clark, S.J. y Pye, B.J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphids species. *Pest Manage Sci.* 59: 156-165.
141. Zacharuk, R.Y. 1981. Fungal diseases of terrestrial insects. In: Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Ed. EW Davidson. Pp: 367-402. New Jersey: Alanheld, Osmun.
142. Zhong, C. y D. J. Ellar. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J Invertebr Pathol* 76(2): 131-9.