

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CEPA MUTANTE DE *Paecilomyces fumosoroseus*
SOBREPRODUCTORA DE QUITINASAS CON MAYOR
VIRULENCIA CONTRA MOSQUITA BLANCA (*Bemisia tabaci*) Y
FALSO MEDIDOR DE LA COL (*Trichoplusia ni*)**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en
Ciencias con especialidad en Biotecnología, presenta**

M.C. ISMAEL HERNÁNDEZ TORRES

San Nicolas de Los Garza, N. L.

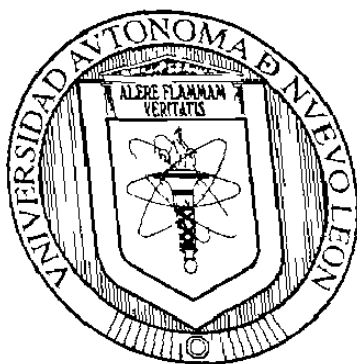
Julio de 1999

TD
SB9
.S86
H4
1999
c.1



1080124499

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CEPA MUTANTE DE *Paecilomyces fumosoroseus*
SOBREPRODUCTORA DE QUITINASAS CON MAYOR
VIRULENCIA CONTRA MOSQUITA BLANCA (*Bemisia tabaci*) Y
FALSO MEDIDOR DE LA COL (*Trichoplusia ni*)**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en
Ciencias con especialidad en Biotecnología, presenta**

M.C. ISMAEL HERNÁNDEZ TORRES

San Nicolas de Los Garza, N. L.

Julio de 1999

SB945

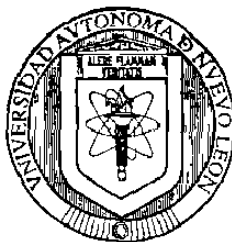
• 586

4

1



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CEPA MUTANTE DE *Paecilomyces fumosoroseus* SOBREPRODUCTORA DE
QUITINASAS CON MAYOR VIRULENCIA CONTRA MOSQUITA BLANCA
(*Bemisia tabaci*) Y FALSO MEDIDOR DE LA COL (*Trichoplusia ni*)**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en
Ciencias con especialidad en Biotecnología, presenta**

M.C. ISMAEL HERNÁNDEZ TORRES

COMISION DE TESIS APROBADA

Dr. Benito Pereyra Alférez Presidente

Dra. Lilia H. Morales Ramos Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong Vocal

Dr. Carlos E. Hernández Luna Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera Vocal

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

JULIO DE 1999

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN LA UNIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS, DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y DEL SUELO. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, U. A. N. L. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ

CONTENIDO

	PAG.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	5
OBJETIVOS	5
ANTECEDENTES	6
La mosquita blanca	6
Daños de la mosquita blanca	6
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	7
Patogenicidad de <i>P.fumosoroseus</i>	8
Proceso de penetración	9
Mecanismo de defensa del insecto	10
Taxonomía	12
Mutagénesis en hongos	13
Quitina y enzimas quitinolíticas	13
Hidrólisis de quitina	15
Regulación de enzimas quitinolíticas	15
Enzimas extracelulares y virulencia	15

MATERIALES Y METODOS	17
Cepa y conservación	17
Mutagénesis y detección de mutantes	17
Obtención de cultivo monoespora	18
Estabilidad de la cepa mutante	18
Condiciones de cultivo y caracterización de la cepa mutante	18
Inducción de la actividad quitinolítica	20
Bioensayos con ninfas de la mosquita blanca	20
Bioensayos con larvas del falso medidor de la col	21
RESULTADOS	22
Aislamiento de la cepa mutante	22
Estabilidad de la cepa mutante	22
Caracterización de la cepa mutante	22
Producción de <i>N</i> -acetilglucosamina	25
Bioensayos contra ninfas de la mosquita blanca y larvas del falso medidor de la col	27
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	35
LITERATURA REVISADA	36

DEDICATORIA

A Dios que permite y da la vida en este mundo.

A mi padre **Sr. Ismael Hernández Ramírez**, que esto llegue hasta donde te encuentres.

A mi esposa **Lic. Ma. Eugenia Chapa Arteaga**, sólo con su apoyo hemos logrado llegar hasta aquí y seguiremos adelante por toda la vida, te amo.

A mis hijos **Raúl Alejandro, Ismael y Jesús D.**, quienes sin saberlo, siempre me estimulan para ser cada día mejor.

A mi madre **Profa. Nicandra Torres Castro**, quien siempre ha sido un ejemplo de voluntad, fuerza y amor para criar y educar a sus hijos. Gracias traerme a esta vida.

A mi tío **Prof. Juventino Torres Castro** y a mi cuñado **Ing. Alejandro Medina**, por su ejemplo de tenacidad para triunfar en la vida.

A mis hermanos **Delia, Sebastian, Ursula, Teresa de Jesús, Edith, Alejandra, Victor Hugo, Omar, Fred, Maritza**, y en especial a **Aldo y Josué**, que siempre han apoyado mi superación, los quiero mucho.

Al **Sr. Raúl Chapa Soberón** y **Sra. Oscilia Arteaga**, que siempre han estado cerca de mi familia para ayudarnos y apoyarnos en todo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis J. Galán Wong, por aceptarme dentro de su Departamento y Laboratorio, además del apoyo brindado para concluir mis estudios de Doctorado en Ciencias.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, por su amistad, la orientación y apoyo para realizar la investigación en el Laboratorio a su cargo.

Al Dr. Carlos E. Hernández Luna, por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo del trabajo de investigación.

Al los integrantes del comite de aprobación de tesis: Dr. Benito Pereyra A., Dra. Lilia H. Morales R., Dr. Hugo A. Luna O., Dr. Luis J. Galán W., Dr. Carlos Hernández L., por la revision y comentarios para elevar la calidad de esta tesis.

Al Dr. José Luis Hernández Mendoza, por su asesoría para realizar los bioensayos.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, por permitir mi superación académica y apoyo económico para realizar los estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para llevar a cabo los estudios de Doctorado en Ciencias.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por recibirme nuevamente dentro de sus aulas y por la beca otorgada para concluir los estudios de Doctorado.

Al Agriculture Research Service del United States Departament of Agriculture, por el apoyo recibido por medio el proyecto No. MX-ARS-5.

A mis compañeros de Laboratorio: Luis Cástulo, Ernesto, Zacarías, Carlos Francisco, Guadalupe, Humberto, Ivett, Myriam Angelica, Claudia, Alma, Myriam Esther, Alfonso, Artemisa, Adriana, Rene y Magda por todo su apoyo, amistad y compañerismo durante mi estancia en la Facultad de C. Biológicas.

INDICE DE FIGURAS

FIG.		PAG.
1	Desarrollo del halo de hidrólisis por <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> cepas paterna Pfr 612 (izquierda) y mutante M84 (derecha), después de 14 días de crecimiento en medio de agar-quitina coloidal	23
2	Producción de biomasa y consumo de glucosa de <i>P. fumosoroseus</i> (líneas continuas y punteadas, respectivamente) creciendo en caldo YPD. Cepa paterna Pfr612, cuadros claros; cepa mutante M84, triángulos oscuros. Barras indican la desviación estandar	24
3	Producción de <i>N</i> -acetilglucosamina y consumo de glucosa de <i>P. fumosoroseus</i> (líneas continuas y punteadas, respectivamente) creciendo en caldo YPDQ. Cuadros claros, cepa paterna Pfr612; triángulos oscuros, cepa mutante M84. Barras indican la desviación estandar	26
4	Producción de <i>N</i> -acetilglucosamina de <i>P. fumosoroseus</i> creciendo en medio MMQ. Cuadros claros, cepa paterna Pfr612; triángulos oscuros, cepa mutante M84. Barras indican la desviación estandar	28

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAG.
1	Mortalidad de <i>P. fumosoroseus</i> cepas paterna Pfr 612 y mutante M84, contra ninfas de mosquita blanca (<i>B. tabaci</i>) y larvas del barrenador de la col (<i>T. ni</i>), y peso de las larvas a siete días de la aplicación. El número en paréntesis corresponde a la desviación estandar	30

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
DNA	Acido desoxirribonucleico
cm	Centímetros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
h	Hora (s)
min	Minuto (s)
seg	Segundo (s)
l	Litro (s)
ml	Mililitro (s)
µl	Microlitro (s)
Ton	Tonelada (s)
g	Gramo (s)
mg	Miligramo (s)
µmoles	Micromoles
M	Concentración molar
N	Concentración normal
%	Por ciento
pH	Potencial hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
p/v	Peso/volumen
v/v	Volumen/volumen
vs	Contra
<i>et al</i>	y otros
USDA-ARS	Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
var.	Variedad
p.e.	Por ejemplo
UVB	Luz ultravioleta de 280-320 nm de longitud de onda
UVA	Luz ultravioleta de 320-400 nm de longitud de onda

RESUMEN

La cepa Pfr612 del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* fue expuesta a la luz ultravioleta (UV) con el fin de obtener cepas mutantes con mayor actividad quitinolítica. La actividad quitinolítica de las esporas irradiadas fue detectada en medio de agar-quitina coloidal (AQ), seleccionando aquellas colonias que desarrollaron un mayor halo de hidrólisis. De 6000 colonias mutantes obtenidas, 200 fueron preseleccionadas y cultivadas en AQ, seleccionando una cepa mutante, denominada M84, que mostró el mayor halo de hidrólisis. Esta cepa mutante fue estable después de cinco cultivos sucesivos en AQ y caldo YPD (extracto de levadura, peptona y glucosa). Para evaluar la producción de biomasa y el consumo de glucosa, ambas cepas, paterna Pfr612 y mutante M84, se cultivaron en caldo YPD durante siete días, a 26 °C y tomando muestras cada 24 h. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento muy similar en ambas cepas para dichos parámetros. Sin embargo, 48 h después de que el micelio fue transferido de caldo YPD a un medio mínimo suplementado con quitina coloidal (MMQ) como única fuente de carbono y como inductor de la actividad quitinolítica, la cepa mutante M84 mostró una producción tres veces mayor de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) con respecto a la producida por la cepa paterna Pfr612. Los bioensayos contra ninfas de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) y larvas del falso medidor de la col (*Trichoplusia ni*), se realizaron aplicando una suspensión de 1×10^8 esporas/ml, la mortalidad causada por la cepa mutante M84 resultó ser 2.0 y 1.2 veces mayor que la causada por la cepa paterna Pfr612.

ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* strain Pfr612 was mutagenized by UV irradiation in order to obtain chitinase overproducing mutants. Mutants were screened on colloidal chitin agar (AQ) and selected for their ability to produce large clearing zones around the colonies. From 6,000 colonies, one mutant strain (M84), produced a larger chitin hydrolysis-halo. This mutant remained stable after 5 successive transfers to AQ and yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth. Both the parental and mutant strain were grown on YPD for 7 days at 26 °C. Glucose consumption and biomass production were measured every 24 h. Results showed no differences in growth patterns between mutant and parental strains. But when the strains were transferred to minimal medium supplemented with chitin as sole carbon source, the M84 strain showed 3-fold increase in *N*-acetylglucosamine production in comparison to the parental strain after a 120 h incubation period. Bioassays were carried out using 1×10^8 spores ml^{-1} against silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci*) nymph, and cabbage looper (*Trichoplusia ni*) larvae and the mutant M84 displayed higher virulence than parental strain in 2.0 and 1.2 fold, respectively.

