



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE
POSGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA DEL TRÓPICO

TESIS

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS INFECTIVAS DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS QUE NO PRESENTAN ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA

QUE PRESENTA

GUADALUPE ARENA ORTIZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN CAMPECHE, ENERO 2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Guadalupe Arena Ortiz**, Alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Joel Lara Reyna** , por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Caracterización de cepas infectivas de hongos entomopatógenos sin actividad quitinolítica**" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y La que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 12 de Febrero de 2019.



Firma

Ing. Guadalupe Arena Ortiz



Vo.Bo. del Consejero o Director de Tesis
Dr. Joel Lara Reyna

La presente tesis, titulada: **Caracterización de cepas infectivas de hongos entomopatógenos que no presentan actividad quitinolítica**, realizada por la alumna **Guadalupe Arena Ortiz** bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA DEL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR DE TESIS: 
Dr. Joel Lara Reyna

ASESORA: 
Dra. Itzel López Rosas

ASESOR: 
Dr. Esaú Ruíz Sánchez

Sihochac Campeche, Enero 2019.

Caracterización de cepas infectivas de hongos entomopatógenos que no presentan actividad quitinolítica.

**Guadalupe Arena Ortiz, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2019**

RESUMEN

Cinco cepas de dos especies de hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*) con infectividad comprobada hacia insectos, fueron evaluadas en su capacidad para producir enzimas extracelulares con actividad quitinolítica. Se obtuvieron las proteínas extracelulares de dichas cepas en tres condiciones de crecimiento; medio rico específico, medio mínimo y medio mínimo suplementado con quitina coloidal como inductor. Mediante un ensayo enzimático colorimétrico se evaluó la capacidad de las proteínas extracelulares para hidrolizar tres sustratos diferentes con lo cual se pudo determinar las actividades de chitobiosidasas, B-N-acetilglucosaminidasa y endoquitinasa. Asimismo, las proteínas secretadas al medio fueron precipitadas con ácido tricloroacético, cuantificadas espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280_{nm} y analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Bioensayos en contra del ácaro *Tetranychus urticae* fueron realizados para establecer correlación entre producción de quitinasas e infectividad.

Las cepas Bb005 de *B. bassiana* y Ma005 y Ma008 de *M. anisopliae*, no presentaron actividad quitinolítica. Las cepas de *B. bassiana* Bb017 y Bb019 presentan actividad de quitinasa, exoquitinasa y endoquitinasa. Los resultados de actividad enzimática y producción de enzimas extracelulares, mostraron que la condición de crecimiento en medio rico definido no favorece la producción de enzimas y bajo las condiciones a las que se sometieron las cepas presentan diferencias en la producción de proteínas.

Los resultados obtenidos de los bioensayos, sugieren que la ausencia en la producción de quitinasas no está relacionada con la agresividad de estas cepas.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, quitinasas, agresividad

Characterization of five entomopathogenic fungus strains without chitinolytic activity.

**Guadalupe Arena Ortiz, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2019**

ABSTRACT

Five strains of two entomopathogenic fungi (*Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*) were evaluated on its ability to produce extracellular enzymes with chitinolytic activity. Extracellular proteins were obtained in three conditions; specific growth medium, minimal medium and minimal medium supplemented with colloidal chitin as an inducer of the synthesis of chitinases. Total extracellular proteins were precipitated with trichloroacetic acid, quantified spectrophotometrically and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Specific activity in the three growth conditions was measure by colorimetric assay using three different substrates to detect chitobiosidase, b-N-acetylglucosaminidase and endochitinase activities. Bioassays were carried out against *Tetranychus urticae* to established if exist a correlation between chitinases presence and infectivity of the *M. anisopliae* and *B. bassiana* strains.

The strains Bb005 (*B. bassiana*) and Ma005, Ma008 (*M. anisopliae*) did not present chitinolytic activity in enzymatic assays while Bb017 and Bb019 (*B. bassiana*) strains showed chitinase, exochitinase and endochitinase activity. Together the results of enzymatic activity and production of extracellular enzymes suggest that the growth condition in rich defined medium does nor favor the production of chitinolytic enzymes under the three different conditions that were evaluated, the strains show differences in proteins production.

According to the bioassays results on these strains there are no correlation between the chitinases production with the aggressiveness.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, chitinases, aggressiveness

A Mumu.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero que me brindó a través de una beca de manutención (No. de apoyo 453329) para poder llevar a cabo mi posgrado.

A mi hermana Leticia, por ser quien me trajo al Campus Campeche y me puso en manos de gente profesional y humana, especialmente el Doctor Lara.

A mi mamá, por su eterno apoyo, ejemplo y confianza. Por estar siempre dispuesta a brindarme su ayuda, por siempre apoyarme en mis impulsos de continuar creciendo académicamente y por todo el amor que lo anterior conlleva.

