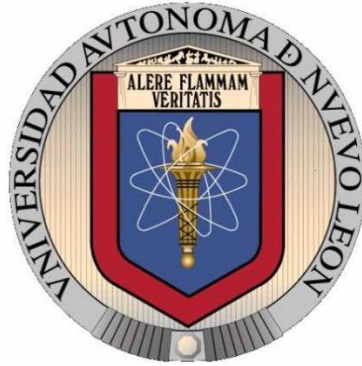


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



POTENCIACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE CUTÍCULA A PARTIR DE DOS AISLAMIENTOS MONOSPÓRICOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN PARA MEJORAR EL BIOCONTROL DE LA CONCHUELA DEL FRIJOL, *Epilachna varivestis* (MULSANT).

QUE PRESENTA

Q.F.B. JESÚS ENRIQUE CASTREJÓN ANTONIO

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



POTENCIACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE CUTÍCULA A PARTIR DE DOS AISLAMIENTOS MONOSPÓRICOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN PARA MEJORAR EL BIOCONTROL DE LA CONCHUELA DEL FRIJOL, *Epilachna varivestis* (MULSANT).

QUE PRESENTA

Q.F.B. JESÚS ENRIQUE CASTREJÓN ANTONIO

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

COMITÉ DE TESIS

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

Dr. Ricardo Gómez Flores
Secretario

Dra. Carlos E. Hernández Luna
Vocal

Dr. María M. Iracheta Cárdenas
Vocal

Dr. Carlos F. Sandoval Coronado
Vocal



Sin duda, pasé de ser un estudiante a ser miembro de una gran familia. Siempre estaré agradecido con la **Dra. Patricia Tamez Guerra** por haberme dado la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo y brindarme un espacio en él. Por apoyarme en cada paso, siempre con atención y disposición. Le agradezco el haber compartido conmigo una gota de su mar de conocimientos, enseñándome a ser un mejor profesional y una mejor persona. Gracias por abrirme las puertas de su hogar y demostrarme que ser investigador no significa dejar de ser humano.

Al **Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado** le agradezco haberme apoyado en cada momento y circunstancia, por haberme empujado a seguir un sueño y sobre todo... por creer en mí.

A la **Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas** agradezco sus valiosas aportaciones a este trabajo, así como por su amable disposición a regalarme un poco de sus conocimientos.

Agradezco al **Dr. Ricardo Gómez Flores** y al **Dr. Carlos Hernández Luna** por formar parte de mi comité.

A mis nuevos amigos

Alberto Valadez	Gabriela Damas	Marcela Martínez
Adán Galindo	Gricelda Nuñez	Mariana Márquez
Alejandra Gómez Tamez	Humberto Hernández	Mayela Montes
Alejandro Ledezma	Jaime Ocampo	Mayra Treviño
Alonso Orozco	Jorge Allen	Nora Mares
David Briseño	José Luis Núñez	Horacio Lara
Diana Elena	Josué Fierro	Orquídea Pérez
Edgar Manilla	Juan Ballesteros	Paola Jalomo
Elizabeth Terrazas	Kenzy Peña	Sarah Parra
Emmanuel Garza	Magdalena Navarro	Uziel Castillo
Enriqueta Monreal	Manuel	Verónica Padilla
Fernando Tamayo	Marcela Garza	

Falto a la verdad al decir que dedico este trabajo, pero sirvo a la sinceridad cuando expreso que cada logro alcanzado lo dedico a los miembros de mi familia, quienes me han dado la libertad de ser, pensar y decidir; quienes me han apoyado bajo cualquier circunstancia, con todo lo que está a su alcance, brindándome todo su cariño y haciéndome sentir que no estoy sólo

No puedo hablar de mis éxitos si antes no hablo de mis fracasos, no puedo platicar de mí si no hablo de quienes me han ayudado, no puedo decir que yo solo he alcanzado a ser quien soy porque hay mucha gente detrás de mí... todos ustedes tienen un lugar en mi corazón y de ahí nunca saldrán:

Lucia Antonio Cárdenas

Adán Castrejón Cortes

Sandra Guadalupe Castrejón Antonio

Néstor Alexis Licea Antonio

Bricia Noemí Cano Castrejón

María Guadalupe Cárdenas Ochoa

María de Jesús Cortes Flores

Isaías Rodríguez Cárdenas

Elia Guadalupe Castrejón Martínez

Agustín Castrejón Cortes

Sonia Cárdenas

Muchas gracias a ti **Jessica Jazmín Rodríguez Celestino**

TODOS Y CADA UNO DE MIS TRIUNFOS SON SUYOS TAMBIÉN

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Hongos como agentes de control biológico	5
2.2 <i>Beauveria bassiana</i>	5
2.3 Hospederos de <i>B. bassiana</i>	6
2.4 Unidades infectivas de <i>B. bassiana</i>	7
2.5 Proceso infeccioso de hongos entomopatógenos	7
2.5.1 Fase de adhesión	8
2.5.2 Fase de Germinación y Penetración Cuticular	8
2.5.3 Fase de invasión y muerte	9
2.5.4 Fase de esporulación	10
2.6 Metabolitos en HEP	10
2.6.1 Enzimas quitinolíticas	10
2.6.2 Enzimas proteolíticas	11
2.6.2.1 Serina peptidasa Pr1	12
2.6.2.2 Tripsina peptidasa Pr2	13
2.7 Relación entre actividad insecticida y medio de cultivo	13
2.7.1 Medio de cultivo y producción de enzimas quitinolíticas	14
2.7.2 Medio de cultivo y producción de enzimas peptidasas	14
2.8 Cultivo de Frijol	15
2.9 Conchuela del Frijol <i>Epilachna varivestis</i>	16
2.9.1 Ciclo biológico	17
2.9.1.1 Huevo	18
2.9.1.2 Larva	18
2.9.1.3 Pupa	18
2.9.1.4 Adultos	19
2.9.2 Control biológico de <i>E. varivestis</i>	19

3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	23
4.1. General	24
4.2. Particulares	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 Procedencia y mantenimiento de la cría de <i>E. varivestis</i>	26
5.2 Procedencia y reactivación del aislamiento fúngicos	27
5.2.1 <i>Conteo de propágulos</i>	27
5.2.2 <i>Porcentaje de germinación de propágulos</i>	28
5.3 Selección de medios de cultivo	29
5.3.1 <i>Cultivo de los hongos y toma de muestras</i>	29
5.4 Medición de la actividad de la proteasa Pr1	30
5.4.1 <i>Zimograma</i>	30
5.5 Medición de la actividad de la quitinasa β-N-acetil-glucosamidasa (NAGasa)	31
5.6 Determinación de la actividad insecticida	31
5.6.1 <i>Preparación de los tratamientos</i>	32
5.6.2 <i>Bioensayos</i>	32
5.6.2.1 <i>Experimento 1</i>	33
5.6.2.2 <i>Experimento 2</i>	33
5.7 Análisis Estadístico	33
6.-RESULTADOS	34
6.1 Actividad enzimática de Pr1	35
6.1.1 <i>Zimograma</i>	37
6.2 Actividad enzimática de NAGasa	37
6.3 Actividad insecticida	39
6.3.1 <i>Experimento 1</i>	39
6.3.2 <i>Experimento 2</i>	41
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	49
9. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Proceso infeccioso de <i>B. bassiana</i> sobre un insecto.	7
Figura 2.- Ciclo Biológico de <i>E. varivestis</i> .	17
Figura 3.- Jaulas de pabalo empleadas para la cría de larvas y adultos de <i>E. varivestis</i> .	26
Figura 4.- Vasitos de plástico de 3 piezas, adaptados para la cría de insectos y ensayos de actividad insecticida.	26
Figura 5.- Sitio de conteo en la cámara de Neubauer.	28
Figura 6.- Perfil de actividad enzimática de Pr1 para el asilamiento Bb37 desarrollado en diferentes medio de cultivo.	35
Figura 7.- Perfil de actividad enzimática de Pr1 para el asilamiento Bb40 desarrollado en diferentes medio de cultivo.	36
Figura 8.- Detección de la actividad proteolítica sobre el sustrato SAPFNA, de una enzima presente en los extractos enzimáticos de los aislamientos Bb37 y Bb40 en el medio C ₁ N ₂	37
Figura 9.- Perfil de actividad enzimática de NAGasa para el asilamiento Bb37 desarrollado en diferentes medio de cultivo.	38
Figura 10.- Perfil de actividad enzimática de NAGasa para el asilamiento Bb40 desarrollado en diferentes medio de cultivo.	39
Figura 11.- Supervivencia de larvas de 3er estadio de <i>E. varivestis</i> a blastosporas de 2 aislamientos de <i>B. bassiana</i> desarrollados en 2 medios líquidos distintos.	40
Figura 12.- Supervivencia de larvas de 3er estadio de <i>E. varivestis</i> a la concentración de 1X10 ⁸ blastosporas/mL.	41
Figura 13.- Curva de supervivencia Kaplan-Meyer de larvas de 3er estadio de <i>E. varivestis</i> a la concentración de 1X10 ⁸ blastosporas/mL.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i>	5
Tabla 2.- Clasificación taxonómica de la conchuela del frijol	17
Tabla 3.- Origen de los aislamiento de <i>B. bassiana</i> en el estudio.	27
Tabla 4.- Medios de cultivo líquidos empleados para el crecimiento de los aislamientos de <i>B. bassiana</i> .	29
Tabla 5.- Actividad máxima de Pr1 y NAGasa de las cepas de <i>B. bassiana</i> desarrolladas en diferentes medios de cultivo líquido	36
Tabla 6.- Concentración Letal 50 para las blastosporas de los aislamientos de Bb37 y Bb40 desarrollados en el medio de CDS y C ₁ N ₂ .	40

LISTA DE ABREVIATURAS

PDA	Agar papa dextrosa
CDS	Caldo dextrosa sabouraud
cm	Centímetro
CESAPEG	Comisión Estatal de Sanidad Vegetal
d	Días
SDS	Dodecilsulfato de sodio
EDC	Enzimas degradadoras de cutícula
EE	Extracto enzimático
°C	Grado centígrado
HEP	Hongos entomopatógenos
h	Hora (s)
HR	Humedad Relativa
m/v	Masa/ volumen
MM	Medio mínimo
μL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
M	Molaridad
nm	Nanómetros
nmol	Nanomol
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SAPFNA	sustrato succinil-(alanina) ₂ -prolina-fenilalanina-p-nitroanilina
U	Unidades
NAGasa	β-N-acetil-glucosamidasa

RESUMEN

Como alternativa al uso de productos químicos para el control de insectos plaga se encuentra el empleo de microorganismos como el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. La conchuela del frijol, *Epilachna varivestis*, es una plaga importante en las zona de Guanajuato, la cual es susceptible a *B. bassiana*. El laboratorio de reproducción de organismos benéficos del Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVEG) cuenta con aislamientos de *B. bassiana* con buena actividad insecticida contra larvas y adultos de *E. varivestis*. El objetivos del presente trabajo fue potenciar la producción de metabolitos de dos aislamientos monoespóricos de *B. bassiana* por medio de la selección de medios de cultivo líquidos y comprobar si con dicha potenciación es posible incrementar la actividad insecticida de los hongos sobre larvas de la conchuela del frijol. Los aislamientos se cultivaron en 6 medios de cultivo líquidos, preparados con 2 diferentes fuentes de carbono y 2 de nitrógeno: C₁, C₁N₁, C₁N₂, C₂, C₂N₁; C₂N₂. El caldo dextrosa Sabouraud (CDS) se empleó como medio de referencia. Cada medio se inoculó con conidios del respectivo hongo a una concentración de 1×10^6 esporas/mL e incubaron en agitación a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 5 días. Cada 24 h se tomaron muestras y al sobrenadante se le midió la actividad enzimática de la proteasa Pr1 y de la NAGasa mediante espectrofotometría. Se realizaron bioensayos sobre larvas de 3er estadio de *E. varivestis* empleando las blastosporas obtenidas en CDS y en el medio de cultivo que promovió la mayor actividad enzimática, para determinar la CL₅₀ y la ST₅₀ empleando cinco dosis en un rango de 1×10^5 - 1×10^8 blastosporas/mL. Los resultados mostraron que en el medio CDS, la actividad enzimática fue menor comparada con los otros medios de cultivo evaluados, siendo el medio C₁N₂ el que mostró la mayor actividad para ambos aislamientos, con valores 18 veces mayores para Pr1 y hasta 4 veces mayores para la NAGasa con respecto al medio CDS. En cuanto a actividad insecticida, sólo se encontraron diferencias significativas de CL₅₀ para el aislamiento Bb40 entre los medios mencionados, y diferencias en las ST₅₀ de blastosporas de ambos aislamientos que crecieron en el medio CDS (4 días), contra el C₁N₂ (2 días). Estos resultados nos permiten concluir que existe una relación entre la mayor producción de las enzimas degradadoras de la cutícula de insectos Pr1 y NAGasa en un medio y la disminución del ST₅₀ de la plaga del frijol *E. varivestis*.

ABSTRACT

The use of entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* represents an alternative for the use of chemical insecticides for the control of insect pest. The Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis*, is an important pest among bean crop in Mexico. The Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVEG) has isolates of *B. bassiana* with an effective insecticidal activity against *E. varivestis* larvae and adults. The aim of the present study was to evaluate the metabolites production by two *B. bassiana* isolates by using different liquid media. In addition, we evaluated the relationship between metabolite production and the insecticidal activity and *E. varivestis* survival time. *B. bassiana* isolates were grown in six different liquid media using a mineral salts-based medium and combining two carbon and two nitrogen sources: C₁, C₁N₁, C₁N₂, C₂ C₂N₁; C₂N₂. Dextrose Sabouraud broth (DSB) was used as reference medium. Each medium was inoculated with conidia to a final concentration of 1X10⁶ conidia/ mL and grown for 5 d at 25°C at 180 rpm. A sample was obtained every 24 h and the enzyme activity of Pr1 and NAGase was spectrophotometrically determined. Bioassays were performed by using the blastospores produced in the DSB and the medium that induced the highest enzyme activity against 3rd instars *E. varivestis* larvae. The LC₅₀ and ST₅₀ were estimated by using 5 doses among 1X10⁵-1X10⁸ blastospores/ mL.

The lowest enzyme activities for both enzymes were found by the DSB medium blastospores, whereas the Pr1 and NAGase activity were higher in C₁N₂ medium compared with all the other media. Significant differences were observed between the LC₅₀ values only in the Bb40 isolate, and differences in the TS₅₀ values by blastospores grown in DSB (4 days) compared with C₁N₂ (2 days), were observed.

Results indicate a relationship between of Pr1 and NAGase production by *B. bassiana* and the reduction of the 3rd instar *E. varivestis* larvae survival time.

1. INTRODUCCIÓN

Los campos agrícolas de todo el mundo sufren constantes daños causados por diversos tipos de organismos ya sean insectos, malezas, roedores, aves o por microorganismos como hongos, virus y bacterias, los cuales generan enfermedades y destrucción en los cultivos. Los efectos derivados de dichos organismos reducen la producción y calidad de los productos, mermando la economía de productores, comerciantes y consumidores.

El frijol es uno de los cultivos más importantes a nivel nacional, ocupando el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada (Acosta *et al.*, 2000). Entre los estados con mayor producción del frijol se encuentra el estado de Guanajuato, el cual ocupó al cierre del 2010, el séptimo lugar con la obtención de 51,292 ton, con un rendimiento aproximado de 0.75 ton/ha (SIAP, 2011).

Entre los problemas fitosanitarios a los que se enfrenta el cultivo de frijol en el estado de Guanajuato se encuentra la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), un insecto que se alimenta tanto de las hojas, tallo y fruto de la planta, ocasionado daños que pueden reflejarse en bajos rendimientos de producción de la semilla. Como dependencia responsable, el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del estado de Guanajuato (CESAVEG) implementa programas de control biológico en contra de *E. varivestis*, empleando hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin, un hongo de reconocida actividad insecticida y del cual el CESAVEG cuenta con dos aislamientos, los cuales tiene acción patógena en contra de la conchuela del frijol (Ocampo-Hernández *et al.*, 2011).