INTRODUCCIÓN

La mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) es considerada una de las plagas de mayor importancia económica a nivel mundial, ya que ataca a cultivos como soya, tomate, algodón, cucurbitáceas y más de 500 especies de plantas ornamentales y malezas de climas cálidos (Osborne *et al.*, 1990). El control de esta plaga mediante la aplicación de pesticidas químicos ha sido cada vez más difícil, debido al desarrollo de resistencia, además de que pueden ser necesarias más de dos aplicaciones con la consiguiente contaminación ambiental. Una alternativa a esta problemática la representa el control biológico, dentro del cual se ha utilizado con éxito a los hongos entomopatógenos.

En los últimos años, el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*, se ha utilizado de forma eficiente como agente de control biológico (Bunnell, 1995) de la mosquita blanca (*B. tabaci*), ya que es un patógeno natural y muy agresivo contra esta (Lacey *et al.*, 1993). Sin embargo, la patogenicidad de los hongos es restringida por varios factores físicos y biológicos. Estos últimos comprenden desde la capacidad de adhesión de la espora a la cutícula, rapidez de germinación y crecimiento de la hifa, además de la capacidad para irrumpir y penetrar la cutícula del insecto mediante la acción conjunta de presión mecánica y degradación de los componentes de la cutícula, mediante la acción de enzimas secretadas por el hongo (Hayek and St. Leger. 1994).

Varias enzimas, principalmente proteasas y quitinasas, que degradan la proteína y quitina de la cutícula del insecto, han sido identificadas y caracterizadas en hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (El-Sayed *et al.*, 1989). Muchas investigaciones se han realizado con el fin de entender la función de estas enzimas durante eventos de patogenicidad, y aunque la mayoría de los estudios se han enfocado hacia la actividad de las proteasas,

existen evidencias de que las quitinasas también influyen en la patogenicidad fúngica (Brey *et al.*, 1986; El-Sayed *et al.*, 1989).

En la cutícula, la quitina constituye alrededor del 30 % (Bidochka y Khachatourians. 1992a), y se encuentra formando una barrera estructural que debe ser degradada por quitinasas extracelulares para que las hifas alcancen y se dispersen en la homocela (St. Leger *et al.*, 1986b; Hayek and St. Leger. 1994). Por lo tanto, las quitinasas tienen un papel importante en la degradación de la cutícula y penetración del insecto (St. Leger *et al.*, 1996a; Yanagita. 1980), y su actividad se ha relacionado con la virulencia del hongo (El-Sayed *et al.*, 1989; Gupta *et al.*, 1994).

Debido a la necesidad de contar con alternativas eficientes en el control biológico de la mosquita blanca, en el presente trabajo de investigación utilizamos al hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus*, que es su enemigo natural, para mejorar su patogenicidad incrementando la capacidad para hidrolizar quitina y facilitar la penetración de las hifas, lo cual causaría una muerte más rápida del insecto.

HIPOTESIS

Mediante la obtención de una cepa mutante del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* con mayor capacidad para hidrolizar quitina, será posible incrementar la virulencia contra la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*).

OBJETIVOS

GENERAL

Obtener de una cepa mutante del hongo *Paecilomyces fumosoroseus* con mayor actividad quitinolítica y evaluar su efecto sobre la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*).

PARTICULARES

- 1.- Establecer un sistema de mutagénesis en el hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, para obtener cepas con mayor actividad quitinolítica.
- 2.- Estudiar el comportamiento de la cepa mutante bajo condiciones de inducción y represión de la actividad quitinolítica.
- 3.- Comparar la relación entre los niveles de actividad quitinolítica y la virulencia de la cepa mutante y paterna.
- 4.- Evaluar la virulencia de la cepa paterna y mutante, con mayor actividad quitinolítica, contra la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), así como contra otros posibles insectos blanco, como *Trichoplusia ni*.

ANTECEDENTES

La mosquita blanca (*B. tabaci*)

La mosquita blanca se distribuye mundialmente en las regiones cálidas. La mosca adulta deposita sus huevecillos de forma ovoide-alargados, en el envés de las hojas, de los cuales emergen ninfas, que en su primer estadio caminan en la hoja en busca de un sitio adecuado para alimentarse. Los otros tres estadios permanecen fijos en un mismo lugar (Osborne y Landa, 1992) y finalmente emerge una mosca adulta. El ciclo de vida completo tiene una duración de 21 a 25 días, dependiendo de la temperatura (Gill, 1992).

Daños de la mosquita blanca

La mosquita blanca tiene un amplio rango de cultivos hospederos, como: Chile, tomate, algodón, girasol, tomate de cáscara, frijol, soya, calabaza, melón, sandía, camote, pepino, col, papaya, cítricos, guayaba y aguacate, plantas silvestres como: higuera, chaparro amargoso, malva, quelite, tabaco silvestre, tomate y tomatillo silvestre, toloache, granjeno, chayotillo, mejorana y mariquita, además de plantas de ornato como: albahaca, tulipán, crisantemo, hierbabuena, belén, ruda, lantana, rosal y bugambilia (Maya-Hernández y Garza-Urbina, 1998).

En general, la mosquita blanca causa reducción del vigor y producción de las plantas, p.e. en frijol, las pérdidas pueden alcanzar el 100 % de la producción (Ruíz, 1993). El daño es provocado por alimentación directa y por la producción de una mielecilla que sirve de sustrato para el crecimiento de mohos y hongos, los cuales reducen la capacidad de fotosíntesis y causa quemaduras de sol (Byrne *et al.*, 1990). Además, esta plaga es vector de más de 30 enfermedades virales (Yáñez, 1990), tales como virus de mosaico dorado del frijol (BGMV), virus del mosaico de la mandioca africana (ACMV), virus de amarillamiento de la lechuga (LIYV) (Byrne *et al.*, 1990), geminivirus del amarillamiento foliar de tomate (TYLCV)

(Navot *et al.*, 1992), virus del amarillamiento foliar de la calabaza (Gill. 1992), geminivirus del enchinamiento foliar de la calabaza (SLCV) (Polston *et al.*, 1990). Las pérdidas por infecciones virales transmitidas por la mosquita blanca han llegado al 100 % en cultivos de chile, tomate y melón, en Tamaulipas, San Luis Potosí y Oaxaca (Avila-Valdez. 1998; Maya-Hernández y Garza-Urbina. 1998; Ruiz *et al.*, 1998).

Paecilomyces fumosoroseus

P. fumosoroseus cuenta con una distribución mundial (Starnes *et al.*, 1993), por lo que ha sido aislado de una amplia variedad de insectos huésped, pertenecientes a los ordenes Homóptera, Coleóptera, Hemíptera, Lepidóptera, Díptera, Hymenóptera, Isóptera, Araneida (Humber. 1992; Ônions. 1979).

Además de la mosquita blanca (*B. tabaci*), algunos de los insectos infectados por *P. fumosoroseus* son: *Blepharipa zebina*, *Carposina niponensis* (Shimizu *et al.*, 1991), *Mamestra brassicae* y *Spodoptera littoralis* (Tanada y Kaya. 1993), *Diaprepes abbreviatus*, *Artipus floridanus*, *Pantomorus cervinus*, *Solenopsis invicta* (Osborne *et al.*, 1990), *Trialeurodes vaporariorum* (Ortiz-Catón y Alatorre-Rosas. 1998). Otros huéspedes de donde se ha aislado son: *Pyrrhalta luteola*, *Lagria vilosa*, *Popillia japonica*, *Calliphora* sp., *Musca domestica*, *M. autumnalis*, *adelphocoris*, *Myzus persicae*, *Nilapárвата lugens*, *Phenacoccus solani*, *Monophadnus elongatulus*, *Hyphantria cunea*, *Bombix mori*, *Plutella xylostella*, *Diaphania hyalinata* (Humber. 1992). Por el amplio rango de insectos huésped de *P. fumosoroseus*, surgen oportunidades para el control una gran variedad de plagas (Osborne *et al.*, 1990).

Patogenicidad de *P. fumosoroseus*

Por lo general los hongos entomopatógenos tienden a ser altamente virulentos contra insectos de la misma especie o alguna otra cercana de la cual fue aislado (Feng *et al.*, 1994). Muchas cepas de *P. fumosoroseus* aisladas de mosquita blanca han resultado altamente virulentas contra este mismo insecto (Lacey *et al.*, 1993), aunque se han reportado aislados de gorgojos de la harina que han sido patógenos contra mosquita blanca, ácaros de araña, trips y áfidos (Martens. 1993).

A nivel de laboratorio, existe riesgo que características como crecimiento, esporulación y virulencia de una cepa o aislado disminuya o se pierda debido a la repetición de cultivos a que se somete para su conservación y/o manejo. Sin embargo, ésta se puede recuperar reaislando la cepa después de atacar, matar y reemerger del insecto blanco (Hayden *et al.*, 1992; Feng *et al.*, 1994) ó mediante la obtención de cultivos monoespora, con lo cual una cepa puede mantenerse estable hasta por 80 subcultivos (Samsinakova y Kalalova, 1983; Hall. 1980).

En el campo, la eficiencia del control biológico con *P. fumosoroseus* depende de la dispersión, concentración del inóculo, virulencia y viabilidad de las esporas (McCoy. 1974). La dispersión puede ser ayudada por viento, lluvia y movimientos de los mismos insectos. La determinación de la concentración o tamaño mínimo del inóculo es importante para causar infección en el campo. Por lo general, existen diferencias en cuanto a la virulencia y fisiología entre cepas de una misma especie de hongo (Veen. 1967; Gupta *et al.*, 1994) y *P. fumosoroseus* no es la excepción. Estas diferencias pueden explicarse por la variabilidad genética que ocurre en forma natural (Castrillo *et al.*, 1999; St. Leger *et al.*, 1992), y a la heterocariosis fúngica (Roberts y Yendol. 1971). La viabilidad de las esporas (Inglis. *et al.*, 1999; McCoy. 1974) y el crecimiento vegetativo (Vidal *et al.*, 1997) son afectados por la temperatura, humedad relativa (Ruiz *et al.*, 1995), radiación solar

(Daoust y Pereira. 1986), en especial los rayos UVB (280-320 nm) y UVA (230-400 nm) (Fargues *et al.*, 1997), y la presencia de metabolitos secundarios, como el catecol y ácido salicílico, en la superficie de las hojas o de la cutícula del insecto (Vega *et al.*, 1997). Además, la permanencia del hongo depende de la reemergencia del huésped y producción de conidias o fragmentos de micelio que pueden infectar otros insectos.

P. fumosoroseus infecta adultos y ninfas de los cuatro estadios de la mosquita blanca (Bunnell. 1995). Una vez que la espora se adhiere a la cutícula del insecto, y bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad, germina a las 12 h, penetra la epicutícula en 12 a 18 h y alcanza la homocela en 24 h (Gunnarsson. 1988), el micelio emerge a las 24 h y logra esporular a las 72 h después del inicio de la infección (Osborne *et al.*, 1990). Los síntomas de infección pueden ser: cambio en la coloración del insecto, presencia de hifas en la homocela del insecto, crecimiento micelial entre el protórax y la cabeza y/o cubriendo total o parcialmente el cuerpo del insecto (Osborne y Landa. 1992).

Por otro lado, muchas cepas de *P. fumosoroseus* son tolerantes a pesticidas (Osborne *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1992), lo cual no es muy común en hongos entomopatógenos (Clark *et al.*, 1982), por lo que estos aislados tienen excelente potencial para ser incluidos en programas de Manejo Integrado de Plagas.