Al Doctor Joel Lara Reyna, por aceptarme como su alumna, por el profesionalismo con el que siempre me guío, por compartir conocimiento a manos llenas, por su ejemplo de franqueza y de perseverancia, por empujarme a creer en mi misma, por ayudarme a potenciar la científica que llevo dentro, por tratarme con respeto, pero sobre todo, por creer en mí.

A mis asesores la Doctora Itzel López, y el Doctor Esaú Ruíz por su apoyo y confianza.

A la Doctora Aida Martínez por sus maravillosas clases intensas llenas de conocimiento, gracias por sus observaciones siempre puntuales, por ser el barco en la tormenta, por su excelente ojo crítico y por su ejemplo de tenacidad.

A mi pareja el Ing. Luis Alberto Ramos, por ser siempre mi puerto seguro, mi muro de contención, por su eterna paciencia. Por estar juntos en esta aventura y continuar creciendo académicamente juntos.

To Robert Putnam, for his love, economical support, friendship and protection. For being the hero in my darkest moments in this process, for believe in me since I were no one, for save me from my past and for help me to find the diamond that was lost in the deepest mud of the sadness. Thank you wolf.

A la Doctora Karina Verdell por su apoyo y por guiarme siempre con profesionalismo y respeto. También por su amistad y apoyo moral.

Al Doctor Everardo Aceves Navarro por su ejemplo, por su maravillosa personalidad, y por ser para mí una inspiración, una fuente de respeto y admiración.

Al Colegio de Postgraduados campus Campeche por permitirme ser parte de su comunidad y apoyarme en cada proceso de mi estancia como estudiante.

A los millones de mexicanos que pagan impuestos y hacen posible que existan becas para estudiantes de posgrado.

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABLAS	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Hongos Entomopatógenos (HE).....	4
2.1.1 Especies más empleadas de HE en control biológico de insectos.....	5
2.2 Interacción HE- insectos	6
2.3 Cutícula e integumento de los insectos	8
2.4 Modo de acción de los HE	11
2.5 Enzimas extracelulares de los HE	12
2.5.1 Lipasas	13
2.5.2 Proteasas	13
2.5.3 Quitinasas	14
2.5.3.1 Importancia y Características de las quitinasas en los HE	14
2.6 Identificación de enzimas a través de estudios proteómicos	15
2.7 El concepto de agresividad y virulencia en la patología de insectos.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Material Biológico	23
6.2 Diseño experimental	23
6.3 Obtención de cepas y mantenimiento	25
6.4 Crecimiento en medio líquido para la obtención de biomasa, obtención de proteínas extracelulares y evaluación de actividad quitinolítica	25

6.4.1 Producción de biomasa	25
6.4.2 Obtención de proteínas extracelulares	26
6.4.3 Precipitación de proteínas.....	27
6.5 Determinación de proteínas extracelulares mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
6.5.1 Cuantificación e integridad de proteínas.....	27
6.6 Determinación de actividad enzimática	28
6.7 Detección de actividad quitinolítica	30
6.8 Bioensayos para la evaluación de la infectividad y agresividad de las cepas no productoras y productoras de quitinasas	30
6.8.1 Producción de inóculo.....	31
6.8.2. Recuperación de esporas y preparación de diluciones seriales.....	32
6.8.3. Evaluación de la infectividad sobre <i>Galleria mellonella</i>	32
6.8.4. Evaluación de la infectividad sobre <i>Sitophilus granarius</i>	33
6.8.5. Evaluación de la infectividad sobre <i>Tetranychus urticae</i>	34
6.9 Microcultivos	35
7. RESULTADOS	37
7.1 Proteínas extracelulares.....	37
7.2 Análisis cualitativo de actividad de quitinasas.....	39
7.3 Cuantificación de proteínas secretadas al medio.....	40
7.4 Actividad de quitinasa determinada enzimáticamente	41
7.5 Bioensayos	44
7.6 Microcultivos	47
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
8.1 Proteínas extracelulares	50
8.2 Análisis enzimáticos	51
8.3 Actividad quitinolítica en contraindicación.....	52
8.4 Bioensayos	53

8.5 Microcultivos	53
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
10. ANEXO.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