Al emplear hongos en los programas de control de plagas, es necesario considerar el tipo de unidad infectiva a utilizar, pudiéndose considerar dos de ellos: los conidios, producidos en medios sólidos; y las blastosporas, desarrolladas en medios líquidos (Holder *et al.*, 2007). Así también, es importante tomar en cuenta que las condiciones nutricionales del medio empleado en el desarrollo de los hongos influye en características como: velocidad de germinación, rendimiento de esporas o blastosporas generadas (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010); tolerancia térmica (Kim *et al.*, 2011), a la radiación ultravioleta (Rangel *et al.*, 2004) y en su virulencia (Gallegos *et al.*, 2002). Para este último punto, se han considerado diversos parámetros que permitan predecir el efecto de un medio de cultivo y/o condiciones de desarrollo, sobre la actividad insecticida de un hongo. Uno de

esos parámetros ha sido la medición de la producción de enzimas degradadoras de cutícula excretadas al medio, cuyos niveles se han relacionado con la virulencia de las unidades infectivas (Gupta *et al.*, 1994).

Con la finalidad de implementar el uso de blastosporas en el CESAPEG, surge el presente proyecto, donde se desarrollaron blastosporas de los dos aislamientos de *B. bassiana* en diferentes medios de cultivo líquido, buscando aquel que ayudará a incrementar la producción de enzimas degradadoras de cutícula y evaluando la actividad insecticida de las unidades infectivas desarrolladas en el medio que mayor enzimas indujo comparado con un medio de producción de uso común en el laboratorio.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hongos como agentes de control biológico

Las micosis (infecciones causadas por hongos) son comunes y ampliamente distribuidas entre las poblaciones naturales de insectos, generando en determinadas circunstancias, una regulación de las poblaciones mediante eventos infecciosos a gran escala, denominados epizootias. Estas observaciones permitieron considerar el uso de hongos para el control de insectos plaga en la última parte del siglo XIX, siendo los trabajos realizados por Agostino Bassi en 1835, con *Beauveria bassiana* y los de Metchnikov en 1878, con *Metarhizium anisopliae*, los primeros dentro del área (McCoy y Tigano-Milani, 1992).

Los hongos con actividad entomopatogénica se encuentran dentro de las divisiones Zygomycota, Ascomycota, Chytridiomycota y Oomycota (Shah y Pell, 2003), aunque es en la clase de los Entomophthorales y de los Hyphomycetes en donde se agrupan los hongos más empleados y con mayor espectro de actividad (Hajek y Delalibera, 2010).

2.2 *Beauveria bassiana*

La clasificación taxonómica de *B. bassiana* ha tenido diversos cambios conforme se han mejorado las técnicas de clasificación filogenética de las especies. Anteriormente se consideraba a *B. bassiana* como miembro de la familia de Clavicipitaceae, sin embargo, estudios más recientes han establecido la relación que existen de este hongo con los de la familia Cordycipitaceae (Tabla 1) (Sung *et al.*, 2007).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>bassiana</i>

Al igual que otros hongos entomopatógenos (HEP) como *Aspergillus*, *Aschersonia*, *Culicinomyces*, *Fusarium*, *Gibellula*, *Hirsutella*, *Isarea*, *Hymenostilbe*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Sorosporella* y *Tolypocladium*, a *B. bassiana* se le conoce principalmente en su estadio asexual (anamórfico) productora de esporas (conidios). Y aunque en la mayoría de los casos se desconoce el estadio sexual (teleomórfica) de los hongos, para *B. bassiana* se describe su asociación con la forma teleomórfica del género *Cordyceps* (*Condyceps bassiana*) y la cual se encuentra restringida al continente Asiático (Zimmermann, 2007).

Fue Agostino Bassi quien en 1834 demostró que este hongo era el causante de la enfermedad muscarina blanca, en el gusano de seda, *Bombyx mori* L. (Carballo *et al.*, 2004). Desde entonces, el conocimiento sobre *B. bassiana* y su uso como agente entomopatógeno ha tenido un importante desarrollo, llegando a ser uno de los hongos de mayor aplicación en el control de plagas. Su distribución es cosmopolita, encontrándose de manera común en los suelos pero pudiéndose aislar de las superficies o como un endófito en el interior de plantas como el maíz, la papa, el tomate, plantas de café y de cacao, asociación que ha sido aprovechada en la planta *Zea mays* L. para el control de la plaga conocida como gusano europeo del maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner (Posada y Vega, 2005a).

2.3 Hospederos de *B. bassiana*

En la actualidad se tiene una gama importante de literatura con respecto a los diversos insectos susceptibles a ser infectados por *B. bassiana*. Se le reconoce la capacidad de infectar a más de 700 especies de artrópodos dentro de los ordenes Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodae, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae, Embioptera, muchos de los cuales son plagas agrícolas (Ezzati-Tabrizi *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2010). De igual forma, se tienen diversos reporte sobre la efectividad de cepa de *B. bassiana* para el control de mosquitos adultos del género *Aedes* spp. y *Anopheles* spp., resistentes a los insecticidas químicos (Howard *et al.*, 2010).

2.4 Unidades infectivas de *B. bassiana*

Las unidades infectivas empleadas con mayor frecuencia son las conidiosporas o conidios de los hongos, siendo relativamente resistentes a las variaciones ambientales, más no así a las radiaciones solares de tipo UV (Fan *et al.*, 2007). De igual manera, estructuras celulares como las blastosporas, han sido empleadas como unidades de infección. Éstas son formas levaduriformes, las cuales presentan velocidad de germinación y de crecimiento mayor a las de las conidios; sin embargo, su inestabilidad a las condiciones de campo las hace poco empleadas (Hegedus *et al.*, 1992).

2.5 Proceso infeccioso de hongos entomopatógenos

A diferencia de otros agentes entomopatógenos, como bacterias y virus, los hongos no requieren de ser ingeridos por el insecto para poder iniciar el proceso infeccioso, lo cual representan una ventaja para su elección como herramienta en el control biológico (Hajek y Delalibera, 2010). Sin embargo, cabe destacar que algunas unidades infectivas puedan ser consumidas por los insectos y comenzar el proceso infeccioso desde el intestino (Joseph *et al.*, 2010).

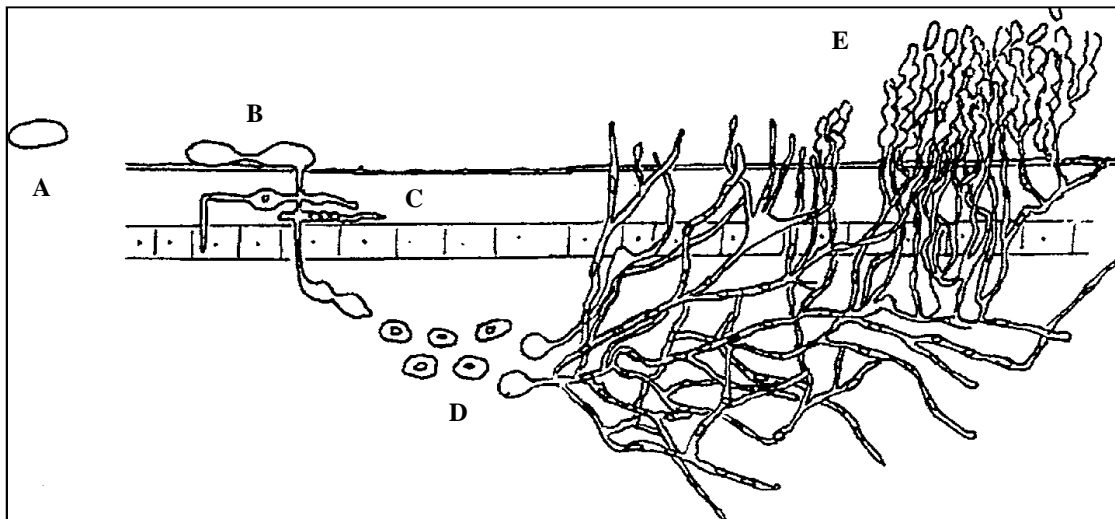


Figura 1. Proceso infeccioso de *B. bassiana* sobre un insecto. A) Unidad infectiva. B) Germinación de la unidad infectiva sobre el hospedero. C) Penetración del hospedero. D) Invasión de tejidos y órganos. E) Esporulación sobre el cadáver del hospedero. Tomado de Small y Bidochka, 2005.

2.5.1 Fase de adhesión

El contacto entre el hongo y el cuerpo del hospedero representa una etapa determinante para el inicio de la micosis. Los conidios se fijan a la epicutícula del insecto mediante fuerzas hidrofóbicas conferidas por proteínas tipo hidrofobinas (Holder *et al*, 2007; Li *et al.*, 2010). La adhesión a determinadas zonas anatómicas del insecto, como pliegues intersegmentales, espiráculos y piezas bucales, facilitan los procesos subsecuentes a la adhesión, debido al grado de humedad que presentan y a que su nivel de queratinización es menor, proporcionando con ello menor resistencia a la penetración (Charnley y Collins, 2007).

2.5.2 Fase de Germinación y Penetración Cuticular

Una vez adherida a la superficie del insecto, el proceso germinativo del conidio está influenciado por diversos factores, tanto bióticos como abióticos. Entre los factores bióticos, son de gran importancia la humedad y temperatura que determinan la viabilidad del conidio y la velocidad germinativa (Zimmermann, 2007). Aunque el rango de humedad y temperatura necesarios, puede ser variable entre los diferentes tipos de hongos y aislamientos particulares, normalmente son necesarios valores de humedad relativa superiores al 90% y rangos de temperatura óptimos entre 23 y 30°C (Godoy *et al.*, 2007).

La germinación del conidio se ve estimulado por la presencia de diferentes fuentes de carbono como glucosa, *N*-acetilglucosamina, lanolina y algunos ácidos grasos de cadena largos (Smith y Grula, 1981), viéndose limitada por la presencia de compuestos fúngicos como fenoles y quinonas (Zimmermann, 2007). De igual forma, la temperatura corporal del hospedero, influye de manera importante en el proceso germinativo del conidio. Esto quedó demostrado en el caso particular de los acrídidos, que presentan capacidades termo-reguladoras, que emplean durante determinados momentos del día, y los cuales limitan el efecto de los hongos (Douglas *et al*, 1996). De manera más reciente se tienen reportes sobre el impacto que puede llegar a tener la microbiota presente en la superficie cuticular de algunos insectos (Toledo *et al.*, 2010).

La germinación del conidio inicia con la formación de un tubo germinativo, el cual responde a sitios receptores superficiales como aminoácidos libres y péptidos, que disparan

el proceso de penetración de la cutícula del insecto. En determinadas especies de hongos y atendiendo la química, topografía e hidrofobicidad de la cutícula, se forma una estructura especializada en la parte apical del tubo germinativo, denominada apresorio, el cual proporciona un anclaje a la superficie del insecto y un incremento en la fuerza mecánica al momento de que una hifa de penetración comienza la invasión al insecto (Hajek *et al.*, 2002).

La penetración en el cuerpo del insecto está acompañado por la excreción de una variedad de enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas, lipasas, amilasas y superóxido, que permiten la degradación de los tejidos de los insectos y sus partes quitinosas, facilitándose con ello el acceso a la hifa de penetración y a su vez le permite al hongo obtener nutrientes de los productos de la degradación enzimática (Nahar *et al.*, 2004; Mustafa y Kaur, 2009; Beys-da-Silva *et al.*, 2010).

2.5.3 Fase de invasión y muerte

Una vez dentro del insecto y de acuerdo con el tipo de hongo, existe la proliferación en forma de cuerpos hifales secundarios, blastosporas o protoplastos (células carentes de pared celular) los cuales se distribuyen a través del hemocele, invadiendo tejido muscular, cuerpos grasos, mitocondrias, hepatocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear. La muerte del insecto se produce a causa de la extravasación de fluidos, la desnutrición del insecto, por efecto de la alimentación del hongo, y de manera alternativa, por la producción de toxinas (Hajek y St. Leger, 1994).

La muerte puede sobrevenir en lapsos variables, dependiendo del insecto hospedero. Mientras que en áfidos se han reportado tiempos de 3 a 4 días, en larvas de escarabajos el tiempo es de 2 a 4 semanas. A pesar de la variabilidad en la mortalidad de los insectos, comparten síntomas de la infección como disminución de tamaño, de peso, problemas en la fecundidad melanizaciones y uno de los más importantes; la pérdida de apetito, el cual asegura que aunque el insecto siga vivo en el cultivo, no genera daños al mismo (Quesada-Morada *et al.*, 2006; Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010).

2.5.4 Fase de esporulación

Tras la muerte del insecto, y una vez agotado los recursos nutritivos, desde el interior del hospedero emergen hifas que producen células conidiógenas productoras de conidios, esto siempre y cuando existan condiciones de humedad elevada, de lo contrario el hongo permanecerá dentro del cadáver del insecto, en forma de spora (clamidiospora), hasta que existan las condiciones ambientales adecuadas.

Los conidios que se generan en los cadáveres de los insectos pueden ser dispersados por el viento, arrastradas al suelo o son transmitidas a nuevos hospederos susceptibles (Aylor, 1990; Bruck y Lewis, 2002)

2.6 Metabolitos en HEP

Para asegurar la infección e invasión del insecto hospedero *B. bassiana*, y el resto de los HEP, se auxilian de metabolitos tales como enzimas degradadoras de cutícula (EDC), para lograr penetrar la cutícula del insecto, y de toxinas que deprimen o evaden la respuesta inmunológica del hospedero, facilitando su invasión.

2.6.1 Enzimas quitinolíticas

La cutícula (exoesqueleto) de los insectos es una cubierta externa la cual cubre el cuerpo del insecto conformada principalmente por quitina embebida en una matriz proteica, con polifenoles y pequeñas cantidades de lípidos (Vincent y Wegts, 2004). La quitina, un homopolímero conformada por unidades de *N*-acetilglucosamina, representa del 15 al 30% del peso seco en las partes más rígidas de un insecto, mientras que en las secciones “suaves” se tiene porcentajes menores al 13% (St. Leger *et al.*, 1986b; Vincent y Wegts, 2004). Por su parte las exuvias, producto de la ecdisis del insecto, presentan más del 40% del peso seco en quitina. Las características estructurales hacen de la cutícula una cubierta físicamente fuerte. Esta proporciona una buena protección al daño mecánico, representando la primera barrera que debe de superar un HEP para poder invadir a su hospedero.

B. bassiana al igual que otros grupos de HEP, secretan quitinasas a través de la hifa de penetración. Dichas enzimas hidrolizan las uniones β -(1,4) de la quitina, produciendo predominantemente *N,N'*-diacetilquitobiosa, la cual es posteriormente degradada por

quitobiosa al monómero *N*-acetilglucosamina (Nahar *et al.*, 2004, Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009). De manera general se describen en la literatura dos principales quitinasas secretadas por los HEP: exo- y endo-quitinasas, cuya diferencia estriba en el sitio de hidrólisis del polímero, ubicados en sitios terminales no reductores y en puntos intermedios de las cadenas del biopolímero respectivamente (Arakane y Muthukrishnan, 2009). Dichas enzimas presentan diversas isoformas, característica que, se cree, puede estar relacionada con la propia diversidad de hospederos que llega a tener un HEP, no secretando la misma isoforma de quitinasa en diferentes insectos (St. Leger *et al.*, 1993).