Proceso de penetración

La vía más común de penetración de los hongos entomopatógenos es por la cutícula del insecto (Ferron. 1978), aunque también lo pueden llevar a cabo por la boca (Yanagita. 1987; Miranpuri y Khachatourians. 1991; Siebeneicher *et al.*, 1992), apertura anal y orificios de respiración (Clark *et al.*, 1968). La adhesión de la espora en micropliegues de la cutícula se lleva a cabo con la ayuda de una mucosidad (polisacárido) secretada, lectinas de la superficie de la pared celular

(Rath *et al.*, 1995), interacciones hidrofóbicas entre la espora y la epicutícula del insecto (Boucias *et al.*, 1988; Jeffs y Khachatourians. 1997) y, adsorción electrostática de proteasas sobre la cutícula del insecto (Bidochka y Khachatourians. 1994). Posteriormente el tubo germinal rompe físicamente la epicutícula y una vez en la procutícula se desarrollan hifas o platos penetrantes que se extienden lateralmente causando fracturas, al mismo tiempo las hifas secretan enzimas extracelulares (Goettel *et al.*, 1989; Zacharuk. 1970), como proteasas, quitinasas, lipasas, esterasas y aminopeptidasas (St. Leger *et al.*, 1987), que degradan los componentes de la cutícula, favoreciendo la penetración. Una vez que llega a la homocela, el hongo prolifera al liberarse blastosporas de los tubos germinales septados (Pekrul y Gula. 1979). Finalmente, el insecto muere por daño mecánico, agotamiento de nutrientes y toxicosis (Hajek y St. Leger. 1994), posteriormente el hongo puede emerger y producir conidias aéreas (Aregger. 1992). Aún cuando el insecto sobreviva a la infección, este puede presentar efectos secundarios como la reducción de su potencial reproductivo (Feng *et al.*, 1994).

Mecanismo de defensa del insecto

La defensa celular y humoral que poseen los insectos contra heridas u organismos invasores consiste principalmente en reconocimiento, agregación de hemocitos, formación de nódulos, fagocitosis y melanización ó lisis de las células invasoras (Gupta. 1986; Hung *et al.*, 1993).

Los hemocitos, fenoloxidasa, quinonas y opsoninas, participan en el reconocimiento de las heridas y defensa contra organismos invasores (Gunnarsson. 1988; Pendland *et al.*, 1988; Schmit *et al.*, 1977). Cuando la cutícula del insecto sufre daño, los hemocitos comienzan a acumularse y agregarse dentro y alrededor de la herida, penetran la membrana celular cambiando la apariencia de las células (Gunnarsson. 1988). La defensa celular del insecto huésped dependerá de la capacidad de los hemocitos para encapsular las esporas del hongo (Schmit *et al.*, 1977; Huxham *et al.*, 1989b). Los granulocitos, la clase más

abundante de hemocitos, fagocitan al hongo y posteriormente los plasmotocitos forman un pseudotejido en capas concéntricas, para originar un granuloma que posteriormente es melanizado, y el hongo puede sufrir lisis (Hajek y St. Leger. 1994).

Un componente importante del sistema de defensa interna del insecto es la fenoloxidasa, que además del reconocimiento, participa en la melanización de sitios dañados en la cutícula y de células invasoras (Schmit *et al.*, 1977). Dicha enzima esta presente en los hemocitos como profenoloxidasa y en su activación en cascada intervienen componentes de la pared celular del hongo como peptidoglicano, beta-1,3-glucano, lipopolisacáridos y laminarinas (Marmaras *et al.*, 1996; Soderhall y Smith. 1986) ó activadores endógenos como serina-proteasas de las células invasoras (Saul y Sugumaran. 1987).

Sin embargo, las células micopatógenas pueden superar las defensas del insecto mediante estrategias como: tolerancia al sistema de defensa, neutralidad a hemocitos o enmascaramiento por proteínas del insecto huésped (Hung y Boucias. 1992; Hung *et al.*, 1993), y producción de metabolitos secundarios como destruxinas, bauvericinas y enanitinas que suprimen dicho sistema de defensa, disminuyendo la formación de agregados hemocíticos alrededor de las células del hongo (Huxham *et al.*, 1989a). Una vez que la infección progresa, la concentración de granulocitos se reduce y el huésped es incapaz de formar granulomas en cantidad suficiente, entonces el hongo supera la encapsulación y continúa creciendo y proliferando (Hung y Boucias. 1992)

Taxonomía

Paecilomyces fumosoroseus (Wize) Brown & Smith

División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyfomycetidae
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae

Los Deuteromycetes se caracterizan por ser asexuales, por lo que también se les conoce como hongos imperfectos. Los Hyfomicetes son la subclase más importante ya que incluye a la mayoría de las especies patógenas de insectos, estos forman micelio septado con conidióforo simple o agrupado, diferenciando a los géneros por la forma en que se originan las conidias en el conidióforo. Los miembros de *Paecilomyces* son homotáticos, multinucleados, con hifas hialinas, (Griffin. 1994), forman conidióforos terminales, ramificados y agrupados en coremios, aunque no siempre forma verticilos (Hazen *et al.*, 1970). Se encuentran en forma natural en el medio ambiente y se han identificado 31 especies, algunas de las cuales son entomopatógenicas, como *P. fumosoroseus*, *P. farinosus*, *P. amoeneroseus*, *P. javanicus*, *P. ramosus*, *P. coleopterorum*, *P. tenuipes*, *P. cicadae*, *P. lilacinus* y *P. cinnamomeus* (Tanada y Kaya. 1993).

Bemisia tabaci (Gennadius) y *B. argentifolii* (Bellows and Perring)

Clase	Insecta
Orden	Homóptera
Familia	Aleyrodidae

Se ha reconocido a *B. argentifolii* como una especie distinta de *B. tabaci*, en base a la ausencia de entrecruzamiento, polimorfismo del DNA (Perring *et al.*, 1993), análisis de isoenzimas y diferencias morfológicas (Bellows, *et al.*, 1994), mayor tolerancia al frío, ciclo de vida más corto (entre 16 y 23 días), cinco veces más prolífica (Gill. 1992), y tiene un rango más amplio de plantas hospederas.

Trichoplusia ni (Hubner)

Clase	Insecta
Orden	Lepidóptera
Familia	Noctuidae

Mutagénesis en hongos

En hongos entomopatógenos se ha utilizado a la mutagénesis como un medio para definir los factores que afectan la patogenicidad (Al-Aidroos y Roberts. 1976; Smith y Grula. 1983; El-Sayed *et al.*, 1989). El mutágeno más frecuentemente utilizado en hongos es la luz ultravioleta (UV), la cual causa mutaciones puntuales, aunque también se han empleado otros agentes como el etano-metano-sulfonato (St. Leger *et al.*, 1993). También, la modificación genética en hongos puede realizarse mediante el aislamiento, fusión y transformación y regeneración de protoplastos (Pendland y Boucias. 1984; Messias *et al.*, 1986; Shimizu y Hayata. 1990; Pfeifer y Khachatourians. 1992).

Quitina y enzimas quitinolíticas

La quitina, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, tan sólo en el medio acuático se producen anualmente 10^{11} ton métricas (Tsujiro *et al.*, 1998), es componente estructural del exosqueleto de artrópodos, crustáceos, y pared celular de levaduras y hongos (Flach *et al.*, 1991), se ha encontrado en

nemátodos, protozoarios, diatomeas (Trudel y Asselin. 1989), en la cutícula y membrana peritrófica del intestino de insectos (Richards y Richards. 1977). Es un polímero lineal formado de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) unidos por enlaces $\beta(1,4)$ y es altamente resistente a solventes orgánicos (Nuero. 1995).

Las isoenzimas quitinasas, encargadas de degradar la quitina, son producidas por una amplia variedad de organismos, incluyendo hongos, virus, crustáceos y algas (Morimoto *et al.*, 1997) y aún en aquellos que no poseen quitina, como bacterias, plantas y animales (Shen y Jacobs-Lorena. 1997). Estas enzimas cumplen varias funciones, p.e. en hongos, las quitinasas participan en la regulación del crecimiento, degradan la quitina de la pared celular durante la separación y origen de una célula hija (de Siqueira *et al.*, 1997; Flach *et al.*, 1991; Kuranda y Robbins. 1991), y en la obtención de nutrientes a partir de quitina. Las bacterias, plantas y animales producen quitinasas como parte de su sistema de defensa contra patógenos y plagas, lo cual es un ejemplo que resalta la significancia de las quitinasas en interacciones ecológicas entre organismos (Jones *et al.*, 1986; Brurberg *et al.*, 1994; Boller. 1987; Flach *et al.*, 1991). También juegan un importante papel ecológico al reciclar la quitina y liberar carbón y nitrógeno (Cohen-Kupiec y Chet. 1998).

Por otro lado, las enzimas quitinasas son utilizadas artificialmente con varios propósitos: p.e. en el control biológico de hongos fitopatógenos, degradación de desechos de crustáceos, modificación química de quitina y quitosan (Young *et al.*, 1985; Tronsno y Harman. 1993), y se han empleado para incrementar la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* (Sampson y Gooday. 1998; Kramer y Muthukrishnan. 1997; Rege *et al.*, 1996; Wiwat *et al.*, 1996).

Hidrólisis de quitina

El proceso de degradación de la quitina ocurre principalmente en dos pasos, primero una endoquitinasa (EC 3.2.1.14: quitinasa ó poli-(1,4- β -(2-acetamida-2-desoxi-D-glucosido) glicanohidrolasa) realiza la hidrólisis del polímero β -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina, liberando oligómeros de longitud variable, posteriormente actúan las exoquitinasas: a). quitobiosidasa que liberan dímeros de NAG quitobiosa, y b). quitobiasa (EC 3.2.1.30; EC 3.2.1.52) ó *N*-acetil- β -glucosaminidasa ó 2-acetamida-2-desoxi- β -D-glucosido, acetamidodesoxiglucohidrolasa, que libera monómeros de NAG, del extremo no reductor de los dímeros u oligómeros. Esas enzimas se expresan casi simultáneamente bajo patrones similares, indicando que están bajo un control regulatorio común y actúan sinérgicamente (El-Sayed *et al.*, 1989; St. Leger *et al.*, 1986b).

Regulación de enzimas quitinolíticas

La síntesis de enzimas quitinolíticas, y posiblemente de algunas proteasas, está regulada a través de un mecanismo inductor-represor (St. Leger *et al.*, 1993; Bidochka y Khachatourians. 1988). Los principales sustratos que inducen la síntesis de quitinasas son la quitina, quitosan y glicol quitina (de Siqueira *et al.*, 1997; St. Leger *et al.*, 1986a), pero cuando el medio de cultivo no contiene sustrato inductor, la síntesis se mantiene en niveles basales. Por otro lado, la adición o presencia de carbohidratos, lípidos o proteínas (Bidochka y Khachatourians. 1992b; St. Leger *et al.*, 1986a) y alta concentración de NAG en el medio de cultivo, reprimen la producción de quitinasas (Havukkala *et al.*, 1993).

Enzimas extracelulares y virulencia

Las proteasas secretadas (más de 100; Cox y Willis. 1987), durante las primeras etapas de la penetración (Bidochka y Khachatourians. 1990), son

consideradas como el factor de virulencia más importante debido a que la proteína es el constituyente más abundante de la cutícula (61-70 %) (Hepburn. 1985; Bidochka. 1989), además de que se encuentra rodeando las microfibrillas de quitina (Blackwell y Weih. 1980).