HE	Hongos entomopatógenos
Chi +	Con actividad quitinolítica
Chi -	Sin actividad quitinolítica
Cl	Cloro
g	Gramos
l	Litros
ml	Mililitros
μl	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
GlcNAc	N acetil-glucosamina
NaCl	Cloruro de sodio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
K₂HPO₄	Fosfato dipotásico
V	Volts
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1	Conidios de la especie de <i>B. bassiana</i> , larva infectada.....	4
Figura. 2	Conidios de la especie de <i>M. anisopliae</i> , garrapata infectada.....	5
Figura. 3	Larva de <i>G.mellonella</i> en estado pupal, mecanismo de defensa.....	7
Figura. 4	Corte transversal de larva de <i>Trichoplusia ni</i>	9
Figura. 5	Estructura general de la cutícula de los insectos	10
Figura. 6	Modo de acción de los HE.....	11
Figura. 7	Diseño experimental	24
Figura. 8	Crecimiento fúngico para producción de micelio.....	26
Figura. 9	Evaluación de actividad quitinolítica	29
Figura. 10	Tinción con calcofluor	30
Figura. 11	Larvas de <i>G. mellonella</i>	31
Figura. 12	Bioensayo con larvas de <i>G. mellonella</i>	33
Figura. 13	Bioensayo con <i>Sitophilus granarius</i>	34
Figura. 14	Hembra adulta de <i>Tetranychus urticae</i>	35
Figura. 15	Bioensayo con <i>T. urticae</i>	35
Figura. 16	Crecimiento de HE en microcultivo.....	36
Figura. 17	Obtención de proteínas extracelulares Gel 1.....	37
Figura. 18	Obtención de proteínas extracelulares Gel 2	38
Figura. 19	Crecimiento de las cepas en gel agarosa con quitina.....	39
Figura. 20	Cuantificación de proteínas secretadas al medio.....	40
Figura. 21	Gráfica de actividad quitinolítica	42
Figura. 22	Gráfica y valores de actividad correspondientes a segundo análisis	43
Figura. 23	Liberación de <i>p</i> -nitrofenol.....	44
Figura. 24	Gráfico de dosis contra mortalidad.....	45

Figura. 25	Mortalidad obtenida para las cepas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	46
Figura. 26	<i>Tetranychus urticae</i> infectados mediante bioensayo.....	46
Figura. 27	Desarrollo de las cepas a través de microcultivos.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla. 1	Otras especies de hongos entomopatógenos comúnmente utilizadas para el control biológico de plagas.	5
Tabla. 2	Especies de hongos entomopatógenos y enzimas que producen	12
Tabla. 3	Definiciones y discrepancias de patogenicidad y virulencia	17
Tabla. 4	Ejemplo de proteínas extracelulares.....	19
Tabla. 5	Nombre y origen de las cepas de estudio.....	23
Tabla. 6	Valores de actividad específica de quitinasas.....	41

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos (HE) son importantes reguladores de las poblaciones de insectos. Una gran diversidad de aislamientos fúngicos de un reducido número de especies han sido evaluados y validados en contra de distintas especies que llegan a ser plagas de cultivos de importancia agrícola, forestal y pecuaria. Entre las especies utilizadas como ingrediente activo en productos comerciales están representantes de los géneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Nomureae*, *Aschersonia*, *Isaria*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, entre otros. Infinidad de aislamientos han sido obtenidos para cada una de las especies mencionadas en todo el mundo y evaluadas en diversos cultivos y especies de insectos. No todos los aislamientos terminan en un producto comercial ya que primero se realiza una etapa de evaluación para determinar la agresividad de una cepa contra la especie o especies insectiles. La agresividad de una cepa es el resultado de la evaluación de infectividad, dispersión de la enfermedad y el tiempo de mortalidad. Una cepa de HE se considera agresiva cuando produce síntomas rápidamente (indicativo que el organismo es muy susceptible a la infección por el patógeno), el desarrollo de la enfermedad es acelerado y el organismos infectado muere en un período corto de tiempo; finalmente la enfermedad se dispersa de manera generalizada resultando en el control de la población. Diversos estudios se han enfocado hacia la búsqueda de los factores de virulencia más importantes en la relación insecto-HE. En esta búsqueda se han encontrado péptidos, toxinas, antibióticos y enzimas involucradas en la infección y muerte del hospedero.

Estudios transcriptómicos y proteómicos (Harith *et al.*, 2018), han reportado una gran cantidad de genes y proteínas y una pléyade de enzimas que actúan (o es hipotética su participación) a diferentes niveles durante el proceso de infección.

Los hongos, absorben directamente del medio compuestos de estructura simple como la glucosa; sin embargo, compuestos con una estructura más compleja deben ser procesados enzimáticamente previo a la absorción. Los HE consiguen

esto a través de la secreción de una variedad de enzimas. La diversidad enzimática comprende (entre otras) enzimas líticas con múltiples isoformas como ocurre con las proteasas Pr en el caso de *M. anisopliae* y varias quitinasas, cada una desempeñando sus papeles respectivos y específicos durante las etapas de la infección (Charnley, 2003; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013).

La capacidad de degradar sustancias ricas en quitina es una característica común de los hongos entomopatógenos (Humber, 2008). La quitina es un componente importante de la pared celular de los hongos y de la cutícula del insecto; por lo que los hongos utilizan quitinasas para hidrolizar su propia quitina y para descomponer la quitina de los insectos y otros hongos. Se ha reportado para las especies micoparasitarias de *Trichoderma*, que las mismas quitinasas son activas tanto en estadios micoparasitarios como en el proceso de reestructuración de la pared celular propia (Hartl *et al.*, 2012). Un mismo aislamiento puede contener diferentes tipos de quitinasas, Małagocka y colaboradores en el año 2015 reportaron la presencia de 22 diferentes transcritos codificantes para quitinasas en *Pandora formicae*.