En *B. bassiana* se han descrito dos quitinasas: la Bbchit1 con un peso molecular de 33 kDa y un punto isoeléctrico de 5.4; y Bbchit2 (Fan *et al.*, 2007). La actividad quitinasa de Bbchit1 ha sido potenciada mediante ensayos de mutagénesis inducida con rayos UV e ingeniería genética (Fan *et al.*, 2007; Fang *et al.* 2005, 2009; Vasseur *et al.*, 1990), evaluándose los conidios contra *B. mori* L. y áfidos, donde se ha demostrado el incremento en los porcentajes de mortalidad y disminución en los tiempos letales medios, denotando así la importancia de dicha enzima como factor de virulencia de los HEP.

2.6.2 Enzimas proteolíticas

Aunque es variable entre los diferentes insectos, aproximadamente del 55 al 80% de la cutícula de los insectos está constituida por proteínas, algunas de las cuales se encuentran ligadas a la quitina (Qazi y Khachatourians, 2008).

Los HEP disponen de peptidasas, enzimas extracelulares con actividad proteolítica, que además de proporcionar una fuente de nitrógeno al degradar las proteínas cuticulares del insecto, permiten al hongo abrirse paso a través del cuerpo del insecto hasta el hemocele. La producción de dichas enzimas es determinante en la capacidad infectiva de los HEP.

De acuerdo a la naturaleza de los grupos funcionales en el centro activo de la enzima, las peptidasas están divididas en 6 clases: serina, cisteína, treonina, aspártico, glutámico y metalo peptidasas. Las enzimas proteolíticas extracelulares de los HEP se encuentran agrupadas dentro de las serina peptidasas (anteriormente denominada como quimoelastasa), que a su vez presentan dos familias: la de subtilisina y quimotripsina (Dubovenko *et al.*, 2010).

En la literatura de los HEP se resaltan dos principales proteasas, producidas por varios géneros de hongos: la Pr1 y la Pr2. La primera corresponde a una serina peptidasa y la segunda es una tripsina peptidasa. Aunque ambas son igualmente descritas como factores de patogenicidad, es la Pr1 la que presenta mayor efectividad en la degradación proteica (St. Leger *et al.*, 1987).

2.6.2.1 *Serina peptidasa Pr1*

La proteasa Pr1 de la familia de las subtilisinas, es una enzima alcalina, de una masa molecular de 28.6 kDa (St. Leger *et al.*, 1992). Presenta una actividad específica primaria sobre aminoácidos ácidos con un grupo hidrofóbico en el segundo átomo de carbono. Así también existe una actividad específica secundaria sobre cadenas peptídicas de tipo hidrófobas (Charnley, 2003).

En *M. anisopliae*, se han identificado 3 isoformas de Pr1 con pI's de 10.2, 9.8, y 9.3, las cuales presentan una actividad específica primaria similar y aparentemente todas son efectivas en la degradación de proteínas de la cutícula de insectos (St. Leger *et al.*, 1994). En el mismo hongo se han encontrado 11 genes de la proteasa Pr1, en donde la represión de uno de ellos no afecta la actividad patogénica del hongo (Bye y Charnley, 2008).

La producción y participación en el proceso invasivo de insectos de esta proteasas están documentados en trabajos como los de St. Leger *et al.* (1986a) en donde se extrajo la Pr1 de la cutícula abdominal de larvas de *Manduca sexta* L., inoculadas con *M. anisopliae*, y demostró mediante técnicas de *immunogold* que la proteasa es secretada por la hifa de penetración y por el apresorio.

Aunque se reconoce que Pr1 forma parte de una batería de enzimas proteolíticas que actúan en conjunto para poder ayudar en la invasión del insecto huésped, hay evidencia que demuestra que la inhibición de dicha enzima disminuye la capacidad invasiva de los HEP, reduciendo con ello la capacidad infectiva de los mismos (Charnley, 2003). Por el contrario, mediante ingeniería genética, se ha sobre-expresado Pr1 en cepas de *M. anisopliae* resultando en el incremento de la virulencia de éste (Fang *et al.*, 2009; St. Leger *et al.*, 1996). Con esto se demostró que aunque no es la única enzima proteolítica producida por los HEP, su actividad es determinante en la infección de los insectos.

2.6.2.2 *Tripsina peptidasa Pr2*

En lo que respecta a la proteasa Pr2 se conoce poco de su participación dentro de la patogenicidad de los HEP, aunque los investigadores asumen que se trata de una proteasa que complementa a la actividad de otras (St. Leger *et al.*, 1998). Así también se le ha atribuido el rol de ser un inductor o activador de la Pr1, a raíz de que se ha detectado su presencia antes de que ésta se produzca (da-Silva-Pinto *et al.*, 2002).

2.7 Relación entre actividad insecticida y medio de cultivo

Una de las propiedades más importantes a considerar en el empleo de un HEP, es la posibilidad de potenciar su virulencia frente algún insecto blanco. Se ha reportado en algunos trabajos, cómo la virulencia de un aislamiento de un HEP cambia cuando es cultivado en diferentes tipos de sustratos (Gallegos *et al.*, 2002; Camacho-Hernández *et al.*, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2008). Los ingredientes, y la relación de C y N que estos proporcionan en el medio de cultivo, son características asociadas tanto con la virulencia de los hongos (Lane *et al.*, 1991) como con la producción de EDC (Gupta *et al.*, 1994), razón por lo que se ha sugerido a estas últimas como parámetros indicativos de efectividad insecticida. Enzimas como las proteasas (Shah *et al.*, 2005; Safavi *et al.*, 2007; Montesinos-Matías *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010), quitinasas (Enrique-Vara *et al.*, 2008) y lipasas (España *et al.*, 2000) se han relacionado con la actividad insecticida de los HEP.

El efecto del sustrato sobre los HEP se ha explicado sugiriendo que durante la formación de los conidios, las EDC quedan en la pared celular, en niveles que se correlacionan con la cantidad de transcrito en la célula, de tal forma que la inducción de las EDC empleando diferentes sustratos genera niveles más elevados de enzimas en la pared celular de los conidios (Shah *et al.*, 2005; Safavi *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). Esto favorece que al momento de germinar secreten enzimas en mayor cantidad, facilitando así la infección del insecto.

Se sabe que ciertos sustratos y las proporciones de los mismos empleados en los medios de desarrollo de los HEP inducen o reprimen la producción de algunas EDC y toxinas. Dichos sustratos se han empleado principalmente para estudiar la relación

hospedero-patógeno y poder comprender mejor la dinámica de infección de los hongos al entrar en contacto con el insecto.

2.7.1 Medio de cultivo y producción de enzimas quitinolíticas

Las quitinasas son enzimas constitutivas de los hongos que participan en la modificación de la morfogénesis, autólisis y modulación del crecimiento de la pared celular (Leopold y **Samšičáková**, 1970; Carillo-Rayas *et al.*, 2009). Así mismo, existe evidencia de que en los HEP se puede inducir la producción y liberación de quitinasas en medios de cultivo sólidos o líquidos suplementados con quitina coloidal (Smith y Gula, 1983; Havukkala *et al.*, 1993), y con cutículas de insectos (St. Leger *et al.*, 1986a; Gupta *et al.*, 1992). Por el lado contrario, se reporta el efecto represor por compuestos de fácil asimilación como la glucosa y el *N*-acetilglucosamina (Ulhoa y Peberdy, 1991).

El pH del medio de cultivo también se ha considerado en algunos trabajos como factor importante en la producción de quitinasas, reportándose un rango entre 3 a 9 (Gabriel, 1968), con valores óptimos variables, atendiendo al tipo de hongo que se evalúe; aunque los pH superiores a 6, promueven la mayor producción de enzima (Gabriel, 1968; Ulhoa y Peberdy, 1991).

La actividad de las enzimas quitinolíticas puede detectarse en los medios de cultivo en menos de 24 hrs, aunque sus niveles máximos de actividad se detectan en los tiempos próximos a la esporulación (Coudron *et al.*, 1984). En cepas de *Aphanocladium album* su actividad enzimática máxima se reporta a las 20 h; en *Trichoderma harzianum* a las 36 h y para cepas de *B. bassiana*, su mayor actividad se presenta entre los 4 y 5 días de cultivo (St. Leger *et al.*, 1986b; Ulhoa y Peberdy, 1991; Vasseur *et al.*, 1990; Leopold y **Samšičáková**, 1970).

2.7.2 Medio de cultivo y producción de enzimas peptidasas

Existen una gran variedad de trabajos que describen la producción de las peptidasas Pr1 y Pr2 por parte de los HEP en medios de cultivo enriquecidos con diversas fuentes de carbono y nitrógeno. Inclusive, en medio mínimo mineral (carente de las mencionadas fuentes energéticas), donde los hongos se someten a un estrés nutricional, es posible medir la presencia de las mencionadas enzimas (St. Leger *et al.*, 1991; Bye y Charnley 2008;

Dhar y Kaur, 2010), a pesar de que no se existe desarrollo fúngico considerable (Paterson *et al.*, 1994).

Se sabe que la producción de las proteasa se reprime por efecto de glucosa, *N*-acetilglucosamina y alanina (St. Leger *et al.*, 1988). Por el contrario, se induce por efecto de algunos componentes peptídicos de la cutícula de insectos, de aquí que ésta se emplee como ingrediente en los medios de cultivo líquidos de los hongos. Se ha reportado que algunos aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobreproducen Pr1 y Pr2 al cultivarlos en medios líquidos enriquecidos con cutícula de insectos en comparación con medios de propagación simple como el Agar Papa-Dextrosa o el Agar Dextrosa Sabouraud (Pathan *et al.*, 2007).

De igual forma existen reportes en donde ingrediente de uso común en los medios de cultivo promueven la producción de las proteasas en los HEP, tal es el caso del extracto de levadura, de la gelatina bacteriológica y la peptona (Bidochka y Khachatourians, 1988; Nahar *et al.*, 2004; Safavi *et al.*, 2007).

El pH es un factor fisicoquímico determinante en la regulación de la expresión génica de las proteasas Pr1 y Pr2, especialmente a pH de 8 (Padmavathi *et al.*, 2003). También se ha reportad que la actividad proteasa debe ser previa a la de las enzimas quitinasas esto con el fin de liberar a la quitina de la matriz proteica en la cual se encuentra embebida, por lo que los HEP se ven obligados a generar un ambiente alcalino en la superficie del insecto, cuyo pH ronda entre 6.3 a 7.7, dependiendo del insecto; y así poder favorecer la actividad de las proteasas (Charnley, 2003).

2.8 Cultivo de Frijol

El frijol, *Phaseolus vulgaris* L., es una leguminosa distribuida en los 5 continentes, ampliamente cultivada en zonas tropicales y templadas, formando parte de la alimentación básica en muchos países. Es una herbácea que alcanza de 50 a 70 cm de altura con una raíz principal pivotante y muchas y muy ramificadas raíces secundarias cercanas a la superficie. Consiente un rango de temperatura y pH del suelo bastante considerable, 10-27°C y 4.5-7.5, respectivamente. No obstante, es muy susceptible a condiciones extremas, como las hídricas, por lo que su cultivo requiere de suelos con textura ligera y bien drenada (SAGARPA, 2011).

Al cierre del 2010 la producción en México fue de 1,156, 257 toneladas con una derrama económica de 10, 160, 259 (miles de pesos). Aunque en prácticamente todos los estados del país se cultiva frijol, los que destacan por su mayor producción anual son: Zacatecas, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Nayarit, Chiapas, Guanajuato, San Luis Potosí, Puebla e Hidalgo (SIAP, 2011).

No obstante las proyecciones de producciones anuales, las toneladas de frijol cosechado son notablemente menores a las sembradas. Las pérdidas ocasionadas se atribuyen a diversos factores tanto abióticos como bióticos. En éste último, figuran organismos fitopatógenos como los hongos *Colletotrichum lindemuthianum* y *Uromyces phaseoli* causantes de la antracnosis y la roya del frijol, respectivamente. Así también, se considera a los insectos que merman la producción al consumir parcial o totalmente la planta y al ser potenciales vectores de fitopatógenos. Resaltan las plagas de la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y *Bemisia tabaci* Gennadius, ésta última, transmisora de begomovirus, causante del mosaico dorado; el picudo del frijol *Apion godmani* Wagner y la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Mulsant (CESAVEG, 2011).

2.9 Conchuela del Frijol *Epilachna varivestis*

La conchuela del frijol es un escarabajo cuya descripción taxonómica se presenta en la tabla 2. Es originaria de México y América Central, pero en la actualidad se encuentra distribuida desde Canadá hasta Centroamérica, con reportes actuales de su presencia en Japón (Nakamura y Shiratori, 2010). En México se distribuye, principalmente, en las regiones templadas del país como Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas (García-Gutiérrez y Carrillo-Sánchez, 2008).

La conchuela puede presentar una o dos generaciones por año en las zonas productoras de frijol del centro de México (Pinto *et al.*, 2002). El mayor daño económico lo produce durante los meses de Julio a Septiembre que coincide las etapas de desarrollo vegetativo, floración y llenado de vaina del cultivo.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la conchuela del frijol

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Coleoptera
Familia	Coccinellidae
Subfamilia	Epilachninae
Género	<i>Epilachna</i>
Especie	<i>varivestis</i>

Se considera que una defoliación de la planta de frijol, en etapa vegetativa, superior al 80%, y del 20 % en su etapa de floración y llenado de la vaina, disminuye de manera importante su rendimiento (Fan *et al.*, 1993; Schaafsma y Ablett, 1994). Las larvas y adultos se alimentan de las hojas de la planta, confiriéndole un estado esqueletizado. En situaciones donde el alimento escasea, puede consumir el tallo y el fruto.

2.9.1 Ciclo biológico

La conchuela del frijol, presenta una metamorfosis completa la cual pasa por los estados biológicos: huevo, larva (con 4 estadios), pupa y adulto (Figura 2).



Figura 2. Ciclo Biológico de *E. varivastis*. a) Huevos en cúmulo, b) larva del primer estadio, c) larva del segundo estadio, d) larva del tercer estadio, e) larva del cuarto estadio, f) pupa, g) adulto.

Los adultos invernan en forraje y la hojarasca, emergiendo tan pronto las temperaturas se vuelven cálidas, momento en el que buscan las plantas hospederas, en donde se aparean y las hembras colocan sus huevecillos en el envés de las hojas por

cúmulos de 40 a 70, llegando depositar entre 500 a 600 huevos durante toda su vida (Sánchez-Arroyo, 2007).

La eclosión de la larva se presenta después de una semana, pudiendo alargarse a dos, atendiendo a las condiciones de temperatura ambiental. Las larvas se alimentan, aproximadamente durante 2 semanas, presentando durante los primeros días un comportamiento gregario y el cual desaparece conforme crece, presentándose nuevamente al momento previo a la pupación. Las larvas del cuarto estadio, se fijan a las hojas de la planta hospedera mediante un órgano similar a una ventosa, quedando suspendidas y en estado sésil durante 10 días, tiempo después del cual emerge un adulto que puede volar grandes distancias para poder encontrar una nueva planta hospedadora (Sánchez-Arroyo, 2007).

2.9.1.1 *Huevo*

Son de color amarillo al momento de ser puestos por la hembra, adquiriendo un color anaranjado conforme el transcurso de los días. Miden aproximadamente 1.3 mm de largo por 0.6 de ancho (Sánchez-Arroyo, 2007).

2.9.1.2 *Larva*

Las larvas de *E. varivestis* son de color amarillo y en su dorso presenta 6 hileras de espinas (escolos), de base amarilla y ápice negro. Las larvas recién eclosionadas son pequeñas, de aproximadamente 1.6 mm de longitud, alcanzando en el cuarto estadio un tamaño de 6 a 9 mm. Presenta 4 estadios, después de los cuales las espinas de su cuerpo se tornan negras, adquiriendo posteriormente su color amarillo. Debido a su voracidad, representa el estadio más perjudicial para las plantas, alimentándose de las hojas, tallos y de forma ocasional de las flores y vainas pequeñas (Sánchez-Arroyo, 2007).