Sin embargo, las enzimas quitinolíticas también son importantes, ya que al quedar descubiertas las fibrillas de quitina, se induce la síntesis de quitinasas y ocurre degradación de la quitina (St. Leger *et al.*, 1996a; Bidochka y Khachatourians. 1988), facilitando aún más el proceso de infección (Coudron *et al.*, 1984). Por lo que la actividad quitinolítica si esta correlacionada con la virulencia (El-Sayed *et al.*, 1993; Chamley y St. Leger. 1991), tal como se ha demostrado en *Nomuraea rileyi* (El-Sayed *et al.*, 1989), *Verticillium lecanii* (Jackson *et al.*, 1989) y *Aspergillus flavus-orizae* (Yanagita. 1980).

MATERIALES Y METODOS

Cepa y conservación

En el presente estudio *P. fumosoroseus* Pfr 612 fungió como cepa paterna, la cual fue aislada de la mosquita blanca (*B. argentifolii*) en Weslaco, Tex., y proporcionada por el USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungi, con sede en Peoria, Ill. Esta cepa fue cultivada y conservada en medio YPD (extracto de levadura 0.3 %; peptona 1.0 %; glucosa 2.0 % y agar-agar 2.0%) y en medio YPD con aceite mineral, almacenándose a 4 °C hasta su uso.

Mutagénesis y detección de mutantes

Previo a la mutagénesis, se determinó el tiempo de exposición y la distancia de una lámpara marca UVP, modelo UVG, longitud de onda de 254 nm. A partir de un cultivo de 15 días de edad, se prepararon 10 ml de una suspensión 1×10^7 esporas/ml, la cual fue expuesta a la luz UV. Posteriormente, las esporas irradiadas fueron cultivadas en medio de agar-agar adicionado con quitina coloidal (AQ) e incubadas durante siete días a 26 °C. Separando aquellas colonias que mostraron un mayor halo de hidrólisis y cultivandolas de forma sucesiva y alternada en YPD-AQ.

La preparación de la quitina coloidal fue de acuerdo a la metodología descrita por Vasseur *et al.*, (1990), que consiste en tratar 30 g de quitina de crustáceo en hojuelas con 250 ml de HCl 10 N, durante 4 h a temperatura ambiente, seguido de dos enjuagues en 4 l de agua bidestilada y siete posteriores enjuagues en 1 l de agua cada uno, para elevar el pH lo más posible y posteriormente neutralizar con una solución de NaOH 2 M. La quitina y el agua se separaron mediante centrifugación a 9,000 rpm, durante 15 min. La quitina coloidal se almacenó a 4 °C y antes de usarla, fue fraccionada a máxima velocidad con licuadora durante 15 seg, para tratar de uniformizar el tamaño de las partículas,

posteriormente se esterilizó, enjuagó y centrifugó de manera independiente antes de mezclarla con el medio de cultivo. En todos los medios suplementados con quitina coloidal, se agregó al 1 % (p/v).

Obtención de cultivo monoespóra

La obtención de cultivos monoespóra a partir de la cepa paterna y de la cepa mutante, se realizó, con algunas modificaciones a la metodología desarrollada por Veen (1967), de la siguiente manera: En puntos previamente marcados en el exterior de la caja Petri conteniendo agar YPD se depositaron 2 μ l de una suspensión de 1×10^4 esporas/ml. Posteriormente se revisó la cantidad de esporas por punto y su germinación a las 12 h, bajo microscopio de contraste de fases (10 X), remarcando aquellos puntos con una sola espóra. Las fracciones de agar YPD junto con la espóra germinada, fueron obtenidas con la ayuda de una micropipeta con puntilla (1 ml) recortada y esteril, utilizada a manera de "sacabocados", y colocadas en diferentes cajas Petri con el mismo medio de cultivo, para su crecimiento a 26 °C.

Estabilidad de la cepa mutante

Para probar la estabilidad de la cepa mutante, esta fue cultivada en forma sucesiva y alternada durante diez subcultivos en agar YPD - AQ y en caldo YPD - AQ. Al final, se verificó el desarrollo de halo en AQ.

Condiciones de cultivo y caracterización de la cepa mutante

Para determinar la producción de biomasa, consumo de glucosa y producción de NAG, las cepas paterna y mutante fueron cultivadas en caldo YPD y caldo YPD suplementado con quitina coloidal (YPDQ). Cada matraz de 250 ml conteniendo 100 ml de medio, fue inoculado con 1×10^7 esporas de cada cepa, e incubados en agitación a 150 rpm y 27 °C, hasta la fase logarítmica de crecimiento

(72 h). A partir de este momento, se tomaron muestras de 5 ml cada 24 h, dando por terminado el cultivo a las 168 h.

Los sobrenadantes y el micelio fueron separados por filtración, con filtro Whatman No. 2. La biomasa fue estimada por medio del peso seco del micelio, sometiendo la muestra a secado a 80 °C, durante 24 h y pesado de la muestra en una balanza analítica.

La concentración de glucosa se estimó en los sobrenadantes utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores (Miller.1959), que consiste en: Preparación del reactivo: Solución a). Diluir en 250 ml de agua bidestilada, 150 g de tartrato de sodio y potasio, y solución b). Preparar 100 ml de una solución 2 N de NaOH, adicionar 5 g de DNS y diluir mediante calor. Finalmente se mezclan las soluciones a y b, y aforar a 500 ml. A 1 ml de este reactivo la muestra se le agrega 1 ml de la muestra, seguido de un baño maría durante 5 min y enfriar en hielo. Adicionar 2 ml de agua bidestilada fría, agitar con vortex y leer en espectrofotómetro a 540 nm. Las lecturas de absorbancia se transforman mediante una curva estándar.

Cuando las cepas crecieron en YPDQ, el peso seco no pudo ser evaluado debido a la adsorción de la quitina al micelio. En cambio, en los sobrenadantes de este medio fue posible evaluar la producción de NAG, por el método de Reissing *et al.* (1955), con los siguientes reactivos: Solución de tetraborato de sodio 0.8 M, pH 9.2; disolver 10 g de *p*-dimetilaminobenzaldeido (DMAB) en 100 ml de ácido acético glacial, el cual contiene 12.5 % de HCl 10 N; y *N*-acetilglucosamina. El procedimiento es: a 0.5 ml de muestra, adicionar 0.1 ml de tetraborato de sodio, calentar en baño maría durante 3 min y enfriar en agua corriente; adicionar 3 ml del reactivo DMAB, mezclar e incubar en agua a 37 °C durante 20 min y enfriar en agua corriente; tomar lecturas en espectrofotómetro a

585 nm. Las lecturas de absorbancia se transforman mediante una curva estándar.

Inducción de la actividad quitinolítica

Para la inducción de la síntesis de las enzimas quitinasas, el cultivo de la cepa paterna y mutante se inició en caldo YPD durante 72 h, posteriormente el micelio se separó por centrifugación a 9000 rpm, durante 20 min y enjuagó dos veces con agua esteril bidestilada. Finalmente, el micelio fue transferido a 100 ml de medio mínimo de sales suplementado con quitina coloidal (MMQ). El MMQ estuvo compuesto de: KH_2PO_4 4 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l y 20 ml/l de cada solución: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.66 g/l; MnSO_4 1.56 g/l y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 g/l y quitina coloidal, como única fuente de carbono. El pH del medio MMQ fue ajustado a 5.6 antes de esterilizarlo. La quitina fue esterilizada, enjuagada y centrifugada (9,000 rpm, durante 15 min) antes de mezclarla con el MMQ. Las muestras de 5 ml cada una, fueron tomadas cada 24 h, a partir del cambio del medio, dando por terminado el cultivo a las 168 h. Estas muestras se filtraron a través de filtro Whatman No. 2, filtro de nylon de 0.45 y 0.22 μm . Por último, los sobrenadantes se almacenaron a -20°C , hasta su análisis.

Bioensayos con ninfas de la mosquita blanca

La virulencia de las cepas paterna Pfr612 y la mutante M84 fue probada contra ninfas de la mosquita blanca (*B. tabaci*) de tercer estadio, las cuales proceden de una cría de laboratorio mantenida en cámara bioclimática entre 25 y 29 $^\circ\text{C}$, humedad relativa mayor de 65 %, creciendo en el envés de hojas de frijol var. peruano. Cada hoja fue asperjada o tratada por inundación, con una suspensión de 1×10^8 esporas/ml. Las esporas se obtuvieron de cultivos de 15 días de edad, creciendo sobre agar YPD. Las conidias aéreas se suspendieron en una solución de Tween-20 al 0.5 % (v/v) y se contaron con la ayuda de un

hemacitómetro. Las plantas con las hojas tratadas se incubaron en una cámara bioclimática a 27 °C y 95 % de humedad relativa, durante 24 h, posteriormente las hojas se cortaron y colocaron en cajas de Petri con papel filtro húmedo. El conteo de las ninfas muertas se realizó siete días después de la aplicación.

Bioensayos con larvas del falso medidor de la col

Los bioensayos se realizaron con larvas neonatas de *T. ni*, criadas bajo condiciones de laboratorio y mantenidas en copas individuales con una dieta artificial a 28 °C, sobre la cual se aplicaron y extendieron 200 µl de la suspensión de esporas (1×10^8 esporas/ml). En el grupo control se aplicó agua bidestilada. La mortalidad se registró a partir del tercer día y hasta el inicio del estado de pupa. Las larvas vivas fueron pesadas al séptimo día. Las larvas muertas se colocaron en cajas de Petri con papel filtro húmedo. Cada experimento constó de tres repeticiones, con 25 a 30 larvas cada una, y fue realizado por duplicado.

RESULTADOS

Aislamiento de la cepa mutante

Colocando la lámpara a 10 cm de la suspensión de esporas, el mejor tiempo con el cual se obtuvo menos del 3 % de sobrevivencia fue de 6 min.

Después de la exposición a luz UV, se obtuvieron aproximadamente 6,000 colonias mutantes, y su crecimiento y desarrollo del halo de hidrólisis de quitina fue observado en medio AQ. De estas, se seleccionaron 200 colonias por el tamaño del halo formado. Estas colonias o cepas fueron cultivadas por separado en AQ, al mismo tiempo que se observó el desarrollo del halo, y cinco subcultivos después, fue seleccionada la cepa número 84 por su mayor diámetro del halo de hidrólisis, y a la cual denominamos cepa mutante M84. Al comparar la formación del halo entre la cepa paterna Pfr612 y la mutante M84, se observó que a los 14 días, la cepa mutante M84 desarrolló un halo de 32 vs. 22 mm de diámetro del halo de la cepa paterna (Fig. 1).

Estabilidad de la cepa mutante

La estabilidad de la cepa mutante fue probada mediante cultivos sucesivos en agar YPD - AQ y en caldo YPD - AQ. Al final de diez subcultivos y después de 14 días de cultivo en AQ, la cepa M84 fue capaz de desarrollar un halo de hidrólisis de 32 mm de diámetro, al igual que cuando fue seleccionada.