El papel de las quitinasas como elemento fundamental durante el proceso de infección aun no es claro debido a que varios autores difieren en la importancia de la misma (Screen *et al.*, 2001). De acuerdo a algunos trabajos reportados, la degradación enzimática de la cutícula del insecto parece ser poco eficiente cuando la actividad es realizada por una sola proteasa o quitinasa, pero aumenta cuando los diferentes enzimas actúan juntas o en tándem (Cheong *et al.*, 2016). Las actividades proteolíticas de las enzimas secretadas por los HE exponen la estructura de las fibras de quitina en la cutícula. Además de hidrolizar la cutícula y proporcionar nutrientes al hongo, las proteasas extracelulares también pueden hidrolizar proteínas antifúngicas en la cutícula (Małagocka *et al.*, 2015).

En este trabajo, se presenta la caracterización de aislamientos infectivos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* que en trabajos preliminares

sugieren que dichos aislamientos no presentan actividad para quitinasa, y que nos permitirán definir la importancia de la presencia de quitinasas durante la infección de un HE.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) se encuentran dentro de las familias Zygomycota y Ascomycota dentro de la clase de Hyphomycetes y Deuteromycota, así como también en las familias de Chytridiomycota y Oomycota, son hongos saprófitos facultativos con la capacidad de infectar y matar insectos y a otros artrópodos así como también colonizar como endófitos cierto rango de especies de plantas, los insectos son infectados vía cuticular a través de la penetración del tubo germinativo de la espora del hongo sobre la cutícula del insecto. El tubo germinativo crece a través de las capas de la cutícula y de la epidermis utilizando una combinación de fuerzas físicas y acciones enzimáticas para finalmente entrar al hemocele. Para poder penetrar e invadir el exosqueleto del huésped los hongos han desarrollado mecanismos de penetración a través de las capas de cera de la epicutícula y de las otras capas del integumento conformadas por quitina y proteínas (Dionisio *et al.*, 2016). Una vez que el insecto muere, los HE salen a través del exoesqueleto (Figuras 1 y 2) , forman micelio y esporulan al ambiente, de igual forma la esporulación se lleva a cabo dentro del insecto muerto liberando a las esporas cuando se eleva la humedad en el ambiente (Mondal *et al.*, 2016).

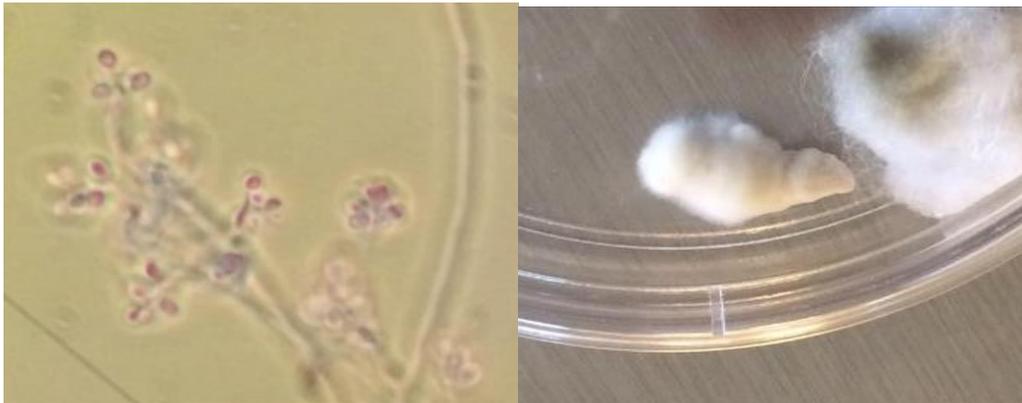


Figura 1. Conidios de la especie *B. bassiana* (izquierda), larva de *G. mellonella* infectada con *B. bassiana* (derecha).

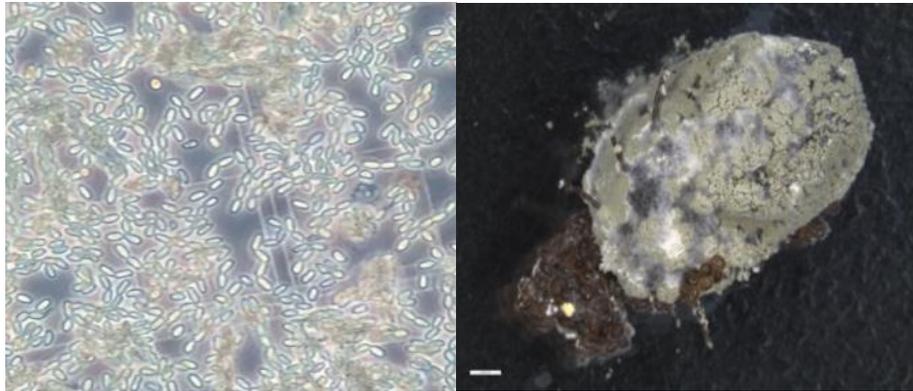


Figura 2. Conidios de la especie *M. anisopliae* (izquierda), Garrapata del ganado (*Bophilus microplus*) infectada con *M. anisopliae* (derecha)