2.9.1.3 *Pupa*

Son de color amarillo de aproximadamente del mismo tamaño que el adulto, entre 6 a 7 mm. Se encuentra desprovista de espinas y suspendida en el envés de las hojas por su parte posterior, con un residuo cónico característico de su última muda (Sánchez-Arroyo, 2007).

2.9.1.4 Adultos

Los adultos recién emergidos son de color amarillo, pero al poco tiempo adquieren el color café cobrizo característico. Miden aproximadamente 6 y 7 mm de longitud. Salvo algunas excepciones, presentan 8 manchas oscuras en cada uno de sus élitros, dispuestas en tres hileras (3, 3, 2) de manera transversal al cuerpo. Los machos son un poco más pequeños que las hembras (Bautista, 2006; Sánchez-Arroyo, 2007).

2.9.2 Control biológico de *E. varivestis*

En el control biológico de la conchuela del frijol, el empleo de avispas parasitoides como *Apomyiopsis epilachnae* Aldrich y *Pediobius foveolatus* Crawford, han sido con las que se ha reportado el mayor éxito. Su introducción en México comenzó en los años 70's, sin embargo, se encontró variabilidad en los niveles de parasitismo en los lugares donde se llevó a cabo la liberación. Con la aplicación en el Campo Agrícola de Chapingo, en el estado de México, se llegó a tener niveles de parasitismos de entre 0 al 71.2% y del 8.3 al 10.1%, para *A. epilachnae* y *P. foveolatus*, respectivamente. Por otra parte, por la liberación de parasitoides en San Andrés Chiautla, Texcoco; se obtuvieron porcentajes de parasitismo del 13.3% al 80% para *A. epilachnae* y de 6.1 a 23% para *P. foveolatus* (Carrillo-Sánchez, 1976).

En los años 80's se introdujo y se reprodujo una cepa de *P. foveolatus* de origen japonés, con la cual se alcanzaron niveles de parasitismo del 25 al 30%, proporciones superiores a las obtenidas con la cepa empleada en los 70's, que era de origen indio (Carrillo-Sánchez *et al.*, 1990).

Además de las avispas, para el control de la conchuela del frijol se han evaluado HEP como *B. bassiana*. Trabajos como los de Quattlebaum y Carner (1980) sobre larvas de tercer instar de *E. varivestis*, describen que empleando suspensiones de 4×10^6 a 4×10^8 conidios por mililitro del hongo *B. bassiana*, obteniéndose mortalidades que van del 86 al 97%. Por otra parte García-Gutiérrez *et al.* (1999) evaluaron la actividad insecticida de 10 aislamientos de *B. bassiana* sobre larvas de uno a tres días de edad a dosis de 1.23×10^7 a 1.27×10^7 conidios por mililitro, encontrando mortalidades desde 66 a 97%. Este mismo grupo de trabajo, realizó ensayos con blastosporas de *B. bassiana* microencapsuladas sobre

larvas de primer instar, alcanzando mortalidades entre el 40 y 70% (García-Gutiérrez *et al.*, 2002).

De manera más reciente Ocampo-Hernández *et al.* (2011) evaluaron la actividad insecticida de los conidios de dos aislamientos *B. bassiana* sobre larvas de tercer estadio y adultos de 5 días de edad de la conchuela del frijol. Ellos reportaron concentraciones letales 50 máximas a dosis de 3.13×10^6 y 1.16×10^7 conidios por mililitro, para larvas y adultos, respectivamente.

Behle *et al.* (2006) describieron las diferencias en la actividad insecticida generada por blastosporas y conidios de *Paecilomyces fumosoroseus* Wise sobre larvas de tres días de desarrollo de *E. varivestis*, con mortalidades entre el 86 al 90%.

Tamez-Guerra *et al.* (1999) realizaron ensayos con la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner formulado en base de harina nixtamalizado, almidón de maíz , azúcar y aceite de maíz, obteniendo mortalidades del 33%, mientras que una formulación a base de lignina generó un 73% de mortalidad contra larvas de conchuela.

3. HIPÓTESIS

La potenciación de la producción de metabolitos implicados en el proceso infeccioso de *B. bassiana*, mediante medios de cultivo con fuentes de carbono y nitrógeno selectivas, mejoran su efectividad en el biocontrol de larvas de *E. varivestis*.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Potenciar la producción de metabolitos de dos aislamientos monoespóricos de *Beauveria bassiana*, mediante la selección de medios de cultivo, para incrementar su actividad en el biocontrol de las larvas de la conchuela del frijol, *E. varivestis*.

4.2 PARTICULARES

4.2.1 Desarrollar los aislamientos seleccionados de *B. bassiana* en medio de cultivo mínimo suplementado con dos diferentes fuentes de carbono: quitina coloidal y exuvias de lepidóptero; y 2 de nitrógeno: peptona y semilla de algodón para potenciar la producción de las enzimas degradadoras de la cutícula Pr1 y quitinasa NAGasa (β -N-acetil-glucosamidasa).

4.2.2 Determinar la producción de las enzimas Pr1 y NAGasa mediante la medición de su actividad empleando técnicas espectrofotométricas.

4.2.3 Confirmar que el medio que presentó la mayor producción de enzimas, por parte de los aislamientos fúngicos, potenció su virulencia contra larvas del tercer estadio de *E. varivestis*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Procedencia y mantenimiento de la cría de *E. varivestis*

La cría empleada en los experimentos se implementó a partir de adultos de *E. varivestis* colectados en los campos de frijol del municipio de Ocampo Guanajuato. La estrategia para mantener la población fue la siguiente.

Los adultos se colocaron en plantas de frijol de aproximadamente de una semana y media de germinadas en jaulas de pabalo, a 25°C, fotoperiodo de 12:12 h (luz-oscuridad) y una humedad relativa (HR) del 60% (Figura 3). Diariamente se revisaron los enveses de las hojas de la planta de frijol en la búsqueda de cúmulos de huevecillos. Se recortaron las partes de la hoja con los huevecillos y se colocaron en cajas de Petri con un trozo de algodón húmedo. Durante el transcurso de 5 a 7 d se inspeccionaron visualmente las cajas en busca de larvas emergidas, las cuales se colocaron, en grupos de 10, sobre hojas de frijol y éstas a su vez se colocaron en un vasito de plástico para muestras de heces fecales de 125 mL de 3 piezas (PROQUIMH San Nicolás de los Garza, NL, MX.) adaptados para este estudio (Figura 4). Se dejaron las larvas en los frascos, cambiando la hoja de frijol diariamente hasta que las larvas alcanzaron el tercer estadio (aproximadamente 6 d), tiempo después del cual se traspasaron a las plantas de frijol dentro de las jaulas de pabalo.

Después de 22 d aproximadamente, se inspeccionaron las jaulas de las larvas en busca de pupas, las cuales se colocaron en cajas Petri durante 9 a 12 d, hasta que emergieron los adultos. Estos se transportaron a las jaulas en donde se encontraban el resto de los adultos.



Figura 3. Jaulas de pabalo empleadas para la cría de larvas y adultos de *E. varivestis*.



Figura 4. Vasitos de plástico de 125 mL de 3 piezas para muestras de heces fecales, adaptados para la cría de insectos y ensayos de actividad

5.2 Procedencia y reactivación del aislamiento fúngicos

Se emplearon dos aislamientos monoespóricos de *B. bassiana*, denominadas Bb37 y Bb40 (Tabla 3). Estos los proporcionó el Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos del Centro de Sanidad Vegetal del estado de Guanajuato (CESAVEG).

Tabla 3. Origen de los aislamiento de *Beauveria bassiana* empleadas en el estudio.

Aislamiento	Hospedero de origen	Origen Geográfico
Bb37	<i>Melanoplus differentialis</i> (Thomas)	Apaseo el Alto, Gto
Bb40	<i>Phylophaga</i> spp.	Huanímaro, Gto

Datos obtenidos de Ocampo-Hernández, 2011

Los aislamientos procedieron de stocks de sílica gel a -20°C. Se reactivaron en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA), las cuales se dejaron incubando a 25°C, en oscuridad durante 10 d o hasta que fuese visible la esporulación del hongo.

5.2.1 Conteo de propágulos

Durante el trabajo experimental se realizaron determinaciones de las concentraciones de los propágulos (conidios o blastosporas) tanto para inocular medios de cultivo como para realizar bioensayos. En todos los casos, se partió de tomar 1-mL de una solución madre del propágulo y se mezcló en un tubo con 9 mL de Tween 20 al 0.1%, para obtener una dilución 1:10; se agitó el tubo en un Vortex durante 5 min, para después repetir el procedimiento con esa dilución y obtener una que fuera 1:100. En caso de ser necesario, se realizó una dilución 1:1000 empleando el mismo procedimiento.

Todas las diluciones a evaluar se agitaron durante 5 min en Vortex, se tomaron 10 µL de muestra y se colocaron en una cámara de Neubauer. Se dejó reposar la muestra por un minuto aproximadamente, para después observar al microscopio con el objetivo 40X. Se contaron los propágulos de 5 cuadros de la cuadrícula central de la cámara (Figura 5).

Los conteos se realizaron por triplicado calculando la concentración de propágulos con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (Propágulos/mL)} = \frac{\text{Propágulos contados} * \text{Factor de dilucion} * 1000}{0.02}$$

5.2.2 Porcentaje de germinación de propágulos

Durante el trabajo se aseguró que cada una de los inóculos tuviera la concentración indicada de propágulos viables. Para ello, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 10 μL de la solución concentrada del propágulo y se agregaron 990 μL de tween 20 al 0.1%. El tubo se agitó en Vortex durante 5 min, se tomaron 5 μL de la suspensión y se inocularon sobre un trozo de PDA colocado en un portaobjetos estéril; después se cubrió el agar con el inóculo con un cubreobjetos, igualmente estéril. Se incubó el portaobjetos en una cámara húmeda a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 16 h para esporas y por 12 h para blastosporas. Después de la incubación, se observó el trozo de PDA al microscopio con objetivo 40X y se determinó el porcentaje de propágulos viables, evaluando 100 estructuras. Se consideraron viables aquellos propágulos que presentaran un tubo germinativo de una longitud mayor a la mitad del tamaño de los mismos (Wraight *et al.*, 2007), registrando los datos de aquellos que fueran viables y los que no lo fueran. Cada conteo se realizó por duplicado.

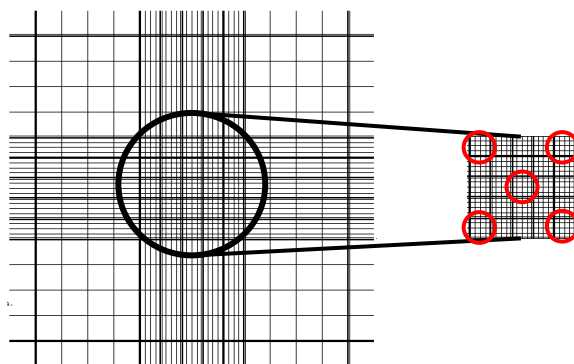


Figura 5. Sitio de conteo en la cámara de Neubauer

5.3 Selección de medios de cultivo

Para cumplir el objetivo de potenciar la producción de enzimas se evaluaron 7 medios de cultivo, los cuales se prepararon utilizando como base un medio mineral mínimo (MM) (Tabla 4).

Tabla 4. Medios de cultivo líquidos empleados para el crecimiento de los aislamientos de *B. bassiana*

Medio Base*	Fuente de Carbono (% m/v)	Fuente de Nitrógeno (% m/v)	Radio C:N	Clave
MM	Quitina coloidal (1%)	-----	6.5:1	C ₁
MM	Quitina coloidal (1%)	Peptona (0.5%)	7.3:1	C ₁ N ₁
MM	Quitina coloidal (1%)	Semilla de algodón (0.5%)	7.3:1	C ₁ N ₂
MM	Exuvias de Lepidóptero (0.5%)	-----	5:1	C ₂
MM	Exuvias de Lepidóptero (0.5%)	-----	9:1	C ₂ N ₁
MM	Exuvias de Lepidóptero (0.5%)	Peptona (0.5%)	8.2:1	C ₂ N ₂
MM	Lepidóptero (0.5%)	Semilla de algodón (0.5%)		

* KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄ 1 mg, ZnSO₄ 1 mg, Agua destilada 1 L

Los componentes empleados (exceptuando la semilla de algodón) se seleccionaron en base a que habían sido reportados en la literatura como potenciadores de la producción de metabolitos en cepas de hongos (Liu *et al.*, 2000; Nahar *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Safavi *et al.*, 2007; Rangel *et al.*, 2008; Hutwimmer *et al.*, 2010; Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). Se empleó el caldo dextrosa Sabouraud (CDS) como cultivo de referencia, para comparar los niveles de enzimas producidos por los aislamientos.

5.3.1 Cultivo de los hongos y toma de muestras

Los hongos se cultivaron en 150 mL de los medios ya indicados, en matraces de 250 mL. Cada matraz se inoculó con una cantidad de esporas viables de tal forma que la concentración final en el medio fuera de 1X10⁶ conidios por mL. Los matraces se agitaron a 180 rpm durante 5 días a temperatura de 25°C (±2). Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Cada 24 h se tomaron 10 mL del cultivo líquido en tubos de plástico de 15 mL y se centrifugaron a 7,000 rpm a 4°C durante 20 min. Posteriormente, el sobrenadante se filtró empleando papel Whatman #1. El filtrado se consideró como el extracto enzimático, del cual se colocaron alícuotas en tubos Eppendorf de 1.7 mL y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

5.4 Medición de la actividad de la proteasa Pr1

Para determinar la actividad de Pr1 se empleó el sustrato succinil-(alanina)₂-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilina (SAPFNA) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1mM (Montesinos-Matias *et al*, 2008). Para lograrlo, en una placa de 96 pozos se colocaron 20 µL del extracto enzimático, 170 µL de buffer Tris-HCl (pH 8) y 10 µL de sustrato por pozo. La reacción se dejó incubando a 25°C durante 5 min para después leer la absorbancia en un lector de micro placas (BIORAD® 550 Microplate Reader) a 405 nm. Se determinó la concentración de nitroanilina liberado mediante una curva de calibración de *p*-nitroanilina comercial (Sigma-Aldrich) (Anexo 3). La actividad enzimática se reportó como unidades (U) por mililitro de extracto enzimático, donde una unidad de enzima corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de nitroanilina por minuto bajo las condiciones de ensayo. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.4.1 Zimograma

Con la finalidad de confirmar que la actividad proteasa medida fue precisamente debida a Pr1, se desarrolló un zimograma siguiendo el siguiente procedimiento:

Se seleccionaron sólo algunas de las muestras que mostraron mayor producción de nitroanilina en el procedimiento anteriormente descrito. Un volumen de 20 µL del extracto enzimático se mezcló con 20 µL de buffer de lisis (20% glicerol, 40% SDS, 25% Buffer Tris-HCl 1M pH 6,8 y 2 % azul de bromofenol). De la mezcla se tomaron 20 µL y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12 % a 40 mA en recirculación de agua a 1°C, hasta observar que el azul de bromofenol migró hasta la base del gel. Se empleó el marcador de masa molecular Precision Plus Protein^{MR} (Kaleidoscope Standars #161-0375) de BIORAD.

El gel se lavó con buffer Tris-HCl 50 mM (pH8), durante 5 min y después se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa impregnada con una mezcla de 1 mL buffer Tris-HCl y 59 μ L del sustrato SAPFNA. El gel y la membrana se incubaron a 37°C por una hora y media aproximadamente.

La membrana se lavó con 3 soluciones: nitrato de sodio (0.5% en HCl 1M), sulfamato de amonio (0.5% en HCl 1M) y N-(1-naftil)-etilendiamina (0.05% en etanol al 47.5%) (Vinokurov *et al.*, 2005) durante 5 min cada una. Inmediatamente después de la aparición de bandas de color rosa sobre la membrana de nitrocelulosa, ésta se envolvió en una bolsa de plástico y se guardó a -20°C.