Caracterización de la cepa mutante

En caldo YPD la cepa paterna Pfr612 y la mutante M84, mostraron similar crecimiento del micelio, con diferencias no significativas en peso seco, siendo estas menores a 25 mg/100 ml (Fig. 2), solo al final del cultivo, en las muestras

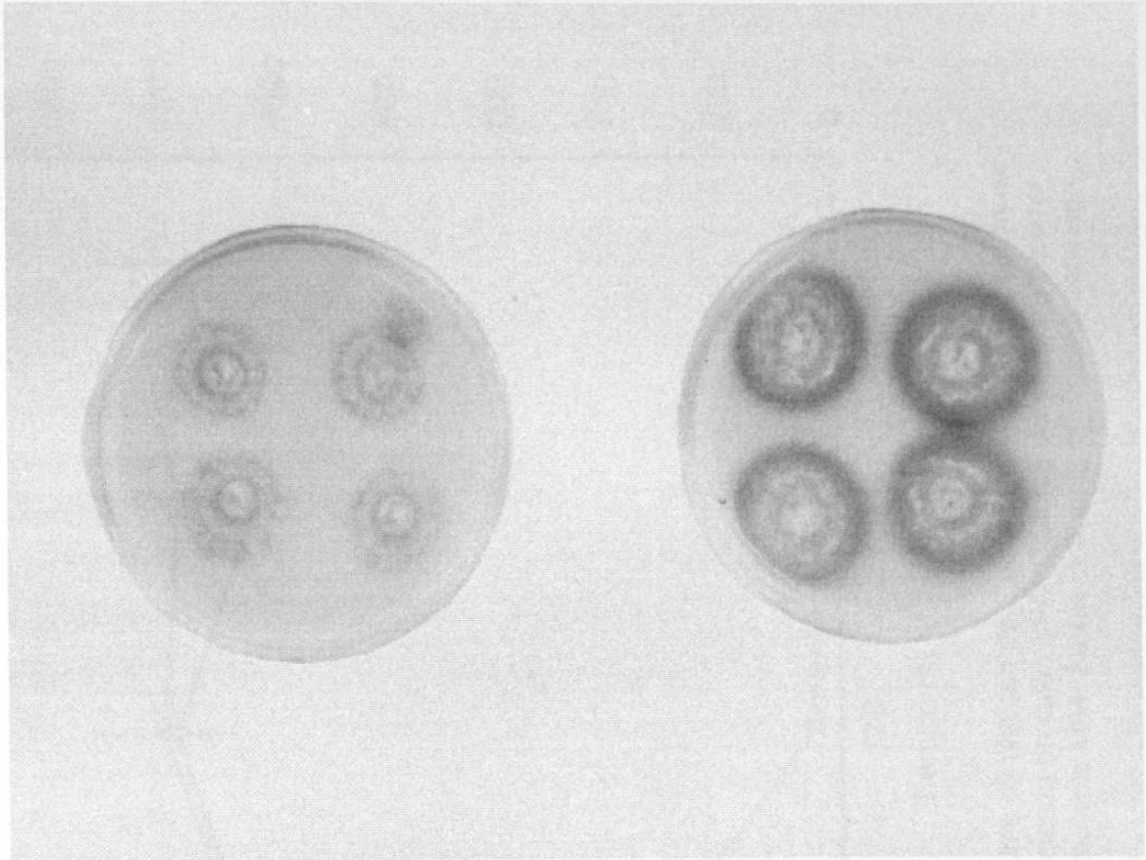


Figura 1. Desarrollo del halo de hidrólisis por *Paecilomyces fumosoroseus* cepas paterna Pfr 612 (izquierda) y mutante M84 (derecha), después de 14 días de crecimiento en medio de agar-quitina coloidal.

correspondientes a 144 y 168 h, la producción de biomasa de la cepa paterna fue menor al de la cepa mutante en 137.2 y 96.7 mg/100 ml, respectivamente.

En ambas cepas el consumo de glucosa en caldo YPD fue muy similar. La glucosa del medio fue prácticamente agotada a las 120 h, manteniendo baja su concentración (45 mg/100 ml) hasta el final del cultivo. Cuando la glucosa fue casi agotada (120 h), la producción de biomasa alcanzó su máximo nivel, 1210.0 y 1186.7 mg/100 ml en las cepas mutante M84 y paterna Pfr612, respectivamente, posteriormente el incremento de la biomasa fue mínimo.

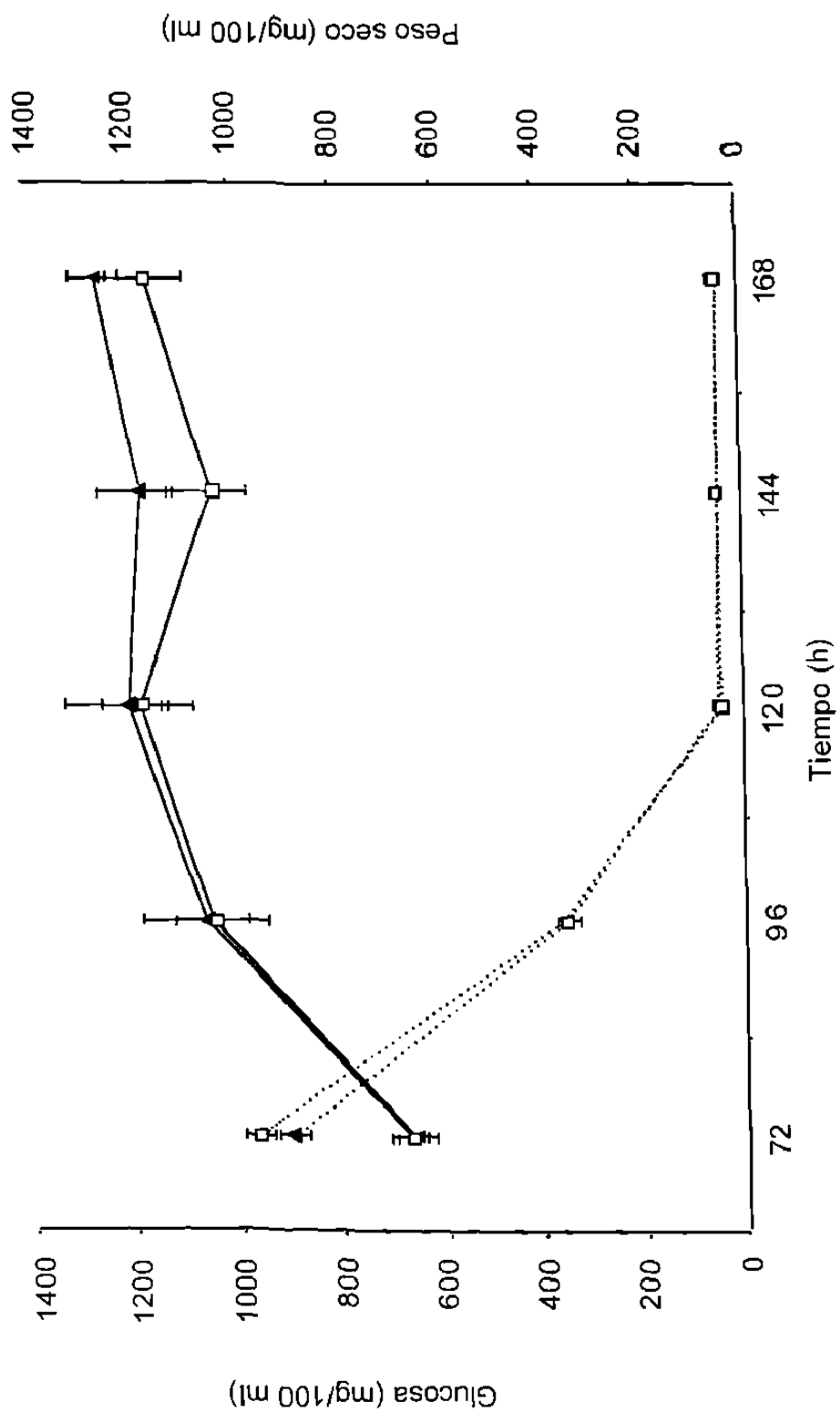


Figura 2. Producción de biomasa y consumo de glucosa de *P. fumosoroseus* (líneas continuas y punteadas, respectivamente) creciendo en caldo YPD. Cuadros claros, cepa paterna Pfr612; triángulos oscuros, cepa mutante M84. Barras indican la desviación estándar.

En caldo YPDQ, el consumo de glucosa en las cepas paterna Pfr612 y mutante M84 fue muy similar (Fig. 3), siguiendo una pendiente parecida a la ocurrida en caldo YPD. La concentración de glucosa en el medio llegó a un nivel muy bajo a las 120 h para ambas cepas, sin embargo, esta concentración de glucosa fue mayor en 85.2 y 43.7 mg/100 ml para las cepas paterna Pfr612 y mutante M84, respectivamente, con respecto al observado en caldo YPD. En las últimas muestras tomadas (144 y 168 h), la concentración de glucosa de la cepa mutante M84 se incrementó debido a la presencia de azúcares reductores liberados durante la hidrólisis de quitina.

Producción de N-acetilglucosamina

La producción de NAG fue registrada durante el cultivo de las cepas paterna Pfr612 y mutante M84, en caldo YPDQ y MMQ. En caldo YPD no fue posible detectar NAG debido a la ausencia de quitina coloidal en el medio. En el presente estudio, se infiere que la producción de NAG estima la actividad quitinolítica de las enzimas quitinasas de cada cepa, sin considerar la NAG utilizada en la nutrición del hongo.

En caldo YPDQ (Fig. 3) y a 72 h de cultivo, cuando la concentración de glucosa en el medio aún se mantenía alta, la producción de NAG fue detectada en niveles mínimos (62.0 y 63.6 μ moles para la cepa paterna y mutante, respectivamente), y a medida que disminuyeron los niveles de glucosa, la liberación de NAG fue en incremento, al final del cultivo se registraron los mayores niveles de NAG en el medio para ambas cepas (299.4 y 342.3 μ moles para las cepas paterna y mutante, respectivamente).

En el medio mínimo de sales basales se utilizó quitina coloidal como inductor de la actividad quitinolítica y como única fuente de nutrientes, principalmente carbono, para el crecimiento del micelio. En este medio, la