2.1.1. Especies más empleadas de HE en control biológico de insectos

Se estiman hay en el mundo entre uno y cinco millones de especies de hongos, de las cuales entre 750 y 1000 especies son HE, repartidos en 100 géneros. Dentro de las especies de HE más conocidas y que son utilizadas para el control biológico de plagas (Tabla 1), las más representativas son *Beauveria bassiana*, *Beauveria brogninartii*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumoroseae* (Faria y Wraight, 2007).

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	
<i>Strongwellsea sp.</i>	<i>Aschersonia marginata</i>
<i>Pandora lipai</i>	<i>Hypocrella calendulina</i>
<i>Zoophthora forficulae</i>	<i>Metarhizium cylindrospora</i>
<i>Entomophthora syrphii</i>	<i>Conoideocrella tenuis</i>
<i>Neozygites parvispora</i>	<i>Cordyceps bassiana</i>
<i>Entomophthora planchoniana</i>	<i>Torrubiella hemipterigena</i>
<i>Pandora formicae.</i>	<i>Torrubiella aff. neofusiformis</i>
<i>Metarhizium cylindrospora</i>	<i>Akanthomyces koratensis</i>
<i>Aschersonia coffeae</i>	<i>Akanthomyces aculeatus</i>
<i>Hypocrella calendulina</i>	<i>Isaria tenuipes</i>

Tabla 1. Otras especies de hongos entomopatógenos comúnmente utilizadas para el control biológico de plagas (Mondal et al., 2016).

2.2. Interacción HE-insectos

Los hongos entomopatógenos han evolucionado los mecanismos de adhesión y reconocimiento de la superficie del huésped que ayuda directamente a la respuesta adaptativa, la cual incluye: a) la producción de enzimas hidrolíticas asimilatorias que incluyen quitinasas, proteasas, lipasas, esterases; b) estructuras infecciosas especializadas llamada apresorio; c) Metabolitos secundarios que facilitan la infección. De igual forma, en cuanto a la respuesta inmune, los insectos han evolucionado los mecanismos que mantienen a raya a los patógenos (Figura 3). Estos mecanismos incluyen: (a) la producción de lípidos, proteínas y metabolitos epicuticulares con actividad antimicrobiana; (b) muda de la cutícula durante el desarrollo de la infección; y (c) adaptaciones de comportamiento ambiental como la inducción de fiebre, enterrarse y asearse, así como promover la interacción con otros microbios, todos estos intentos con el fin de tratar de detener al patógeno antes de que pueda atravesar la cutícula (Almudena y Nemat, 2013). El proceso de adherencia involucra interacciones físicas y químicas, y se ha asumido que los compuestos epicuticulares tales como ácidos grasos, aminoácidos y glucosaminas juegan un papel importante para la regulación de la especificidad y patogenicidad de los HE al momento de la adhesión y comenzar con el proceso germinativo y enzimático (Mondal *et al.*, 2016).



Figura 3. Larva de *Galleria mellonella* en estado pupal el cual comenzó como mecanismo de defensa en respuesta después de haber sido infectada con esporas de *B. bassiana*.

2.3. Cutícula e Integumento de los insectos

Al integumento se le considera un tejido dinámico con responsabilidades diversas como la reelaboración de la cutícula cada vez que un insecto hace ecdisis, la participación en procesos glandulares y la conformación de varios órganos de los sentidos. La importancia del integumento también radica en ser el límite protector, evitando la entrada de agentes patógenos, e impidiendo la salida de agua. Además, presenta numerosas modificaciones que le aportan al insecto sitios de inserción muscular, puntos de articulación, gran rigidez y flexibilidad (Resh y Cardé, 2003).

La cutícula de los insectos (Figura 4) es una estructura heterogénea que puede variar en composición durante los distintos estadios de cada insecto en particular. Los componentes epicuticulares que protegen a los insectos de la desecación, están relacionados con la comunicación química y la defensa. La epicutícula o capa exterior, provee al insecto de una barrera hidrofóbica rica en lípidos, la cual es seguida por la procutícula que contiene quitina y proteínas esclerotizadas, a la cual está dividida en exo, meso y endocutícula (Figura 5), la cual constituye de un 50 al 80% de la estructura de la cutícula (Glare y Moran, 2016).