5.5 Medición de la actividad de la quitinasa β -N-acetil-glucosamidasa (NAGasa)

Para determinar la actividad de la NAGasa se empleó el sustrato *p*-nitrofenil- β -N-acetil glucosamina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/mL (Montesinos-Matias *et al.*, 2008). Las reacciones se realizaron en placas de 96 pozos. En cada pozo se mezclaron 20 μ L de extracto enzimático, 140 μ L de buffer de citratos-fosfato (pH 4.8) y 40 μ L de sustrato enzimático. La reacción se dejó incubando a 37°C durante 10 m, tiempo después del cual se leyó la absorbancia en un lector de micro placas (BIORAD® 550 Microplate Reader) a 405 nm. Se determinó la concentración de nitrofenol liberado dividiendo la absorbancia obtenida entre el factor 11,934 M⁻¹. La actividad enzimática se reportó como unidades (U) por mililitro de extracto enzimático, donde una unidad de enzima corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.6 Determinación de la actividad insecticida

Se determinó la actividad insecticida de las blastosporas de los aislamientos desarrolladas en aquel medio de cultivo que promovió la mayor actividad de Pr1 y quitinasa. De igual manera se evaluaron las blastosporas propagadas en el medio CDS para fines comparativos.

5.6.1 Preparación de los tratamientos

Los medios de cultivo propagados con los aislamientos de *B. bassiana* se dejaron en agitación (180 rpm) durante 3 días, tiempo después del cual se filtraron a través de una capa de gasa estéril, a fin de retirar el micelio que pudiese estar presente. El volumen filtrado se separó en 2 tubos de 50 mL. Al contenido de uno de los tubos (suspensión madre) se le realizó conteo y prueba de viabilidad de blastosporas. El segundo tubo se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 20 min. El sobrenadante se filtró empleando un filtro de 0.22 µL (solución filtrada).

A partir de la suspensión madre se prepararon 5 concentraciones de blastosporas entre el rango de 1×10^5 y 1×10^8 blastosporas/mL. Se ajustaron las concentraciones empleando la solución filtrada.

Como control negativo se empleó el filtrado del medio de cultivo correspondiente sin haber sido inoculado con alguno de los hongos.

5.6.2 Bioensayos

Se emplearon larvas de *E. varivestis* de tercer estadio temprano (aproximadamente 6 d de edad), las cuales se desinfectaron lavándolas con hipoclorito de sodio al 0.1%, enjuagándolas dos veces con agua destilada y dejándolas secar por 20 min.

Los bioensayos se realizaron utilizando el método de inmersión (Posada y Vega, 2005b). Las larvas se colocaron en vasos desechables limpios por grupos de 10 insectos. Al vaso se le agregaron 5 mL de la suspensión de blastosporas a evaluar, agitando suavemente en forma circular durante 10 seg. Posteriormente, el vaso se invirtió sobre un papel adsorbente dejando que las larvas se movieran un poco para constatar que siguieran con vida.

De manera individual, cada larva se colocó sobre una hoja de frijol fresca y desinfectada con hipoclorito de sodio al 0.01%. Tanto la hoja como la larva se colocaron en un vasito de plástico de 125 mL de 3 piezas, descrito anteriormente. En el fondo de cada vasito, se colocó un círculo de papel absorbente de aproximadamente de 10 cm de diámetro, humedecidos con 500 µL de agua destilada estéril.

Los frascos se colocaron a 25°C (± 1), 55-60% de HR y fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) durante 10 d. La hoja de frijol en cada frasco se cambió diariamente y en caso de ser necesario se humedeció el papel adsorbente con agua destilada estéril.

Diariamente se revisaron las larvas y se registró el número de individuos muertos, considerándose como tal, aquel insecto que no presentaba movilidad. Las larvas muertas se dejaron en el vasito para permitir la esporulación del hongo y confirmar la muerte por infección fúngica.

5.6.2.1 Experimento 1

Se realizaron bioensayos para determinar la concentración letal media (CL₅₀) de las blastosporas de los dos aislamientos de *B. bassiana* desarrolladas tanto en el medio CDS, como en el medio que promovió en mayor medida la producción de las dos enzimas evaluadas. Se emplearon 5 concentraciones de blastosporas en un rango de 1X10⁵ y 1X10⁸. Cada concentración se evaluó por triplicado, empleando 10 individuos por repetición.

5.6.2.2 Experimento 2

Se determinó el tiempo mediano de sobrevivencia (ST₅₀ por sus siglas en inglés), un equivalente al tiempo letal medio (TL₅₀), empleando sólo la concentración de 1X10⁸ blastosporas por mL. El experimento se realizó por triplicado con 10 larvas por repetición.

5.7 Análisis Estadístico

Se realizaron comparaciones múltiples de media con la prueba Tukey así como análisis de *t* de Student con la finalidad de encontrar diferencias entre los valores de actividad enzimática máximas entre los medios de cultivo y entre aislamiento de *B. bassiana* para cada una de las dos enzimas ensayadas.

Los resultados obtenidos del primer experimento de actividad insecticida se sometieron a un análisis Probit para obtener las rectas de regresión las cuales fueron comparadas mediante sus pendientes y las elevaciones. Para la determinación de ST₅₀ se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se compararon mediante un análisis Long Rank. Para ambos análisis se empleó el programa estadístico SPSS 17 (2008).

6. RESULTADOS

6.1 Actividad enzimática de Pr1

La gran mayoría de los medios seleccionados y evaluados, a diferencia del medio CDS, promovieron notoriamente la actividad de la proteasa Pr1 en ambos aislamientos evaluados de *B. bassiana* (Figuras 6 y 7). No obstante, el medio que contenía quitina coloidal (C_1) como único ingrediente fue el que en menor grado promovió la producción de enzima (menos de 5 U/mL).

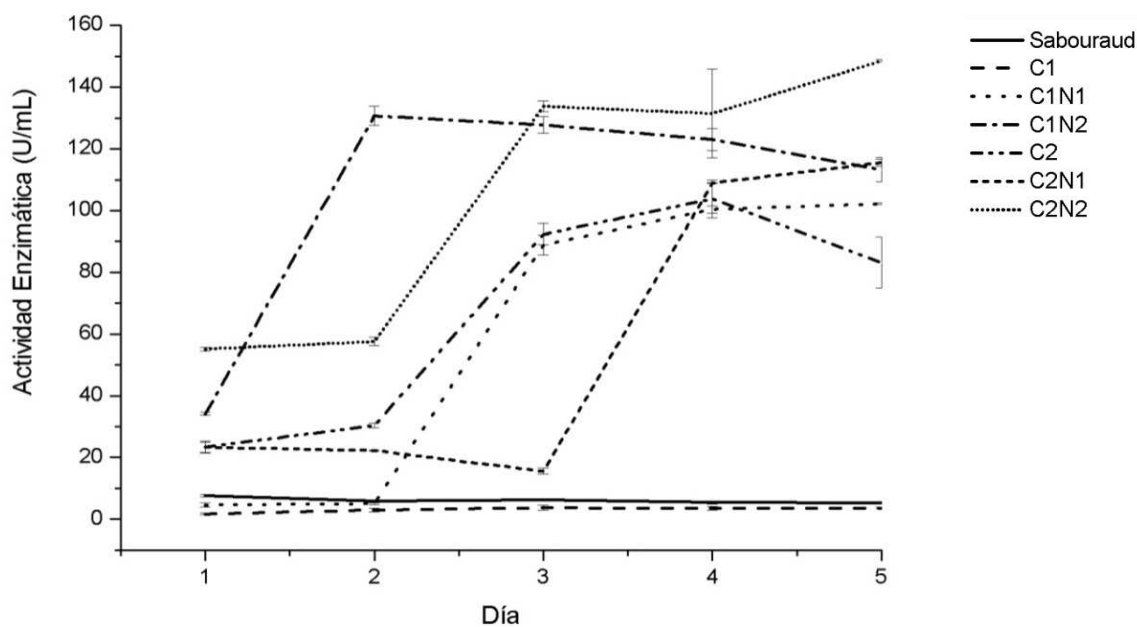


Figura 6. Perfil de actividad enzimática de Pr1 para el aislamiento Bb37 cultivado en diferentes medios de cultivo. Las barras en los diferentes días indican el valor del error estándar de 3 experimentos independientes, con tres repeticiones para cada ensayo enzimático.

El empleo exuvias de lepidóptero (C_2) como único ingrediente, promovió niveles de actividad enzimática máxima poco superiores a las 100 U/mL, en el caso del aislamiento Bb37, y superiores a dicho valor para el aislamiento Bb40 (Tablas 5). Al combinar la peptona (N_1) con C_2 se distingue que para ambos aislamientos la actividad enzimática se ve disminuida durante los primeros días de incubación. Sin embargo, para el aislamiento Bb37, N_1 favoreció la producción de la enzima después de 4 días de incubación, al alcanzar niveles de actividad superiores a 110 U/mL, los cuales no se alcanzaron al usar sólo C_2 . Este fenómeno no se observó para el aislamiento Bb40, para el cual los niveles de actividad

enzimática se elevaron gradualmente hasta ser superiores las 100 U/mL, pero estos niveles fueron inferiores a los máximos registrados en el medio que tenía sólo C₂.

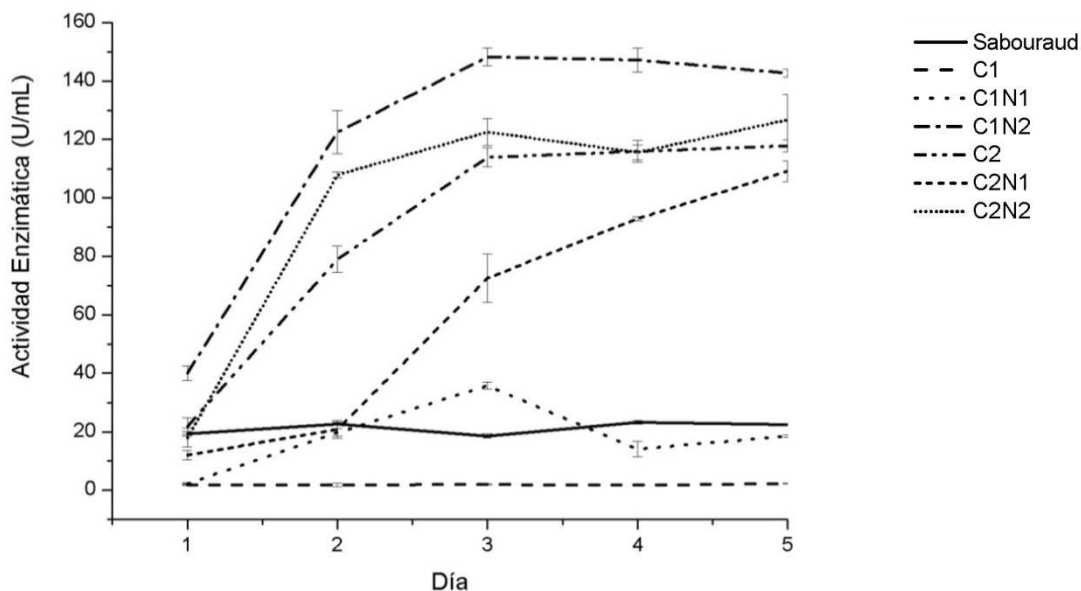


Figura 7. Perfil de actividad enzimática de Pr1 para el aislamiento Bb40 desarrollado en diferentes medio de cultivo. Las barras en los diferentes días indican el valor del error estándar de 3 experimentos independientes, con tres repeticiones para cada ensayo enzimático.

Al mezclar C₂ con la semilla de algodón (N₂) como fuente de nitrógeno, se distingue que la actividad enzimática en ambos aislamientos se eleva significativamente, superando en la mayoría de los casos los 120 U/mL.

Tabla 5. Actividad máxima de Pr1 y NAGasa de dos cepas de *Beauveria bassiana* desarrolladas en diferentes medios de cultivo líquido.¹

Medio	Pr1 (U/mL)		NAGasa (U/mL)	
	Bb37	Bb40	Bb37	Bb40
CDS	7.715 ± 0.416 ^{aA}	23.228 ± 0.636 ^{aB}	2.123 ± 0.168 ^{aA}	5.465 ± 0.363 ^{aB}
C ₁	3.750 ± 0.706 ^{aA}	2.287 ± 0.2 ^{bA}	1.816 ± 0.056 ^{aA}	0.614 ± 0.048 ^{bB}
C ₁ N ₁	102.184 ± 0.306 ^{bA}	35.778 ± 1.249 ^{cB}	2.160 ± 0.697 ^{aA}	1.518 ± 0.154 ^{cA}
C ₁ N ₂	130.671 ± 3.102 ^{cA}	148.302 ± 3.112 ^{dB}	9.348 ± 0.360 ^{bA}	11.052 ± 0.250 ^{dB}
C ₂	103.839 ± 6.615 ^{bA}	117.813 ± 2.137 ^{eA}	5.037 ± 0.644 ^{cA}	4.832 ± 0.391 ^{eA}
C ₂ N ₁	115.580 ± 1.217 ^{dA}	109.113 ± 3.488 ^{eA}	5.689 ± 0.647 ^{cA}	3.659 ± 0.032 ^{fA}
C ₂ N ₂	140.757 ± 0.406 ^{eA}	126.244 ± 8.558 ^{eA}	9.022 ± 0.122 ^{bA}	9.05 ± 0.101 ^{gA}

¹Media de tres experimentos independientes, con tres réplicas para cada ensayo enzimático. Las medias seguidas con la misma letra superíndice minúscula en cada columna no son diferentes de forma significativa, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Las medias seguidas con la misma letra superíndice mayúsculas en cada fila, para cada enzima, no presentan diferencia significativa de acuerdo a la prueba *t* de Student ($p < 0.05$).

Aunque las cinéticas muestran un comportamiento errático que se marca más notoriamente en el aislamiento Bb37, de manera general se apreció que los niveles de actividad máxima se alcanzaron entre el 3er y 5to día de agitación.

6.1.1 Zimograma

Se emplearon 5 extractos enzimáticos provenientes de los aislamientos Bb37 y Bb40 desarrollados en el medio C_1N_2 . En todos los casos se formó una banda de color rosa sobre la membrana de nitrocelulosa la cual tuvo un valor aproximado de $M_r = 30,339$ Da (Figura 8).

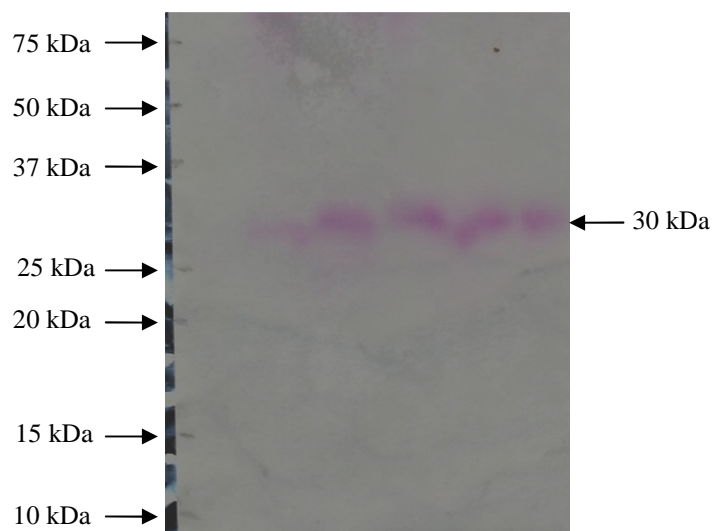


Figura. 8. Detección de la actividad proteolítica sobre el sustrato SAPFNA, de una enzima presente en los extractos enzimáticos de los aislamientos Bb37 y Bb40 en el medio C_1N_2

6.2 Actividad enzimática de NAGasa

En el sobrenadante del cultivo del aislamiento Bb37 en el medio CDS, se detectó la actividad de la NAGasa en cantidades poco superiores a las 2 U/mL, mientras que con en el aislamiento Bb40, su producción se vio favorecida y gradualmente alcanzó niveles de más del doble (5.46 U/mL) (Figuras 9 y 10).