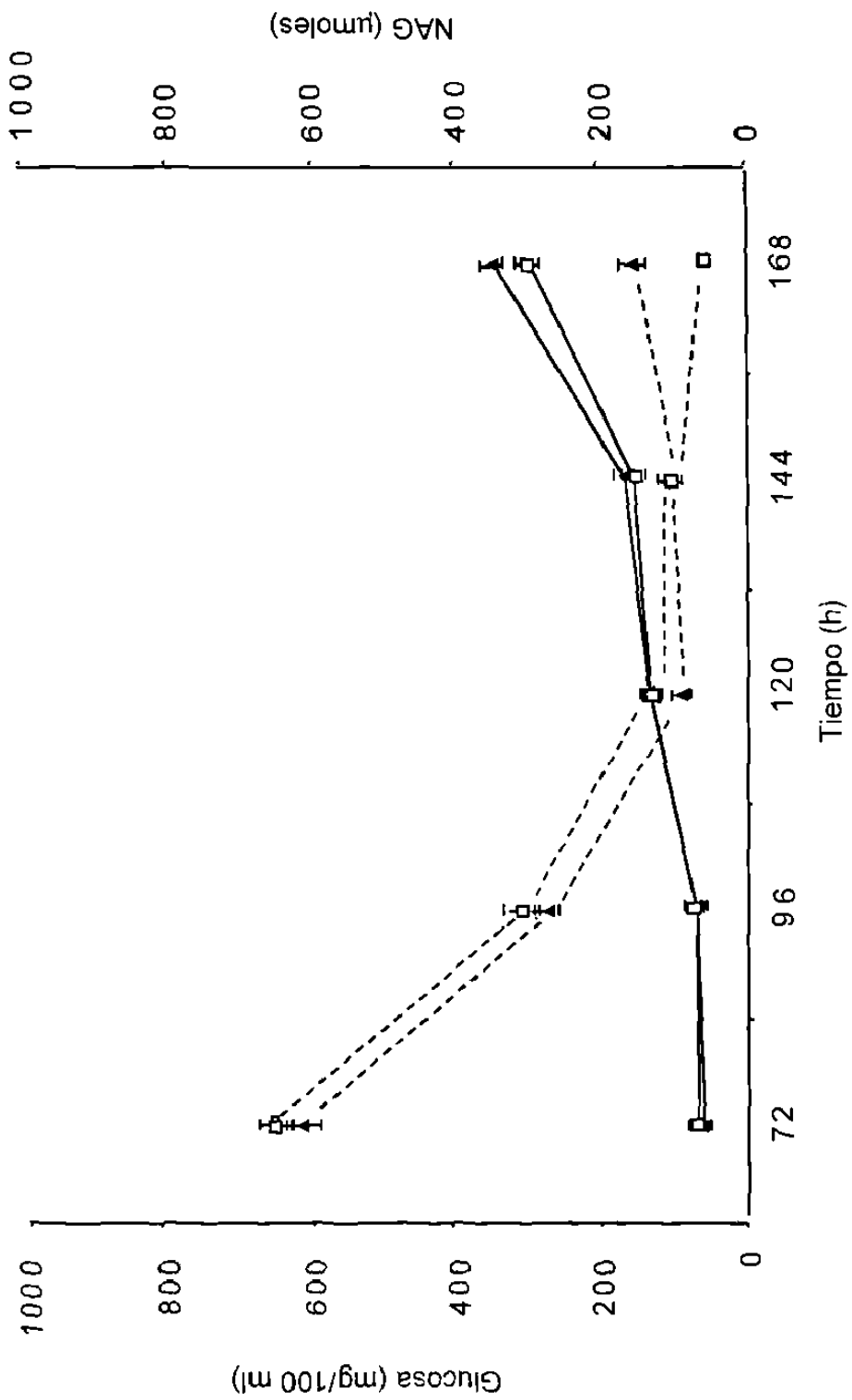


Figura 3. Producción de M-acetilglucosamina y consumo de glucosa de *P. fumosoroseus* (líneas continuas y punteadas, respectivamente) creciendo en caldo YPDQ. Cuadros claros, paterna Pfr612; triángulos oscuros, cepa mutante M84. Barras indican la desviación estándar.

respuesta de la cepa mutante M84 fue muy notoria y la NAG fue detectada fácilmente (Fig. 4). La cepa mutante M84 incrementó rápidamente la producción de NAG hasta alcanzar su máximo nivel 48 h después del cambio de medio. En este momento (120 h) y bajo las mismas condiciones de cultivo, la producción de NAG de la cepa mutante M84 fue tres veces mayor al de la cepa paterna Pfr612 (676.1 vs 229.9 μ moles, respectivamente). Posteriormente y hasta el final del cultivo, el nivel de NAG disminuyó en ambas cepas, a pesar de esto, el nivel de NAG de la cepa mutante M84 fue mayor en 350.1 μ moles al de la cepa paterna Pfr612, la cual ya había llegado a su mínimo nivel a las 144 h de cultivo.

Bioensayos contra ninfas de la mosquita blanca y larvas del falso medidor de la col

Los bioensayos realizados a nivel de laboratorio contra ninfas de tercer estadio de la mosquita blanca (Cuadro 1) indican que ambas cepas fueron capaces de infectar y matar ninfas de la mosquita blanca, sin embargo, la cepa mutante M84 fue dos veces más virulenta que la cepa paterna Pfr612 (41.0 vs 22.3 % de mortalidad, respectivamente).

Cuando las conidias se aplicaron a larvas del falso medidor de la col (*T. ni*), ambas cepas infectaron las larvas, registrando una mortalidad mayor que la causada a ninfas de la mosquita blanca, sin embargo, la cepa mutante M84 solamente fue 1.2 veces más virulenta que la cepa paterna Pfr612 (60.5 vs 51.2 % de mortalidad, respectivamente).

Dentro de los grupos control, murió un pequeño porcentaje de ninfas de la mosquita blanca y de larvas del falso medidor de la col (5.6 y 4.2 % de mortalidad respectivamente), sin embargo, estas muertes no fueron causadas por infecciones de alguna de las cepas utilizadas en los bioensayos, ya que en

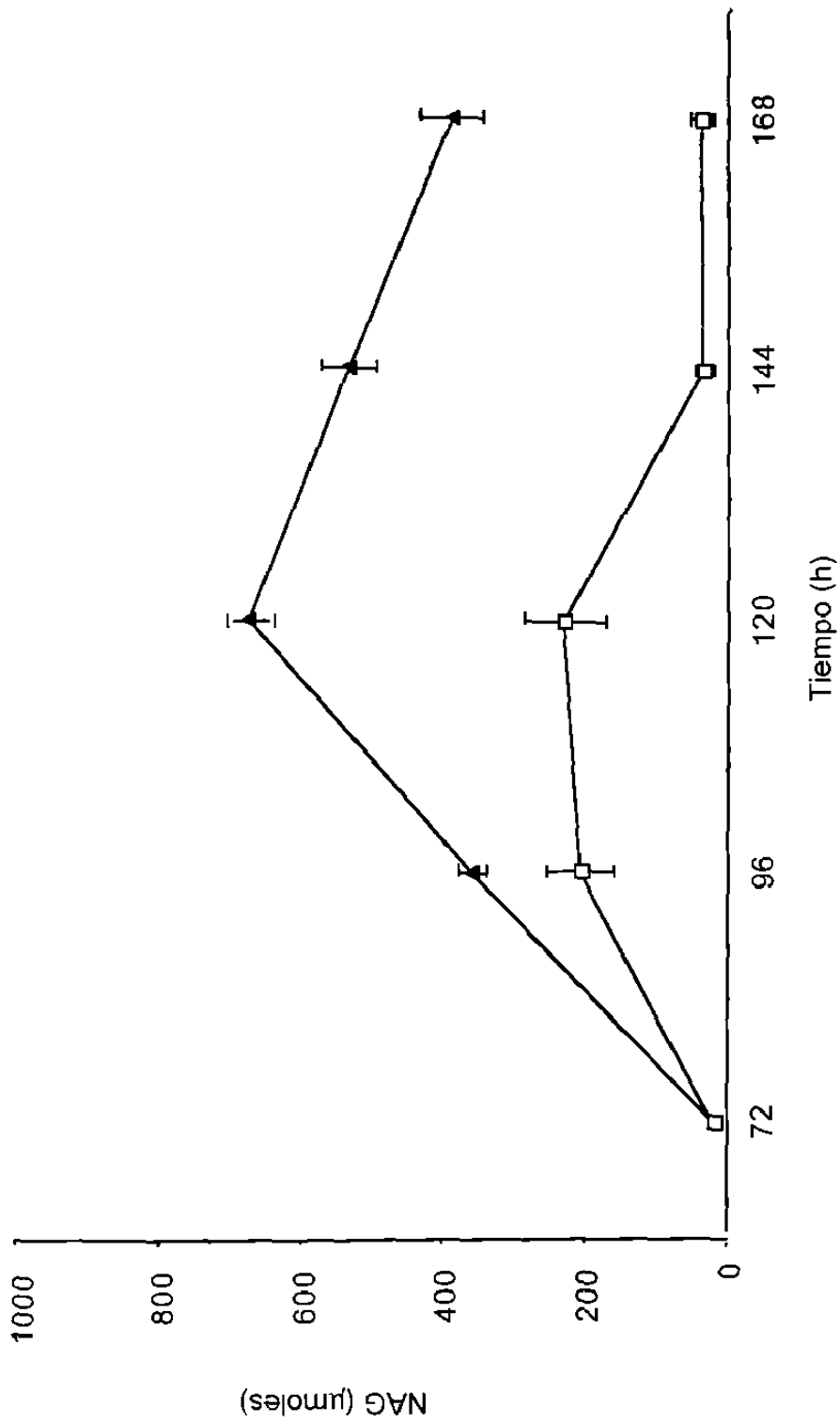


Figura 4. Producción de N-acetil glucosamina de *P. fumosoroseus* creciendo en medio MMQ. Cuadros claros, cepa paterna Pfr 612; triángulos oscuros, cepa mutante M84. Barras indican la desviación estándar.

el caso de las ninfas de mosquita blanca no se observó reemergencia del hongo y en el falso medidor de la col, las larvas no presentaron la coloración oscura de las larvas tratadas.

Al registrar el peso de las larvas, que hasta el séptimo día habían sobrevivido al ataque del hongo, se observa que en promedio, aquellas larvas tratadas con conidias de la cepa mutante M84 alcanzaron solamente la mitad del peso registrado para las larvas tratadas con la cepa paterna Pfr612, y estas a su vez, alcanzaron la mitad del peso de las larvas del grupo control (9.4, 18.1 y 35.2 mg de peso vivo, respectivamente).

Sin embargo, considerando los pesos de las larvas tratadas, se puede inferir que las conidias e hifas de la cepa mutante M84 posiblemente, tuvieron mayor o más rápida infección e invasión de órganos vitales del insecto, de manera tal que causaron una mayor respuesta del sistema de defensa del insecto (hemocitos, fenoloxidasa, y melanización), es decir, que los efectos tóxicos de la cepa mutante M84 causaron rápido cesamiento del consumo de alimento provocando mayor mortalidad. Todas las larvas tratadas y posterior a su muerte, presentaron el cuerpo de color negro y no presentaron reemergencia del hongo.

Tabla 1. Mortalidad de *P. fumosoroseus* cepas paterna Pfr 612 y mutante M84, contra ninfas de mosquitos blancos (*B. tabaci*) y larvas del falso medidor de la col (*T. ni*).

Cepa	Larvas del falso medidor de la col		Mortalidad (%)	
	No.	Peso (mg)	Mosquito blanco	Barrenador de la col
Control	44	35.2 (12.21)	5.64 (3.35)	4.21 (2.94)
Pfr612	48	18.1 (15.42)	22.28 (15.36)	51.20 (11.44)
M84	44	9.4 (5.39)	41.00 (11.62)	60.53 (12.79)

El número en parentesis corresponde a la desviación estandar.

DISCUSION

En el presente trabajo de investigación se expuso al hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus* cepa Pfr612, a la luz UV obteniendo colonias mutantes, de las cuales se seleccionó una cepa mutante con mayor actividad quitinolítica respecto a la cepa paterna. Para su caracterización y estudio del sistema de regulación de la actividad quitinolítica, la cepa mutante M84 se cultivó en distintos medios, bajo condiciones de inducción y represión. Finalmente, se probó la virulencia de la cepas paterna Pfr612 y mutante M84 contra ninfas de la mosquita blanca y larvas del falso medidor de la col.

Con 6 min de exposición a la luz UV fue tiempo suficiente para obtener menos del 3 % de sobrevivencia, es decir, causar mutaciones sin eliminar el total de esporas expuestas y seleccionar la cepa mutante M84. A pesar de que la mutagénesis es un evento aleatorio, la técnica empleada en la presente investigación fue más eficiente a la utilizada por Vasseur *et al.* (1990) de acuerdo a la cantidad de colonias mutantes observadas (6,0000 vs 10,000 colonias, respectivamente) para seleccionar una cepa con elevada actividad quitinolítica.