La procutícula a su vez es seguida por las células que constituyen la epidermis rodeando las estructuras internas del insecto, las capas de cemento y cera que componen la superficie de la cutícula del insecto incluyen diferentes cantidades de hidrocarburos (alcanos, alquenos), ácidos grasos y ésteres, alcoholes, cetonas, aldehídos y en menor cantidad otros componentes que incluyen triacilgliceroles, epóxidos, y éteres así como también proteínas que impactan directamente en aspectos importantes de las interacciones ambientales y de comportamiento del insecto (Howard y Blomquist, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

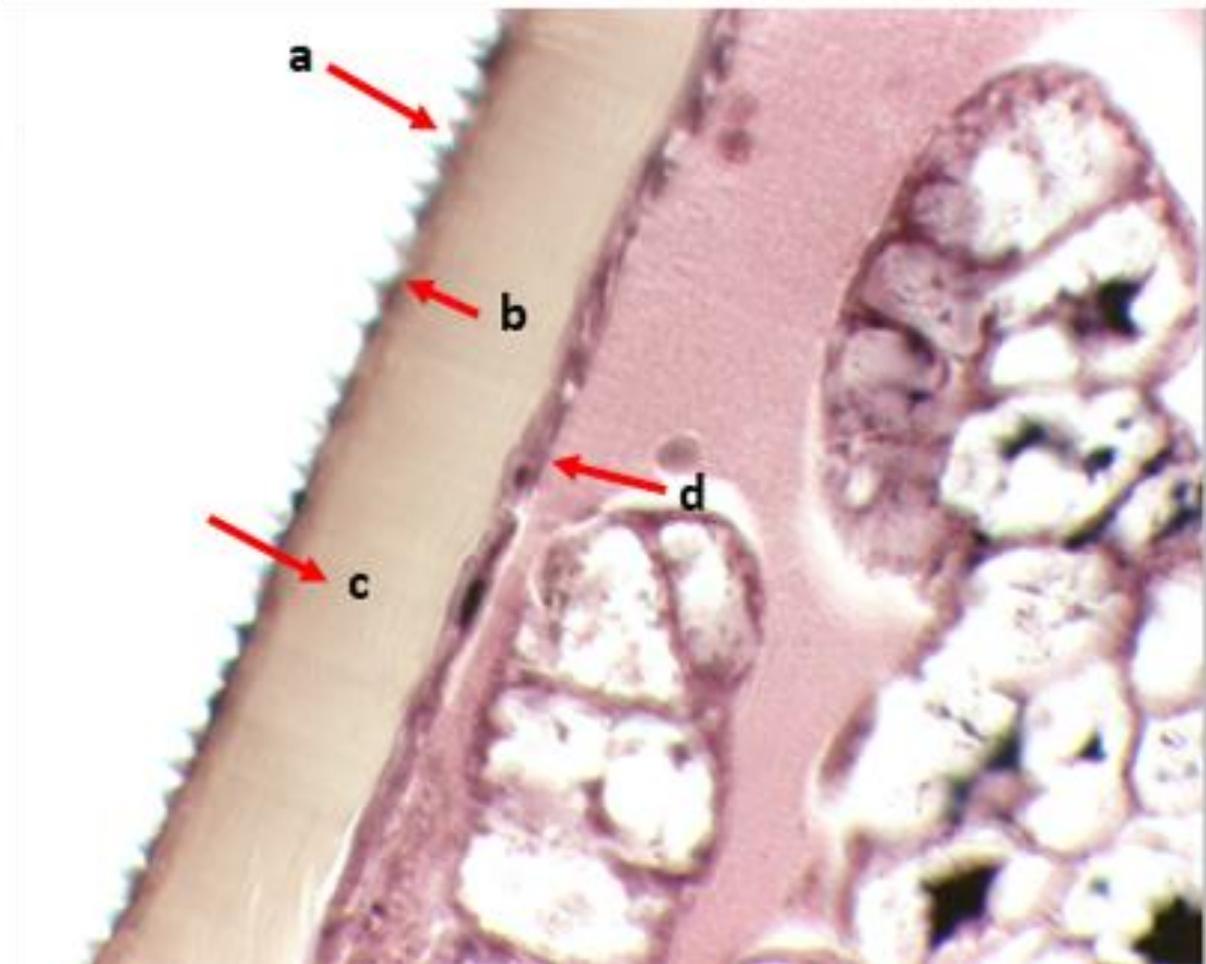


Figura 4. Corte transversal de larva en tercer instar temprano de *Trichoplusia ni*. a) epicutícula, b) exocutícula, c) endocutícula, d) células basales (zona de formación de la cutícula). Nótese el grosor de la cutícula con respecto a la capa celular basal que la produce y sostiene.