Al usar C_1 como única fuente de carbono en el medio, los niveles de actividad registrados para los dos aislamientos no fueron superiores a las 2 U/mL, mientras que al incorporar N_1 como fuente de nitrógeno, se alcanzaron niveles mayores con el aislamiento Bb37 y que con el aislamiento Bb40. Al mezclar C_1 con N_2 los niveles de actividad se elevaron significativamente llegando a las 9.34 U/mL en el aislamiento Bb37 y a las 11 U/mL en el aislamiento Bb40.

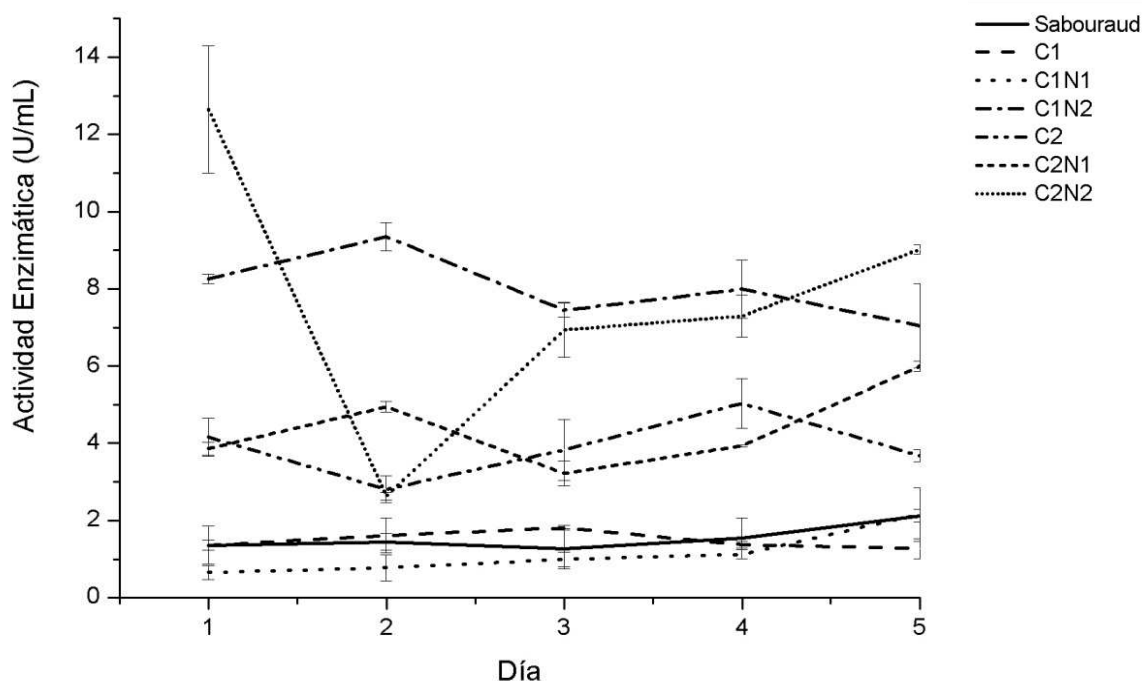


Figura 9. Perfil de actividad enzimática de NAGasa para el aislamiento Bb37 desarrollado en diferentes medio de cultivo. Las barras en los diferentes días indican el valor del error estándar de 3 experimentos independientes, con tres repeticiones para cada ensayo enzimático.

El emplear sólo C_2 en el medio, se observaron actividades máximas de NAGasa de aproximadamente de 5 U/mL para ambos aislamientos de *B. bassiana*. Cuando se mezclaron C_2 con N_1 , se alcanzaron actividades máximas cercanas a las 6 U/mL en el aislamiento Bb37, pero en el Bb40 se observó una disminución en los valores, por debajo de las observadas en el medio con sólo C_2 .

Al agregar N_2 al medio de cultivo junto con C_2 , en ambos aislamientos de *B. bassiana* se observó un incremento gradual de las actividades a partir del segundo día de incubación, alcanzándose actividades máximas de NAGasa de aproximadamente 9 U/mL.

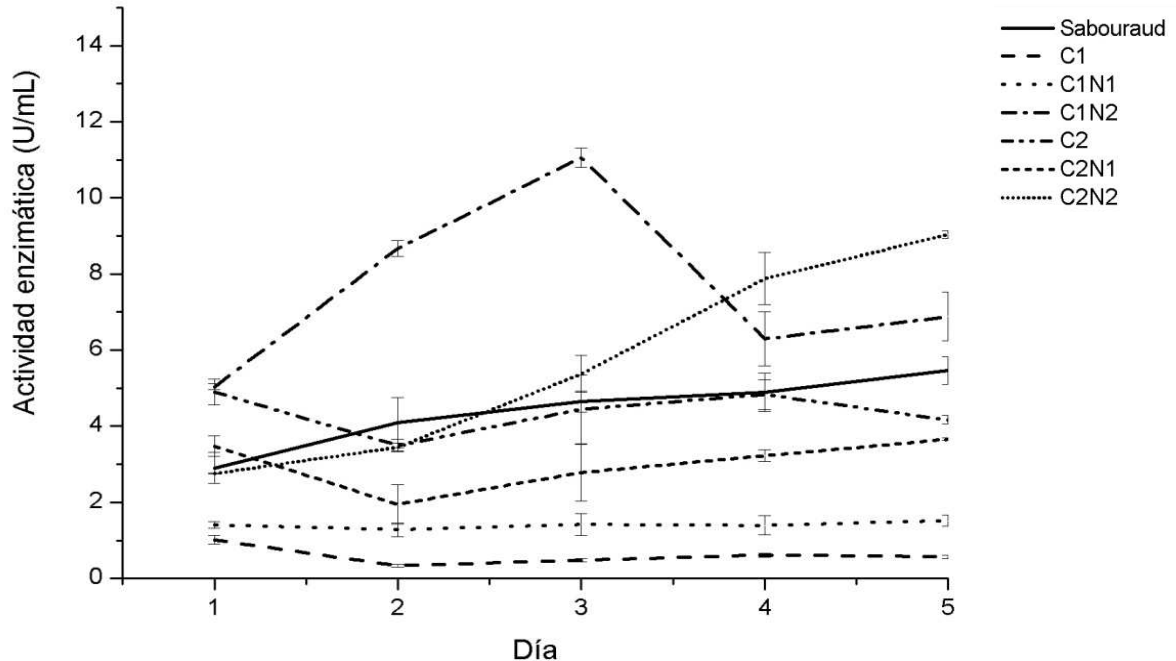


Figura 10. Perfil de actividad enzimática de NAGasa para el aislamiento Bb40 desarrollado en diferentes medio de cultivo. Las barras en los diferentes días indican el valor del error estándar de 3 experimentos independientes, con tres repeticiones para cada ensayo enzimático.

6.3 Actividad insecticida

Se evaluó la actividad insecticida de los aislamientos de *B. bassiana* empleando las blastosporas desarrolladas en los medios CDS (medio de control) y en el de C₁N₂.

6.3.1 Experimento 1

En general, en este experimento se observó que la sobrevivencia de las larvas fue disminuyendo conforme se incrementaba la concentración de blastosporas (Figura 11). Las blastosporas, de los dos aislamientos de *B. bassiana*, desarrolladas en el medio C₁N₂, mostraron un 0% de sobrevivencia en cada una de las repeticiones de los ensayos a una concentración de 1×10^8 blastosporas/mL (Figura 12). Sin embargo, esos valores no difieren estadísticamente ($t_{0.05(2), 4} = -1, p = 0.374$) entre la sobrevivencia generada por la misma concentración de blastosporas procedentes del medio CDS para ambos aislamientos. Las CL₅₀ para las blastosporas de cada uno de los aislamientos de *B. bassiana* desarrolladas en los dos medios de cultivo seleccionados se resumen en la tabla 6, encontrando diferencia

significativa entre los valores de la pendiente y elevación para los análisis Probit del aislamiento Bb40.

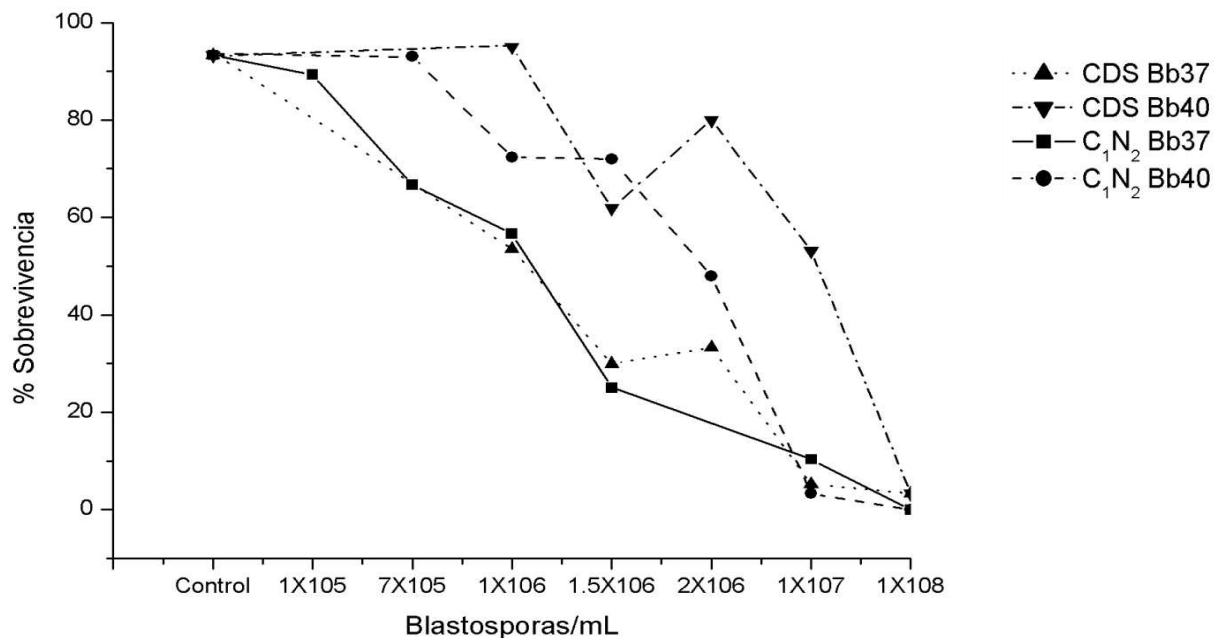


Figura 11. Sobrevivencia de larvas de 3er estadio de *E. varivestis* a blastosporas de 2 aislamientos de *B. bassiana* desarrollados en 2 medios líquidos distintos

Tabla 6. Concentración letal media para las blastosporas de los aislamientos de Bb37 y Bb40 desarrollados en el medio de CDS y medio C₁N₂.

Aislamiento	Medio de cultivo	CL ₅₀ (blastosporas/mL)	Intervalos de confianza a 95%
Bb37*	CDS	9.9X10 ⁵	3.5 X10 ⁵ -1.4X10 ⁶
	C ₁ N ₂	1.06 X 10 ⁶	7.17X10 ⁵ -1.56X10 ⁶
Bb40**	CDS	9.77X10 ⁶	6.29X10 ⁶ -1.59X10 ⁷
	C ₁ N ₂	2.1X10 ⁶	1.71X10 ⁶ -2.81X10 ⁶

* Pendientes: $t = 1.247$, $p > 0.2$. Elevación: $t = 2.20$, $p > 0.05$

** Pendientes: $t = 3.310$, $p < 0.025$

6.3.2 Experimento 2

En este experimento se obtuvieron valores de ST_{50} de 4 días para las blastosporas de los dos aislamientos de *B. bassiana* desarrollados en el medio de Sabouraud, y de 2 días para las que crecieron en el medio C_1N_2 (Figura 13). No se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos para el mismo medio ($\chi^2 = 0.51$; $p=0.47$ para CDS; $\chi^2 = 0.002$; $p=0.962$, para C_1N_2). Sin embargo, si existió diferencia de los ST_{50} al comparar el mismo aislamiento entre los dos medios ($\chi^2 = 39.71$; $p<0.001$ para Bb37; $\chi^2 = 26.14$; $p<0.001$; para Bb40).

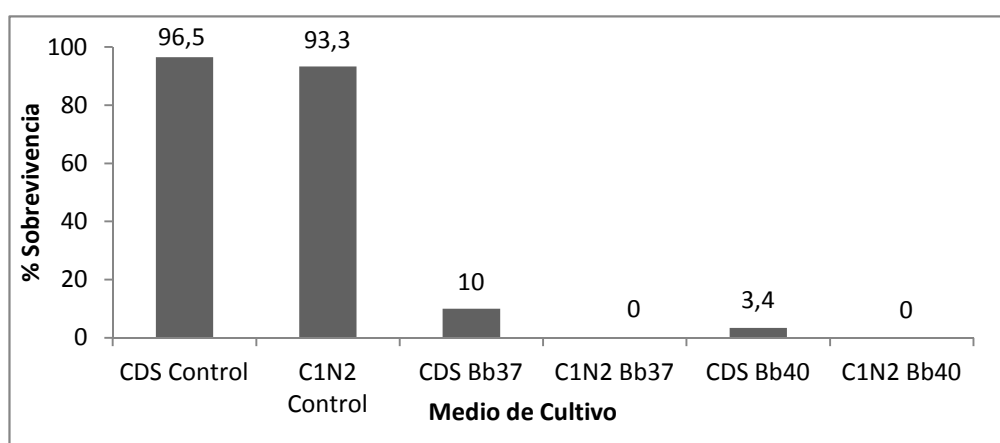


Figura 12. Sobrevivencia de larvas de 3er estadio de *E. varivestis* a la concentración de 1×10^8 blastosporas/mL.

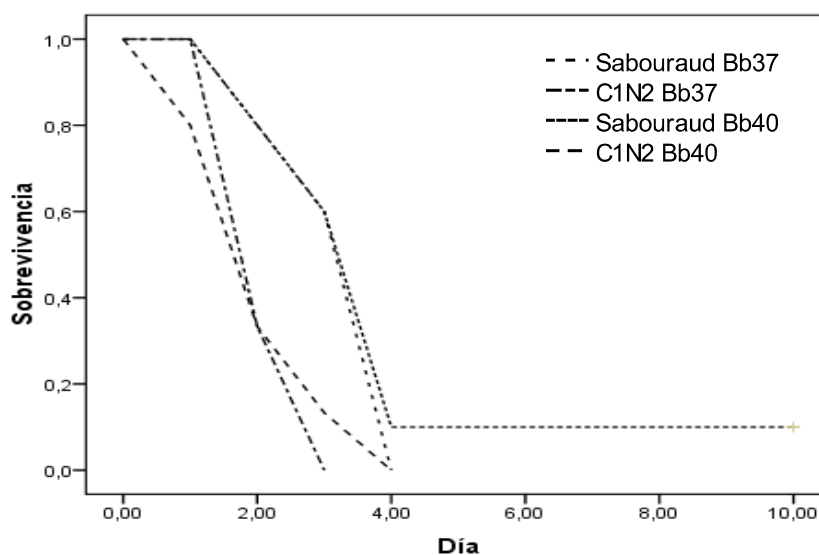


Figura 13. Curva de sobrevivencia Kaplan-Meier de larvas de 3er estadio de *E. varivestis* a la concentración de 1×10^8 blastosporas/mL.