Las técnicas empleadas para la mutagénesis y detección de las cepas mutantes sobreproductoras de quitinasas y el procedimiento, relativamente sencillo para obtener cultivos monoespora en *P. fumosoroseus*, es factible de aplicarlas con propósitos similares, a otros hongos entomopatógenos.

Al comparar el aspecto morfológico y crecimiento sobre agar y caldo YPD de las cepas paterna Pfr612 y mutante M84, se observó que: a). La producción de conidias y el desarrollo aéreo del micelio en agar YPD fue cualitativamente igual para ambas cepas; b). La germinación de las conidias aéreas fue igual en ambas cepas (90 % de germinación, a 17 h de cultivo en caldo YPD); c). La producción de biomasa en caldo YPD y el consumo de glucosa en caldo YPD y YPDQ, resultó

casi igual en las cepas paterna y mutante; y d). En los medios YPDQ y MMQ ambas cepas tuvieron el mismo crecimiento aparentemente, sin embargo, no fue posible estimar con precisión el peso seco, debido a la fuerte adsorción del micelio a la quitina coloidal (Vasseur *et al.*, 1990).

La actividad quitinolítica de cada cepa fue inferida mediante la estimación de la producción de NAG en medio MMQ, utilizando únicamente a la quitina coloidal como fuente de carbono. La concentración de NAG en el medio fue rápidamente incrementada en la cepa mutante M84, de tal forma que a las 120 h de cultivo, la cepa mutante resultó con una producción tres veces mayor que la cepa paterna Pfr612. Es decir, que la respuesta a la inducción de la actividad quitinolítica es mucho mayor y más rápida en la cepa mutante que en la cepa paterna. Por otro lado, en caldo YPD al no contener quitina, no se registró producción de NAG, sin embargo, cuando a ese mismo medio se le adicionó el substrato (medio YPDQ), la producción de NAG sólo fue detectada después del agotamiento de la glucosa del medio. Se observa que ambos medios contienen glucosa y que aún cuando hay quitina en uno de ellos, no se registró producción de NAG. Esto indica que cuando la glucosa se encuentra presente en el medio, las células evitan gastar energía y recursos en sintetizar enzimas innecesariamente, ya que la glucosa es una fuente de carbono que es fácil y rápidamente asimilable (Vasseur *et al.*, 1990). En otras palabras, cuando existe glucosa en el medio la actividad quitinolítica se mantiene reprimida, pero cuando la glucosa se agota, entonces el hongo comienza a sintetizar enzimas quitinolíticas para degradar la quitina y obtener nutrientes para su desarrollo, es decir, que se induce la actividad quitinolítica. Este mismo sistema de inducción y represión de la actividad quitinolítica ha sido reportado en otros hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Trichoderma harzianum* y *Aphanocladium album*. (Bidochka and Khachatourians, 1992b; Smith and Grula, 1983; Kang *et al.*, 1999; St. Leger *et al.*, 1986a; Ulhoa and Peberdy, 1991; Vasseur *et al.*, 1990).

El presente estudio es el primero en relacionar la virulencia y actividad quitinolítica de cepas paterna y mutante del hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus*. Esta relación sólo se ha reportado en *N. rileyi* (El-Sayed *et al.*, 1989); Vasseur *et al.*, (1990) obtuvo una cepa mutante sobreproductora de quitinasas de *A. album*, la cual solamente caracterizó, sin realizar bioensayos de virulencia.

Los bioensayos de virulencia fueron realizados con la finalidad de encontrar diferencias entre las cepas mutante M84 y paterna Pfr 612 hacia un mismo insecto blanco (Lacey *et al.*, 1993), llevándolos a cabo contra ninfas de la mosquita blanca (*B. tabaci*; Homóptera: Aleyrodidae), ya que *P. fumosoroseus* es un patógeno natural. Los resultados muestran que la cepa mutante M84 fue mas virulenta que la cepa paterna Pfr612.

Dada la posibilidad de que las cepas mostraran diferencias de patogenicidad hacia otros insectos blanco (Huxham *et al.*, 1989b) y debido a que existen diferencias en la composición de la cutícula entre las distintas especies de insectos (Hackman. 1994) y que la regulación de las enzimas extracelulares pudieran tener una diferente respuesta a esos cambios (Gupta *et al.*, 1992), entonces se realizaron bioensayos de virulencia contra larvas del falso medidor de la col (*T. ni*; Lepidóptera: Noctuidae). Al igual que con ninfas de la mosquita blanca, la cepa mutante M84 causó mayor mortalidad que la cepa paterna Pfr612. (60.5 vs. 51.2 %, respectivamente).

La mortalidad del falso medidor de la col, causada por las cepas Pfr612 y mutante M84, contrasta con la obtenida por Ignoffo *et al.*, (1982) y El-Sayed *et al.*, (1989), al aplicar *B. bassiana* y *N. rileyi* contra el mismo insecto (97.3 y 100 % de mortalidad, respectivamente).

La muerte de las larvas del falso medidor de la col, pudo deberse a: a) Al agotamiento de nutrientes del insecto debido al consumo de estos por las hifas del hongo en crecimiento, debilitando al mismo tiempo el mecanismo de defensa, lo cual provoca que dicho sistema sea más fácil y rápidamente superado (Hung *et al.*, 1993); b). Los efectos tóxicos de los metabolitos secundarios secretados por el hongo, existiendo la posibilidad de que esta sea la principal causa de muerte (St. Leger *et al.*, 1996b); y, c). La degradación parcial de las proteínas de la hemolinfa (St. Leger *et al.*, 1996b) ó la fuerte melanización de las células (Huxham *et al.*, 1989a).

La melanización celular causó que las larvas adquirieran un color oscuro. Estas larvas no mostraron reemergencia de micelio para ninguna de las cepas, paterna Pfr612 o mutante M84, lo cual indica que estas larvas son un substrato muy pobre en nutrimentos para el crecimiento y reproducción del hongo (St. Leger *et al.*, 1996b). Afectando así, la permanencia del hongo, dispersión de las esporas y la posibilidad de provocar epizootias en aplicaciones a nivel de campo.

Aunque las proteínas son el componente estructural predominante de la cutícula del insecto y que las proteasas son producidas y liberadas durante los primeros pasos de la penetración de la cutícula (St. Leger *et al.*, 1988), la mayor mortalidad causada por la cepa mutante M84, de mayor actividad quitinolítica, sugiere que ocurrió una mayor hidrólisis de la quitina cuticular, lo cual facilitó e incrementó el proceso de penetración. Por los presentes resultados, las quitinasas, además de las proteasas, son consideradas críticas durante el proceso de infección de insectos (St. Leger *et al.*, 1996a), y que las quitinasas pueden afectar la patogenicidad de una cepa de hongo entomopatógeno.

CONCLUSIONES

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

Se logró establecer un sistema de mutagénesis y detección de mutantes con mayor actividad quitinolítica, en *P. fumosoroseus*, mismo que se podría aplicar a otros hongos entomopatógenos.

Se aisló y caracterizó una cepa mutante (M-84), la cual resultó estable y con tres veces mas actividad quitinolítica que la cepa paterna (Pfr 612).

El mecanismo de síntesis de enzimas quitinasas es inducido por la quitina coloidal y es reprimido por la glucosa.

La cepa mutante M84 resultó más virulenta que la cepa paterna Pfr 612, al evaluarse contra ninfas de la mosquita blanca (*B. tabaci*) y larvas del falso medidor de la col (*T. ni*).

La mayor actividad quitinolítica de la cepa mutante M84 resultó ser un importante factor de virulencia contra ninfas de la mosquita blanca (*B. tabaci*) y larvas del falso medidor de la col (*T. ni*).

LITERATURA REVISADA

- 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.
- Aregger, E. 1992. Conidia production of the fungus *Beauveria brongniartii* on barley and quality evaluation during storage at 2^o C. *J. Invertebr. Pathol.* **59**: 2-10.
- Avila-Valdez, J. 1998. Evaluación del impacto de las liberaciones masivas de *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) sobre las poblaciones de *Bemisia tabaci* (Homóptera: Aleyrodidae) en tomate. *En: "Memorias del XXI Congreso Nacional de Control Biológico"*. pp. 186-188. Rio Bravo, Tamps., México.
- Becker, H., Corliss, J., De Quattro, J., Gerriets, M., Senft, D., Stanley, D. y Wood, M. 1992. Get the whitefly swatters-fast!. *Ag. Res.* **11**: 4-13.
- Bellows, T. S., Perring, T. M. Gill, R. J. y Headrick, D. H. 1994. Description of species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 195-206.
- 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.
- Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1988. N-acetyl-D-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2699-2704.

- 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.* **56**: 362-370.
- Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1992a. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* **59**: 165-173.
- Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1992b. Regulation of extracellular *N*-acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 6-12.
- Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 26-32.
- Blackwell, J. y Weih, M. A. 1980. Structure of chitin-protein complexes: ovipositor of the Ichneumon fly *Megarhyssa*. *J. Mol. Biol.* **137**: 49-60.
- Boller, T. 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. *En*: "Plant-microbe interactions, molecular and genetic perspectives". (T. Kosuge y E. W. Nester. Eds.) pp. 384-414. McMillan, New York.
- Boucias, D. G., Pendland, J. C. y Latge, J. P. 1988. Nonspecific factors in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1795-1805.

- Brey, P. T., Latge, J. P. y Prevost, M. C. 1986. Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *J. Invertebr. Pathol.* **48**: 34-41.
- Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. H. y Nes, I. F. 1994. Characterization of a chitinase gene (*chiA*) from *Serratia marcescens* BJL200 and one-step purification of the gene product. *FEMS Microbiol. Letters.* **124**: 399-404.
- Bunell, J. E. 1995. Isozyme analysis of *Paecilomyces farinosus* and *P. fumosoroseus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes), two potential biological control agents of the sweet potato and silverleaf whiteflies (*Bemisia* spp). Master of Science Thesis. Montana State University. Montana, U.S.A. 79 pp.
- Byrne, D. N., Bellows, T. S. y Parrella, M. P. 1990. Whiteflies in agricultural systems. *En*: "Whiteflies: Their bionomics, pest status, and management". (Gerling, D. Ed.) pp. 227-261. Atheneum Press, Newcastle, U. K.
- Castrillo, L. A., Wiegmann, B. M. y Brooks, W. M. 1999. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *J. Invertebr. Pathol.* **73**: 269-275.
- Charnley, A. K. y St. Leger, R. J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. *En*: "The fungal spore and disease initiation in plants and animals". (G. T. Cole y H. C. Hoch. Eds.). pp. 267-286. Plenum, New York, U. S. A.
- Clark, R. A., Cassagrande, R. A. y Wallace, D. B. 1982. Influence of pesticides of *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. *Environ. Entomol.* **11**: 67-70.

- 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 of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* **11**: 1-7.
- Cohen-Kupiec, R. y Chet, I. 1998. Molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opinion Biotechnol.* **9**: 270-277.
- Coudron, T. A., Kroha, M. J. e Ignoffo, C. M. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.* **79B**: 339-348.
- Cox, D. L. y Willis, J. H. 1987. Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with two dimensional electrophoresis. *Insect Biochem.* **17**: 457-468.
- Daoust, R. A. y Pereira, R. M. 1986. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on beetle-attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. *Environ. Entomol.* **15**: 1237-1243.
- de Siqueira, A. P., Barreto, C. C., Schrank, A., Ulhoa, C. J. y Vainstein, M. H. 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 322-327.
- 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.
- El-Sayed, G. N., Ignoffo, C. M., Leathers, T. D. y Gupta, S. C. 1993. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathology.* **122**: 79-87.