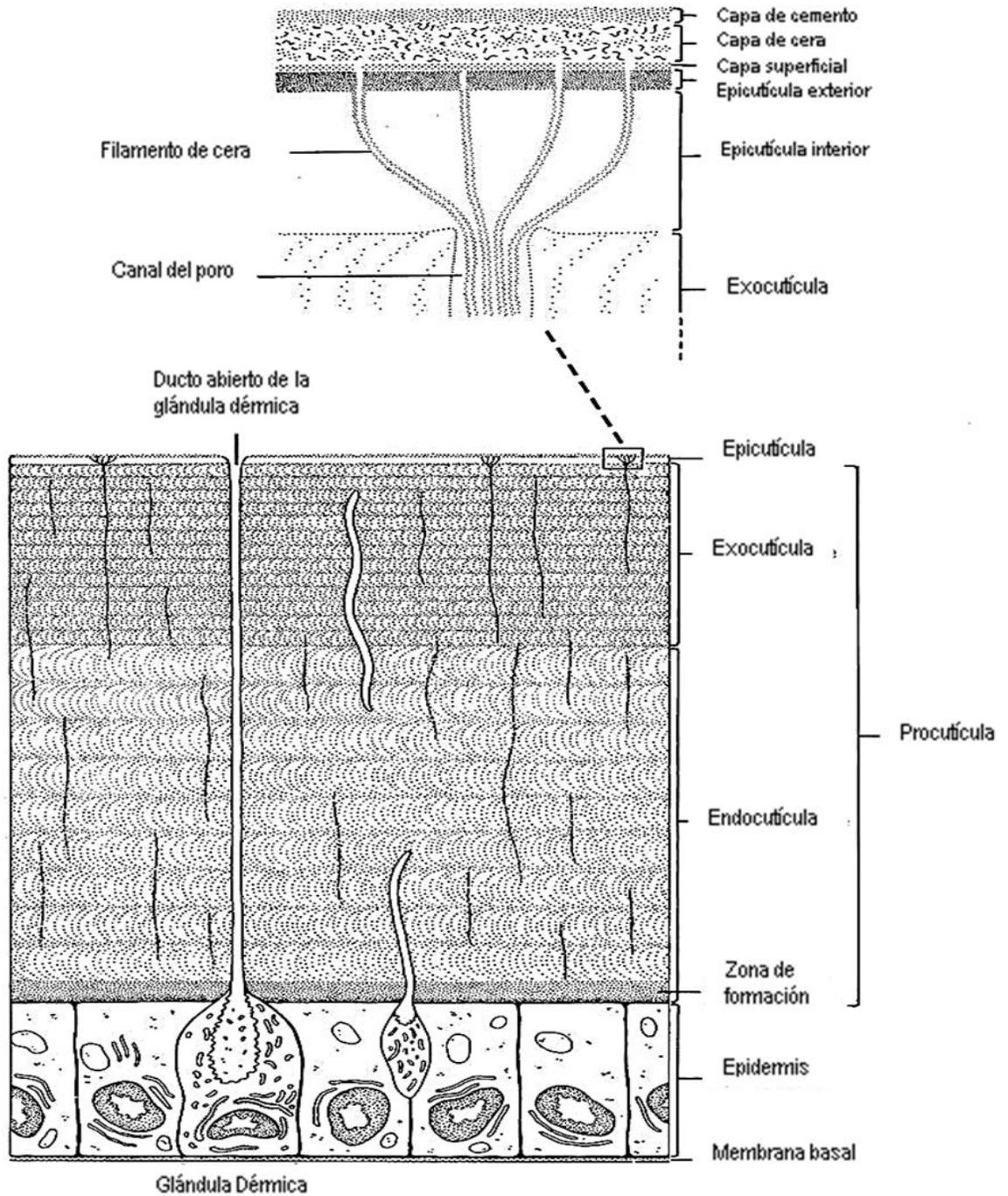


Figura 5. Estructura general de la cutícula de los insectos mostrando la complejidad en capas y composición. El recuadro de aumento muestra los detalles de la epicutícula. Fuente: <http://www.entomologa.ru>

2.4. Modo de acción de los HE

A diferencia de otros patógenos que requieren rutas especializadas de entrada para infectar insectos huéspedes, los hongos entomopatógenos infectan penetrando en cualquier parte de la cutícula del insecto (Figura 6), sin embargo se han observado sitios preferenciales de infección en varios insectos. La infección comienza con la unión de una espора a la cutícula del insecto. La expresión de una amplia variedad de enzimas hidrolíticas como las proteasas, quitinasas, lipasas y otros factores, promueven la germinación y el crecimiento del hongo a través de la superficie del huésped, y subsecuentemente la penetración de las capas cuticulares. Durante este proceso el hongo produce una estructura especializada para la infección llamada apresorio la cual permite el crecimiento de la hifa para penetrar dentro del integumento del huésped (Xiao *et al.*, 2012; Ortiz y Keyani, 2013).