7. DISCUSIÓN

Existen reportes de varios grupos de investigación, de que pueden existir variaciones entre la virulencia de conidios y blastosporas de hongos entomopatógenos (HEP) al crecer en diferentes tipos de sustrato, observándose una relación con las fuentes de nitrógeno y carbono empleados en el medio y su relación C:N (Gupta *et al.*, 1994; Gallegos *et al.*, 2002). En el presente trabajo se evaluó la actividad enzimática del cultivo de blastosporas en un medio mineral con una fuente de carbono y nitrógeno previamente seleccionadas (C₁N₂) y al compararlo frente a un medio de cultivo tradicional (CDS), con ratios C:N de 7.3: 1 y 35:1 (Tabla 4), respectivamente, así como a otros medios mínimos con otras fuentes de carbono y nitrógeno. Tanto la cantidad como el tipo de fuente de nitrógeno empleado en un medio, son parámetros que nos hacen considerar la forma en que serán empleados por los HEP y la posible influencia metabólica que se generará en ellos, de tal forma que si la fuente de nitrógeno es limitada, esta será utilizada primeramente para la producción de proteínas, como las enzimas (Campbell, 1957), y dependiendo de la naturaleza de dicha fuente de nitrógeno, ésta puede inducir a la producción de metabolitos específicos, como las enzimas degradadoras de cutícula (EDC). Shah *et al.* (2005) lograron relacionar de manera conjunta el incremento de la virulencia de un aislamiento de *Metarhizium anisopliae* con niveles elevados de actividad de Pr1 producidos en un medio con extracto de levadura con una relación C: N de 5.2:1. Dicho antecedente fue considerado en este proyecto para evaluar las blastosporas desarrolladas en el medio C₁N₂, seleccionado a partir de que promovió los mayores niveles de actividad enzimática de la proteasa Pr1 y NAGAasa en los aislamientos de *Beauveria bassiana* evaluados en este trabajo (Tabla 5, Figuras 6 y 7). Cabe señalar en este espacio que el reactivo succinil-(alanina)₂-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilina (SAPFNA), empleado para determinar la actividad de la proteasa Pr1, ha sido igualmente utilizado por varios grupos de trabajo para el mismo fin (St Leger, 1987; Paterson *et al.*, 1994; da-Silva Pinto *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2008; Zibae y Bandani, 2009), sin que ninguno, con excepción de St Leger *et al.* (1991) hayan confirmado que la degradación de dicho sustrato haya sido por dicha enzima. Es por ello que en este trabajo se optó por realizar un zimograma que nos permitiera ubicar el peso molecular de la proteína que está degradando el sustrato. Los resultados del análisis revelaron que el peso de la proteína es de aproximadamente 30 kDa, el cual corresponde adecuadamente con lo que reporta St Leger *et al.* (1992) que pesa la proteinasa Pr1 (Figura

8). En base a esto suponemos que en los ensayos de actividad enzimática, evaluamos la acción de la mencionada enzima. No obstante, debemos aceptar que se necesitan más análisis que nos permitan sostener la afirmación de la presencia de Pr1, como lo hizo también St Leger *et al.* (1991) mediante análisis RNA dot-blot e Inmunoblot.

Tomando en consideración lo dicho en el párrafo anterior, discutimos que el efecto inductor de Pr1 por parte del nitrógeno extraído de la semilla de algodón (N₂) resultó bastante favorable, pudiéndose comparar con el generado por la cutícula de insectos, calificado como un sustrato adecuado para tales fines. Sin embargo, los niveles de producción enzimática varía de acuerdo a los aislamientos evaluados, tal como lo demuestran trabajos como los de Donatti *et al.* (2008), y Qazi y Khachatourians (2008), quienes empleando cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn) y *Sitobion avenae* (Fabricius), respectivamente, lograron generar actividades de Pr1 máximas de 0.257 y 12.24 U/mL en *B. bassiana*. Dichos valores son menores a las encontradas en el presente trabajo. Por otra parte Montesinos-Matías *et al.* (2008) obtuvieron valores de cercanos a 120 U/mL, también en *B. bassiana* con cutícula de *Tenebrio molitor* L. En base a nuestros resultados y los reportados por otros grupos de investigación creemos que el empleo del sustrato N₂ resulta adecuado para reducir el tiempo que requieren los propágulos de *B. bassiana* para penetrar e infectar insectos, favoreciendo su empleo en futuros escalamientos de producción (Figura 9).

El empleo de la quitina coloidal (C₁) no favoreció considerablemente la producción de la enzima NAGasa como se esperaba. Esto último tomando como antecedentes trabajos como los de Dhar y Kaur (2010) en donde con el mismo sustrato, lograron obtener niveles de actividad de NAGasa de hasta 947 U/mL para un aislamiento de *B. bassiana*, valores que son superiores a los observados con nuestros aislamientos en este trabajo. Sin embargo, nuevamente hemos de destacar la variación en la producción de la NAGAasa y otras enzimas entre aislamientos fúngicos. Específicamente, Qazi y Khachatourians (2008) reportaron actividades máximas de 2.39 U/ mL en un aislamiento de *B. bassiana*, valores que son inferiores a los mínimos encontrados en este trabajo (Figura 10).

Dhar y Kaur (2010) observaron que la presencia de extracto de levadura, como fuente de nitrógeno, junto con el ingrediente C₁ promovía el incremento de las enzimas quitinolíticas, similar a lo observado por nosotros con la combinación C₁N₂. No se conoce

con precisión la forma en que la fuente de nitrógeno puede inducir la producción de quitinasas, pero se asume que la presencia de la fuente de nitrógeno en el medio favorece el desarrollo de micelio, el cual en sus primeras fases de desarrollo se acompaña de una mayor producción de quitinasas.

En el presente trabajo, las blastosporas de los aislamientos de *B. bassiana*, evaluadas a una concentración de 1×10^8 blastosporas/mL, generaron mortalidades en larvas de *E. varivestis* entre el 90 y 100%, dependiendo del medio de cultivo sobre el cual se desarrollaron (Figura 11). De manera similar, otros grupos de trabajo como el de Martínez *et al.* (2000) evaluaron un aislamiento de *B. bassiana* a una concentración promedio de 3×10^8 blastosporas/mL, de manera tópica, sobre larvas de *E. varivestis* de 1^{er} estadio; obteniendo mortalidades del 78% al cabo de 72 h de ensayo. A pesar de que dichos valores fueron menores a los encontrados en este estudio, es necesario considerar que los métodos de inoculación del patógeno fueron distintos. Mientras que el grupo de Martínez empleó larvas del 1^{er} estadio, nosotros evaluamos del 3^{er} estadio; asimismo, ellos emplearon el método de aplicación tópica, y nosotros la técnica de inmersión. En teoría, esta última garantiza el contacto del patógeno en todo el cuerpo del insecto, por lo que se incrementan las probabilidades de que éste sea infectado, razón por la que grupos de trabajo como el de Posada y Vega (2005b) consideran que es una técnica de inoculación apropiada para determinar de forma rápida la patogenicidad de un hongo. Por otra parte, la efectividad de la inoculación tópica está sujeta al volumen del inóculo y al lugar en donde se coloque éste, tomando en cuenta, por ejemplo, que algunas partes de los insectos se encuentran mayormente queratinizadas y por tal razón dichas zonas representan una barrera para que el hongo pueda invadir el cuerpo del insecto (Charnley y Collins, 2007).

Gallegos *et al.* (2002) reportaron que al usar soya y haba como sustrato para un aislamiento de *B. bassiana*, lograron producir blastosporas con valores de CL_{50} , sobre *Amphidees* spp. (Sharp), menores a las obtenidas en el medio de CDS. Esto indica que el medio también influye en la potencia insecticida del aislamiento. En este trabajo al analizar los valores de las pendientes y de las elevaciones de las regresiones Probit entre medios de cultivo para cada aislamiento, se encontró diferencias significativas entre la relación dosis-respuesta sobre las larvas de *E. varivestis* sólo para el aislamiento Bb40 (Tabla 6), denotándose que el medio C_1N_2 influyó en la potencia de las blastosporas desarrolladas en

él mostrando un valor de CL_{50} 5 veces menor que el obtenido con el medio CDS (Tabla 6). Este fenómeno no se observó para el aislamiento Bb37, quizá debido a la variabilidad génica entre aislamientos, característica previamente discutida.

Al comparar los valores de CL_{50} que Ocampo-Hernández *et al.* (2011) reportaron para los conidios de los aislamientos Bb37 y Bb40 de *B. bassiana* (2.37×10^6 y 3.13×10^6 , respectivamente) con los observados para las blastosporas, de los mismos aislamientos, desarrolladas en el medio C_1N_2 de este trabajo, no se encontró una marcada diferencia. Esto significa que para matar el 50% de la población de larvas de conchuela con estos aislamientos es indistinto emplear conidios o blastosporas. Trinci *et al.* (1999) reportaron resultados similares al no observar diferencia significativa en los valores de DL_{50} de blastosporas y conidios de un aislamiento de *B. bassiana* sobre *N. virescens*. Sin embargo, Behle *et al.* (2006) reportaron el caso contrario al evaluar un aislamiento de *Isaria (P.) fumosoroseus* sobre *E. varivestis*, en donde la CL_{50} para blastosporas fue 100 veces menor a la de los conidios.

Las blastosporas desarrolladas en el medio C_1N_2 fueron más virulentas, con valores de ST_{50} de 2 días, que las que crecieron en el medio CDS (Figuras 12 y 13). Considerando que éste último tiene peptona como fuente de nitrógeno, los resultados son contrarios a los reportados por Safavi *et al.* (2007) donde los conidios de dos aislamientos de *B. bassiana* eran más virulentos contra larvas de *Tenebrio molitor* L. cuando se desarrollaban en un medio enriquecido con peptona. Por otra parte, Lane *et al.* (1991), demostraron que en medios limitados en nitrógeno se desarrollaron blastosporas de *B. bassiana* que reducen los valores de TL_{50} para *Nephotettix virescens* (Distant); y aunque el medio CDS es más limitado en nitrógeno que en el C_1N_2 , fue este último el que generó blastosporas más virulentas.

Se ha confirmado que las blastosporas de los HEP son más efectivas que los conidios en matar a la conchuela del frijol (Behle *et al.*, 2006) y a otros insectos como *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette) (Hall *et al.*, 1979) y *Bemisia argentifolii* (Bellows and Perring) (Lacey *et al.*, 1999). No obstante, Vandenberg *et al.* (1998) mostraron que los conidios y blastosporas de *P. fumosoroseus* generaban el mismo efecto sobre el áfido *Diuraphis noxia* (Mordvilko). Las mortalidades obtenidas con blastosporas de los aislamientos Bb37 y Bb40 del presente trabajo fueron superiores al 90% con la

concentración más elevada (1×10^8 blastosporas/mL), mientras que los conidios de los mismos aislamientos y a la misma concentración generaron mortalidades entre el 85 y 75%, según lo reporta Ocampo-Hernández *et al.* (2011). Encontrar valores cercanos de CL_{50} entre las blastosporas y conidios representa, en principio, una ventaja, esto debido a que las blastosporas son hidrofílicas (Holder *et al.*, 2007), característica que las pone en desventaja con los conidios que son hidrofóbicos, lo que les permite adherirse mejor a la cutícula de los insectos (Lane *et al.*, 1991). En lo que respecta a lograr alcanzar CL_{50} menores con blastosporas, esto puede estar relacionado con un patrón de producción de metabolitos secundarios como las toxinas, que coadyuvan en la muerte del insecto. Dicho patrón de toxinas es característico entre los distintos HEP e incluso entre aislamientos del mismo hongo (Paterson 2006). Al emplear HEP como agentes de control biológico es necesario considerar el tipo de unidad infectiva que se desea utilizar. Los conidios aéreos, a pesar de ser los comúnmente empleados, guardan el inconveniente de que su producción a gran escala llega a implicar costos elevados. Por otro lado, la producción de blastosporas en medios líquidos, abarata los costos y disminuye los requerimientos técnicos de producción (Jackson *et al.*, 2006). Sin embargo, las blastosporas son más lábiles a las condiciones ambientales y tienen un periodo de vida de anaquel considerablemente más corto que el de los conidios (Chong-Rodríguez *et al.*, 2011), razón por la que el número de productos formulados en base a dichas unidades infectivas son escasos. A pesar de esto, se reconoce la necesidad de seguir investigando el uso de blastosporas y poder proporcionar productos efectivos y competitivos.

La velocidad de germinación de las unidades infectivas de los HEP representa una característica particular asociada a la virulencia de las mismas. Mientras menos tiempo pase entre el contacto de la unidad infectiva con el cuerpo del insecto y la germinación del hongo, se asegura que factores como la desecación, radiación, antibiosis por microorganismos saprófitos, inhibición de lípidos cuticulares o remoción por ecdisis, intervengan en el proceso infeccioso al insecto (Hassan *et al.*, 1989). Una blastospora germina en menos tiempo de lo que lo hace un conidio, de tal forma que son más virulentas que éstos, lo que se traduce en tiempos de mortalidad más cortos (Bidochka *et al.*, 1987). En este trabajo se encontró que las blastosporas, de ambos aislamientos, desarrolladas en el medio CDS a una concentración de 1×10^8 blastosporas/mL tuvieron valores de ST_{50}

correspondientes a 96 h (Figura 12). Este tiempo fue intermedio a las 87 y 100 h reportadas por Ocampo-Hernández *et al.* (2011) para los conidios de los mismos aislamientos. Por otro lado, las blastosporas que crecieron en el medio C₁N₂, generaron valores de ST₅₀ de 48 h, la mitad del tiempo que el encontrado para las blastosporas desarrolladas en medio CDS (Figura 12).

En resumen, la principal aportación de este trabajo deriva en la ventaja que representa el disminuir el tiempo letal de un agente entomopatógeno como lo es *B. bassiana* a la mitad. La principal ventaja en el control de cualquier plaga para un cultivo tan importante como el frijol en México, deriva en que al morir más rápido se alimentará por menos tiempo y el daño directo al cultivo será menor, redundando en mayor rendimiento de grano. De cualquier forma, se requieren más estudios para definir las condiciones para mejorar la vida de anaquel de las blastosporas, y por ende la aceptación de empleo de este tipo de bioinsecticidas en el campo agrícola mexicano.

8. CONCLUSIONES

- De los medios líquidos evaluados, el compuesto con quitina coloidal y semilla de algodón (C₁N₂) induce, en los aislamientos de *B. bassiana* Bb37 y Bb40, la mayor producción de la proteasa Pr1 y la quitinasa NAGasa, con niveles de actividad enzimática de hasta 148 U/ mL y 11 U/mL, respectivamente.
- Cuando las blastosporas de los dos aislamientos de *B. bassiana* se desarrollan en el medio C₁N₂, les toma la mitad del tiempo provocar la muerte de las larvas de *E. varivestis*, comparado con las producidas en medio de Sabouraud.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que las blastosporas de los aislamientos de *B. bassiana* con que cuenta el CESAPEG, pueden resultar efectivas en el control de larvas de *E. varivestis*. No obstante, se requieren realizar investigaciones en campo para determinar las mejores condiciones de aplicación de los propágulos y eventualmente realizar las formulaciones adecuadas para garantizar su efectividad en el biocontrol.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta** GJA, Rosales S, Navarrete R, López E. 2000. Desarrollo de variedades mejoradas de frijol para condiciones de riego y temporal en México. *Agricultura Técnica en México* 26: 79-98.
- Arakane** Y, Muthukrishnan S. 2009. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Science* 67: 201-216.
- Aylor** DE. 1990. The role of intermittent wind in the dispersal of fungi pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 73-92.
- Bautista** N. 2006. Insectos Plaga. Una guía ilustrada para su identificación. Colegio de Postgraduados ISBN: 968-839-489-0.
- Behle** RW, García-Gutiérrez C, Tamez-Guerra P, McGuire MR, Jackson MA. 2006. Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus*, against larvae of Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist* 31: 289-295.
- Beys-da-Silva** WO, Santil L, Corrêa AP, Silva LA, Bresciani FR, Schrank A, Vainstein MH. 2010. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. *Fungal Biology*, 114: 911-916.
- Bidochka** MJ, Khachatourians GG. 1988. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology* 12:161-168.
- Bidochka** MJ, Pfeifer TA, Khachatourians GG. 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia* 99: 77-83.
- Bruck** DJ, Lewis LC. Rainfall and crop residue effect on soil dispersion and *Beauveria bassiana* spread to corn. *Applied Soil Ecology* 20: 183-190.
- Bye** NJ, Charnley AK. 2008. Regulation of cuticle-degrading subtilisin proteases from the entomopathogenic fungi, *Lecanicillium spp*: implications for host specificity. *Archives of Microbiology* 189:81-92.
- Camacho-Hernández** MI, Loera-Corral O. 2008. Efecto diferencial del medio de cultivo sobre la producción y calidad de *Beauveria bassiana*. En memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico, Zacatecas, México.
- Campbell** A. 1957. Synchronizations of cell division. *Bacteriologica Reviews* 21: 253-272.