- Fargues, J., Rougier, M., Goujet, R., Smits, N., Coustere, C. e Itier, B. 1997. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *J. Invertebr. Pathol.* **69**: 70-78.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J. y Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci. Technol.* **4**: 4-34.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insects pests by entomogenous fungi. *Annu. Rev. Entomol.* **23**: 409-442.
- Flach, J., Pilet, P. E. y Jolles, P. 1991. What's new in chitinases research?. *Experientia.* **48**: 701-714.
- Gill, R. J. 1992. A review of the sweetpotato whitefly in Southern California. *Pan-Pac. Entomol.* **68**: 144-152.
- 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.
- Griffin, D. H. 1994. Fungal physiology. 2a. ed. Wiley-Liss, New York. 458 pp.
- 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.
- Gupta, A. P. 1986. Hemocytic and humoral immunity in arthropods. Wiley, New York, U. S. A.

- 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.
- Gupta, S. C., Leathers, T. D., El-Sayed, G. N. e Ignoffo, C. M. 1992. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* **16**: 132-137.
- Hackman, R. H. 1994. Chemistry of the insect cuticle. *En*: "The physiology of insects" (M. Rockstein Ed.), 2nd ed., pp. 215-270. Academic Press, New York.
- Hajek, A. E. y St. Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.
- 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.
- Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hirayae, K y Hibi, T. 1993. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 97-102.
- 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. Econom. Entomol.* **85**: 58-64.

- Hazen, E. L., Gordon, A. y Reed, F. C. 1970. Laboratory identification of pathogenic fungi simplified. 3a. ed. (C. C. Thomas Ed.). 253 pp. Springfield, Illinois. U.S.A.
- Hepburn, H. R. 1985. Structure of the integument. *En: "Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology"*. (G. A. Kerkut y L. I. Gilbert, Eds.), vol. 3. pp. 1-58. Pergamon, Oxford.
- Humber, R. A. 1992. Collection of entomopathogenic fungal cultures: Catalog of strains, 1992. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS - 110, 177 pp.
- Hung, S. Y. y Boucias, D. G. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 152-158.
- 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.
- Huxham, I. M., Lackie, A. M. y McCorkindale, N. J. 1989a. Inhibitory effects of cyclopeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity in insects. *J. Insect. Physiol.* **35**: 97-105.
- Huxham, I. M., Samuels, K. D. Z., Heale, J. B. y McCorkindale, 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.

- Ignoffo, C. M., Garcia, C., Kroha, M. y Couch, T. L. 1982. Use of larvae of *Trichoplusia ni* to bioassay conidia of *Beauveria bassiana*. J. Econ. Entomol. **75**: 275-276.
- Inglis, G. D., Duke, G. M., Kawchuk, L. M. y Goettel, M. S. 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. Biol. Cont. **14**: 111-120.
- Jackson, C. W., Heale, J. B. y Hall, R. A. 1989. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. **106**: 39-48.
- Jeffs, L. B. y Khachatourians, G. G. 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium* and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. Can. J. Microbiol. **43**: 23-28.
- Jones, J. D. G., Grady, K. L., Suslow, T. V. y Bedbrook, J. R. 1986. Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. EMBO J. **5**: 467-473.
- Kang, S. C., Park, S. y Lee, D. G. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. **73**: 276-281.
- Kramer, K. J. y Muthukrishnan, S. 1997. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. Insect Biochem. Mol. Biol. **27**: 887-900.
- Kuranda, M. J. y Robbins, P. W. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cereviceae*. J. Biol. Chem. **266**: 19758-19767.

- Lacey, L. A., Kirk, A. A. y Hennessey, R. D. 1993. Foreign exploration for natural enemies of *Bemisia tabaci* and implementation in integrated control programs in the United States. A. N. P. P. Third International Conference on Pest in Agriculture. pp. 351-360. Montpellier, France.
- Marmaras, V. J., Charalambidis, N. D. 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.
- Martens, J. A. 1993. Fungus and new crops build business in Florida. Grower Talks. **56**: 34-41.
- Maya-Hernández, V. y Garza-Urbina, E. 1998. Identificación de hospederos de mosquita blanca en el estado de San Luis Potosí. En: "Memorias del XXI Congreso Nacional de Control Biológico". pp. 206-208. Rio Bravo, Tamps., México.
- McCoy, C. W. 1974. Fungal pathogens and their use in the microbial control of insects and mites. En: "Proceedings of the Summer Institute on biological control of plants insects and diseases". (Maxwell, F. G. y F. A. Harris. Eds.). pp. 564-575. University Press of Mississippi. Mississippi, U. S. A.
- Messias, C. L., Daoust, R. A. y Roberts, D. W. 1986. Virulence of a natural isolate, auxotrophic mutants, and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. J. Invertebr. Pathol. **47**: 231-233.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. **31**: 426-428.

- 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.
- Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. y Ohmiya, K. 1997. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* **179**: 7306-7314.
- Navot, N., Zeidan, M., Pichersky, E., Zamir, D. y Czosnek, H. 1992. Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology.* **82**: 1199-1202.
- Nuero, O. M. 1995. Production of chitinase by *Fusarium* species. *Current Microbiol.* **30**: 287-289.
- Onions, A. H. S. 1979. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. The Cambrian News (Aberystwyth) Ltd., Great Britain.
- Ortiz-Catón, M. y Alatorre-Rosas, R. 1998. Efectividad biológica de hongos contra mosquitos *Trialeurodes vaporariorum* West. (Homóptera: Aleyrodidae). *En: Memorias del XXI Congreso Nacional de Control Biológico.* pp. 196-198. Rio Bravo, Tamps.
- Osborne, L.S. y Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomol.* **75**: 456-471.
- Osborne, L.S., Storey, G. K., McCoy, C. W. y Walter, J. F. 1990. Potential of controlling the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *En: "Proceedings and abstracts of 5th International*

Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control". pp. 386-390.
Adelaide, Australia.

Pekrul, S. y Grula, E. A. 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* **34**: 238-247.

Pendland, J. C. y Boucias, D. G. 1984. Production and regeneration of protoplasts in the entomogeneous hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* **43**: 285-287.

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. Insect. Physiol.* **34**: 533-540.

Perring, T. M., Cooper, A. D., Rodriguez, R. J., Farrar, C. A. y Bellows, T. S. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science.* **259**: 74-77.

Pfeifer, T. A. y Khachatourians. 1992. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 376-381.

Polston, J. E., Al-Musa, A. Perring, T. M. y Dodds, J. A. 1990. Association of the nucleic acid of squash leaf curl geminivirus with the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology.* **80**: 850-856.

Rath, A. C., Guy, P. L. y Webb, W. R. 1995. *Metarhizium* spore surface antigens are correlated with pathogenicity. *Mycol. Res.* **100**: 57-62.

- Rege, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J. y Zilberstein, A. 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3581-3586.
- Reissing, J. L., Strominger, J. L. y Leloir, L. F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J. Biol Chem.* **217**: 959-966.
- Richards, A. G. y Richards, P. A. 1977. The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol.* **22**: 219-240.
- Roberts D. W. y Yendol, W. G. 1971. Use of fungi for microbial control of insects. *En: "Microbial control of insects and mites"*. (Burgess, H. D. y Hussey, N. H. Eds.). pp.125-149. Academic Press, New York.
- Ruíz, J. V. 1993. *Diagnostico de la situación actual de las hortalizas en el estado de Oaxaca*. CIIDIR-IPN-OAXACA, Indeco-Xoxo, Oaxaca, México. 7 p.
- Ruíz, J. V., Arce G., F., Aquino B., T., García G., J. y Martínez S., D. 1998. Control biológico integrado de mosquita blanca *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae) en chile de agua. *En: "Memorias del XXI Congreso Nacional de Control Biológico"*. pp. 203-205. Rio Bravo, Tamps., México.
- Ruíz, J. V., Ibarra, J. E. R. y Pérez, R. P. 1995. Bioensayos con hongos entomopatógenos de mosquita blanca a distintas humedades relativas. *En: "Memorias del XVIII Congreso Nacional de Control Biológico"*. pp. 72-73. Tapachula, Chiapas, México.
- Sampson, M. N. y Gooday, G. W. 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology.* **144**: 2189-2194.

- 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*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 156-161.
- 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.
- Schmit, 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.
- Shen, Z. y Jacobs-Lorena, M. 1997. Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 28895-28900.
- Shimizu, S. y Hayata, C. 1990. Cryopreservation of protoplast of an entomogenous fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invertebr. Pathol.* **56**: 283-285.
- Shimizu, S., Nishida, Y., Yoshioka, H. y Matsumoto, T. 1991. Separation of chromosomal DNA molecules from *Paecilomyces fumosoroseus* by pulsed-field electrophoresis. *J. Invertebr. Pathol.* **58**: 461-463.
- Siebeneicher, S. R., Vinson, S. B. y Kenerley, C. M. 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *J. Invertebr. Pathol.* **59**: 280-285.
- Smith, R. J. y Gula, E. A. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 319-326.

- 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.
- Starnes, R. L., Liu, C. L. y Marrone, P. G. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* **39**: 83-91.
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. y Charnley, A. K. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1509-1517.
- 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.
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. y Charnley, A. K. 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1371-1382.
- 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* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 285-293.
- 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.

- St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J. y Roberts, D. W. 1996b. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6349-6354.
- St. Leger, R. J., May, B., Allee, L. L., Frank, D. C., Staples, R. C. y Roberts, D. W. 1992. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 89-101.
- 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.
- Tanada, Y. y Kaya, H. K. 1993. *Insect pathology*. Academic Press. San Diego, CA, U. S. A. 666 pp.
- Tronsno, A. y Harman, G. E. 1993. Detection and quantification of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.* **208**: 74-79.
- Trudel, J. y Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Chem.* **178**: 362-366.
- Tsujibo, H., Orikoshi, H., Shiotani, K., Hayashi, M., Umeda, J., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y. e Inamori, Y. 1998. Characterization of chitinase C from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7, and its corresponding gene and domain structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 472-478.
- Ulhoa, C. J. y Peberdy, J. F. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2163-2169.

- 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.
- Veen, K. H. 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **9**: 276-278.
- Vega, F. E., Dowd, P. F., McGuire, M. R., Jackson, M. A. y Nelsen, T. C. 1997. *In vitro* effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Invertebr. Pathol.* **70**: 209-213.
- Vidal, C., Fargues, J. y Lacey, A. L. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *J. Invertebr. Pathol.* **70**: 18-26.
- Wiwat, C., Lertcanawanichakul, M., Siwayapram, P., Pantuwatana, S. y Bhumiratana, A. 1996. Expression of chitinase-encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Gene.* **179**: 119-126.
- Wraight, S. P., Carruthers, R. I., Bradley, C. A., Jaronski, S. T., Lacey, L. A., Wood, P. y Galaini-Wraight, S. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Invertebr. Pathol.* **71**: 217-226.
- Yanagita, T. 1980. The formaldehyde resistance of *Aspergillus* fungi attacking silkworm larvae. 4. The relationship between pathogenicity to silkworm

larvae and chitinase activity of *Aspergillus flavus oryzae*. J. Seric. Sci. Jpn. **49**: 440-445.

Yanagita, T. 1987. Studies on oral infection of larvae of the silkworm *Bombix mori*, with *Beauveria bassiana*. J. Seric. Sci. Jpn. **56**: 279-284.