- Carballo M**, Hidalgo E, Rodríguez-del-Bosque A. 2004. Control biológico de insectos mediante hongos entomopatógenos. En: Control biológico de plagas agrícolas, Carballo M y Guharay CATIE: Managua, pp 33-58.
- Carrillo-Rayas MT**, Blanco-Labra A. 2009. Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta Universitaria* 19: 40-49.
- Carrillo-Sánchez JL**. 1976. Control biológico de la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Mulsant en México. *Agricultura Técnica en México* 4: 63-71.
- Carrillo-Sánchez JL**, Tenorio MC, Barrón JL. 1990. Investigaciones sobre el control biológico de la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Mulsant, en varias regiones de México. En: Memorias de Trabajos de Investigación de Control Biológico. XIII Reunión Nacional de Control Biológico, Colima, México.
- CESAPEG**. 2011. Información técnica en materia fitosanitaria. Disponible en <http://www.cesaveg.org.mx/html/pfichastecnicas.htm>
- Champlin FR**, Grula EA. 1979. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 37: 1122-1125.
- Charnley AK**. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticles degrading enzymes and toxins. *Advances and Botanical Research* 40: 241-321.
- Charnley AK**, Collins SA. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: The Mycota, Kubicek CP y Druzhinina (Eds.). Springer, pp 159-180.
- Chong-Rodríguez MJ**, Maldonado MG, Hernández-Escareño JJ, Galán-Wong LJ, Sandoval-Coronado CF. 2011. Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology* 10: 5736-5742.
- Coudron TA**, Kroha MJ, Ignoffo CM. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. Comparative biochemistry and physiology Part B: *Comparative Biochemistry* 79: 339-348.
- da-Silva-Pinto FG**, Pelegrinelli MH, Maldonado J, Valadares-Inglis MC, Cristina M. 2002. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genetics and Molecular Biology* 25: 231-234.

- Dias** BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 301-306.
- Dhar** P, Kaur G. 2010. Production of cuticle degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. *African Journal of Biochemistry Research* 4: 65-72.
- Dhar** P, Kaur G. 2010. Effects of carbon and nitrogen source on the induction and repression of chitinase enzyme from *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Biotechnology* 9: 8092-8099.
- Donatti** A, Furlaneto-Maia L, Fungaro MH, Furlaneto M. 2008. Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. *Current Microbiology* 56: 256-260.
- Douglas** G, Johnson D, Goettel M. 1996. Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Biological Control* 7: 131-139.
- Dubey** P, Ray P, Pandey AK. 2010. First record of entomopathogen *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. on *Zygogramma bicolorata* Pallister, a biocontrol agent of *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Plant Protection Research* 50: 53- 55.
- Dubovenko** A, Dunaevsky Y, Belozersky M, Oppert B, Lord J, Elpidina E. 2010. Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity. *Fungal Biology* 114: 151-159.
- Enriquez-Vara** JN, Shirai-Matsumoto K, Alatorre-Rosas R. 2008. Producción de enzimas extracelulares y esporas de *Lecanicillium lecanii* en arroz-quitina de camarón y efecto sobre *Brevycorine brassicae*. En: Memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico, Zacatecas, México.
- España** MP, Lozano J, Lezama R. 2000. Virulencia de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre *Epilachna varivestis* (Coleoptero: Coccinellidae), y su relación con la actividad lipolítica de los aislados. En memorias XXIII Congreso Nacional de Control Biológico Guanajuato, México.
- Ezzati-Tabrizi** R, Talaei-Hassanloui R, Hamid-Reza P. 2009. Effect of formulating of *Beauveria bassiana* conidia on their viability and pathogenicity to the onion thrips,

- Thrips tabaci* Lind. (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Plant Protection Research* 49: 97-105.
- Fan Y**, Groden E, Liebman M, Alford AR. 1993. Response of dry bean yield to injury by Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae) in low-input and conventional cropping systems. *Journal of Economic Entomology* 86: 1574-1578.
- Fan Y**, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka, Pei Y. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73:295-302.
- Fang W**, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 363-370.
- Fang W**, Feng J, Fan Y, Zhang Y, Bidochka MJ, St. Leger RJ, Pei Y. 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 155-159.
- Gabriel BP**. 1968. Enzymatic activities of some entomophthorous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 11: 70-81.
- Gallegos G**, Huitrón C, Guerrero E, Porfirio R, Cepeda M. 2002. Producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill en medios de cultivo líquidos para el control del picudo de la yema del manzano. En: Resultados de Proyectos de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coah.
- García-Gutiérrez C**, Medrano-Roldán H, Piedra S, Morales-Castro S, Hernández-Velázquez V. 1999. Toxicological assessment of *Beauveria bassiana* against Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Southwestern Entomologist* 24: 225-259.
- García-Gutiérrez**, Ochoa-Martínez LA, Medrano H, Segovia V. 2002. Spray dried microencapsulated formulation of *Beauveria bassiana* for control of *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist* 27: 105-109.

- García-Gutiérrez C, Carrillo-Sánchez JL. 2008.** Conchuela del Frijol, *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). En: Casos de Control Biológico en México. Mundi-Presa: México, pp 23-32.
- Godoy JC, Valera RE, Guédez C, Cañizalez LM, Castillo C. 2007.** Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 24: 415-425.
- Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GD, Ignoffo CM. 1992.** Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology* 16: 132-137.
- Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 13-17.**
- Hajek A, St. Leger R. 1994.** Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology* 39:293-322.
- Hajek A, Filotas M, Ewing D. 2002.** Formation of appressoria by two species of lepidopteran-pathogenic entomophthorales. *Canadian Journal of Botany* 80: 220-225.
- Hajek A, Delalibera I. 2010.** Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl* 55:147-158.
- Hall RA. 1979.** Pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidia and blastospores against the aphid *Macrosiphonella sanborni*. *Entomophaga* 24: 191-198.
- Hassan AEM, Dillon RJ, Charnley AK. 1989.** Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 277-279.
- Havukkala, MC, Hara S, Hirayae K, Nishizawa Y, Hibi T. 1993.** Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 97-102.
- Hegedus DD, Bidochka MJ, Miranpuri GS, Khachatourians GG. 1992.** A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types

produced by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 785-789.

Howard AF, N' Guessan R, Koenraadt CJ, Asidi A, Farenhorst M, Akogbeto M, Knols BG, Takken W. 2010. First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *Malaria Journal* 10: 24.

Hutwimmer S, Wang H, Strasser H, Burgstaller W. 2010. Formation of exudate droplets by *Metarhizium anisopliae* and the presence of destruxins. *Mycologia* 102: 1-10.

Holder D, Kirkland B, Lewis M, Keyhani N. 2007. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology* 153: 3448-3457.

Jackson MA, Erhan S, Poprawski TJ. 2006. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastosporas of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology* 16: 61-73.

Joseph I, Chellaiah D, Singh J. 2010. Studies on the influence of *Beauveria bassiana* on survival and gut flora of groundnut caterpillar, *Spodoptera litura* Fab. *Journal of Biopesticides* 3: 553-555.

Kim JS, Kassa A, Skinner M, Hata T, Parker BL. 2011. Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38: 697-704,

Lacey LA, Kirk AA, Millar L, Mercadier G, Vidal C. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Biocontrol Science and Technology* 9:9-18.

Lane BS, Trinci APJ. 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycology* 95: 829-833.

- Leopold J, Samsřiřáková A.** 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 34-42.
- Liu BL, Chen JW, Tzeng YM.** 2000. Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnology Progress* 16: 993-999.
- Li J, Ying SH, Shan LT, Feng MG.** 2010. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology Biotechnology* 85: 975-984.
- Martínez GN, González R, García-Gutierrez C, Solis A, Medrano H.** 2000. Susceptibilidad de “Conchuela del Frijol” a cepas de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus*, producidas en medio líquido. En memorias XXIII Congreso Nacional de Control Biológico Guanajuato, México.
- McCoy C, Tigano-Milani M.** 1992. Use of entomopathogenic fungi in biological control a world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 27: 87-93.
- Montesino-Matías R, Viniegra-González G, Alatorre-Rosas R, Loera-Corral O.** 2008. Perfiles de actividad enzimática extracelular de *Beauveria bassiana* involucrados en los mecanismos de virulencia hacia *Tenebrio monitor*. En memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico, Zacatecas, México.
- Mustafa U, Kaur G.** 2009. Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia Microbiologica* 54: 499-504.
- Nahar P, Ghormade V, Deshpande MV.** 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 80-88.
- Nakamura H, Shiratori S.** 2010. The progress of invasion of insect pest, the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* in Nagano prefecture. *Journal of Faculty of Agriculture Shinshu University* 46: 105-111.
- Ocampo-Hernández JA, Tamez-Guerra P, Pineda S, Tamayo-Mejía F, Guzmán-Franco A, de la Rosa J, Martínez A.** 2011. Susceptibility of the Mexican bean beetle *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) to endemic isolates of *Beauveria*

- bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Journal of Pest Science* 84: 471-477.
- Ortiz-Urquiza** A, Riveiro-Miranda L, Santiago-Álvarez C, Quesada-Moraga E. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105: 270-278.
- Padmavathi** J, Uma K, Maheswara CU. The optimum and tolerance pH is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic *Beauveria bassiana*- a potential biopesticide. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 469–477.
- Paterson** IC, Charnley AK, Cooper RM, Clarkson JM. 1994. Specific induction of cuticle-degrading protease of insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 185-189.
- Paterson** RRM. 2006. Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research* 110: 1003-1010.
- Pathan** AA, Uma K, Vogel H, Reinike A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. *Fungal Genetic and Biology* 44:1231-1241.
- Pinto** VM, Vera J, Landois LL, Leyva JV. 2002. Simulación de la dinámica poblacional de la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Muls., mediante un modelo fenológico de desarrollo acumulativo. *Agrociencia* 36: 115-122.
- Posada** F, Vega F. 2005a. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia* 97: 1195-1200.
- Posada** F, Vega F. 2005b. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science* 5:1-10.
- Qazi** S, Khachatourians G. 2008. Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beauveria bassiana*. *Archives of Microbiology* 189: 589-596.
- Quattlebaum** CE, Carner GR. 1980. A new fungal pathogen of the Mexican bean beetle *Epilachna varivestis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 35: 320-322.

- Quesada-Morada E**, Ruiz-García A, Santiago-Alvarez C. 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economical Entomology* 99: 1955-1966.
- Rangel DE**, Braga GU, Flint SD, Anderson AJ, Roberts DW. 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology* 87: 77-83.
- Rangel DE**, Alston DG, Roberts DW. 2008. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research* 112: 1355-1361.
- Rodríguez-Gómez D**, Loera-Corral O, Saucedo-Castañeda G, Viniegra-González G. 2008. Modificación de la fisiología y virulencia de debido al medio de cultivo y al repase por *Tenebrio molitor*. *Beauveria bassiana*. En memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico, Zacatecas, México.
- Schaafsma AW**, Ablett GR. 1994. Yield loss response of navy bean to partial or total defoliation. *Journal of Production Agriculture* 7: 202-205.
- Sánchez-Arroyo H**. 2007. Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis* Mulsant). University of Florida. Publication number: EENY-15
- Safavi SA**, Shah FA, Pakdel AK, Reza G, Bandani AR, Butt TM. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* 270: 116-123.
- St. Leger RJ**, Charnley AK, Cooper RM. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 85-95.
- St. Leger RJ**, Cooper RM, Charnley AK. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology* 132: 1509-1517.
- St. Leger RJ**, Cooper RM, Charnley AK. 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from

Calliphora vomitaria and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology* 133: 1371-1382.

- St. Leger** RJ, Durrands PK, Cooper RM, Charnley AK. 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology* 150: 413-416.
- St. Leger** RJ, Staples RC, Roberts DW. 1991. Changes in translatable mRNA species associated with nutrient deprivation and protease synthesis in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of General Microbiology* 137: 807-815.
- St. Leger** RJ, Frank DC, Roberts DW, Staples RC. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading proteases structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry* 204: 991-1001.
- St. Leger** RJ, Staples RC, Roberts D. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 81-84.
- St. Leger** RJ, Bidochka MJ, Roberts DW. 1994. Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology* 140: 1651-1660.
- St. Leger** RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America* 93: 6349-6354.
- St. Leger** RJ, Joshi L, Roberts D. 1998. Ambient pH is a major factor determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 709-713.
- SAGARPA**. 2011. Frijol. Disponible en:
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=171&Itemid=81. Revisado el 07 de mayo del 2012.
- SENASICA**. 2011. Chapulín. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1616>.
Revisado el 07 de mayo del 2012.
- Shah** P, Pell J. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 413-423.

- Shah** F, Wang C, Butt T. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Federation of European Microbiological Societies* 251: 259-266.
- SIAP**. 2011. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350. Revisado el 07 de mayo del 2012.
- Small** CL, Bidochka MJ. 2005. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 109: 307-313.
- Smith** RJ, Gula EA. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 222-230.
- Smith** RJ, Gula EA. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 42: 319-326.
- Sung** GH, Hywel-Jones N, Sung JM, Luangsa-ard J, Shrestha B, Spatafora J. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5-59.
- SPSS**. 2008. SPSS Inc. IBM.
- Tamez-Guerra** P, García-Gutiérrez C, Medrano-Roldan H, Galán-Wong LJ, Sandoval CF. 1999. Spray dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist* 24: 37-48.
- Tlecuitl-Beristain** S, Viniegra-González G, Díaz-Godínez G, Loera O. 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia* 169: 387-94.
- Toledo** A, Alippi A, Lenicov R. 2010. Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. *Journal of Insect Science* 2: 1-12.
- Trinci** APJ, Lane BS, Humphreys AM. 1999. Optimization of cultural conditions for the production and longevity of entomopathogenic fungi. En Proceedings and abstracts,

Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia.

- Ulhoa** CJ, Peberdy JF. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology* 137: 2163-2169.
- Vandenberg** JD, Jackson MA, Lacey LA. 1998. Relative efficacy of blastopores and aerial conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the Russian wheat aphid. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 181-183.
- Vasseur** V, Arigoni F, Andersen H, Defago G, Bompeix G, Seng JM. 1990. Isolation and characterization of *Aphanocladium album* chitinase-overproducing mutants. *Journal of General Microbiology* 136: 2561-2567.
- Vincent** J, Wegst U. 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development* 33: 187-199.
- Wang** C, Skrobek A, Butt T. 2004. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 168-174.
- Wraight** S, Inglis DG, Goettel MS. 2007. Fungi. *En: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Springer pp 223-248.
- Wu** J, Ali S, Huang Z, Ren S, Cal S. 2010. Media composition influences growth, enzyme activity and virulence of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Pakistan Journal of Zoology* 42: 451-459.
- Zimmermann** G. 2007. Review on safety of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 553-596.
- Zibae** A, Bandani AR. 2009. Purification and characterization of the cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in the presence of Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) cuticle. *Biocontrol Science and Technology* 19: 797-808.