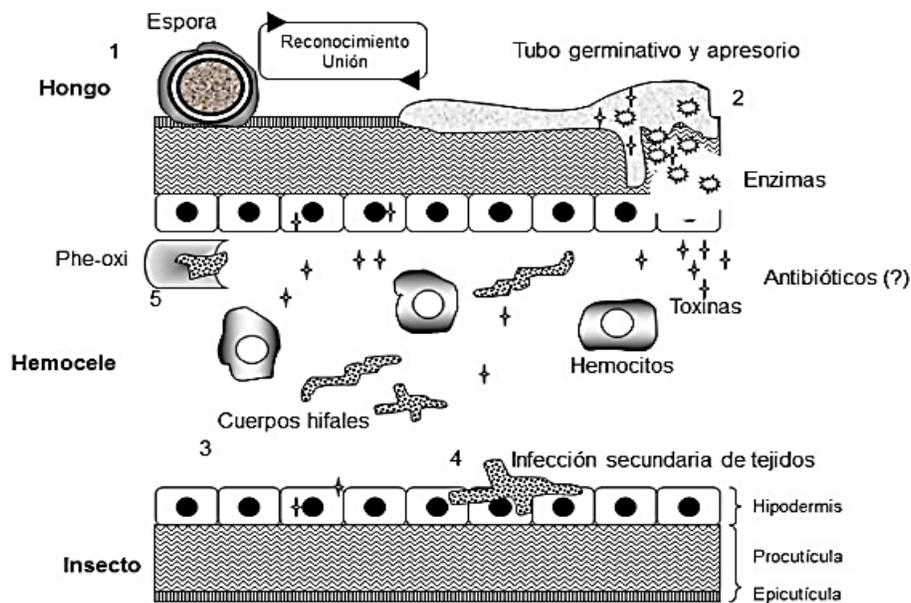


Figura 6. Modelo del modo de acción de la espора del hongo entomopatógeno durante el reconocimiento del hospedero en la cutícula del insecto. Fuente: Lara-Reyna, MOSCAS BLANCAS temas selectos sobre su manejo.

2.5. Enzimas extracelulares de los HE

Después de formar el tubo germinativo y el apresorio para que el hongo pueda penetrar a la cutícula del insecto, el hongo comienza a combinar fuerzas mecánicas y enzimáticas. Dentro de estas enzimas se encuentran las lipasas, proteasas, quitinasas y lipogenasas que al degradar la cutícula proveen de nutrientes al hongo (Sánchez *et al.*, 2014). La epicutícula tiene una capa externa de lípidos y algunos autores como Alí y colaboradores (2009) sugieren que las lipasas son las primeras enzimas en comenzar con la penetración a la cutícula, seguidas por las proteasas las cuáles al degradar material proteico solubilizan a las proteínas transformándolas en aminoácidos que el hongo aprovecha para su desarrollo (Wang *et al.*, 2002). Una vez que las proteasas comienzan con su actividad proteolítica, en conjunto con las quitinasas, la degradación de la cutícula continua hasta que el hongo penetra en el hemocele (Li, 2006). Hay una literatura basta que donde se reporta la producción específica de enzimática, por lo que se sabe que no todas las especies de HE producen las mismas enzimas (Tabla 2) (Mondal *et al.*, 2016).

ENZIMA	HONGO ENTOMOPATÓGENO
Lipasa	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Beauveria bassiana</i>
Proteasa	<i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Verticillium lecanii</i> , <i>Paecilomyces fumsoroseus</i>
Quitinasa	<i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Tichoderma virens</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> ,
β - galactosidasa	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Aspergillus foelidis</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Aspergillus fonsecaeus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Auerobasidium pullulans</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Metarhizium robertsii</i>
Catalasa	<i>Lecanicillium muscarium</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillum dahlia</i> , <i>Aspergillus phoenicis</i>
L - glutaminasa	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>

Tabla 2. Especies de Hongos entomopatógenos y enzimas que producen (Mondal *et al.*, 2016).

2.5.1. Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas que ayudan a catalizar la hidrólisis del glicerol y los ácidos grasos de cadenas largas con la síntesis de puentes de éster. La epicutícula, es decir, la capa externa de la cutícula de los insectos, es hidrofóbica y actúa como la primera barrera contra ataques microbianos. Una mezcla heterogénea de alquenos de cadena larga, ésteres y ácidos grasos es el principal constituyente de la cutícula de los insectos. Las lipasas son las responsables de la hidrólisis de los puentes de ésteres de las lipoproteínas, grasas y ceras que se han encontrado en el interior del integumento de los insectos. Las lipasas penetran la cutícula e inician la liberación de nutrientes. La degradación de la epicutícula es seguida por la producción de proteasas fúngicas, las cuales degradan el material proteico de la procutícula (Alí *et al.*, 2009; Supakdamrongkul *et al.*, 2010; Sánchez, 2014).

2.5.2. Proteasas

Las proteasas constituyen un amplio número de enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas convirtiéndolos en pequeños péptidos y en aminoácidos (Sharma *et al.*, 2006). Durante el proceso de infección una vez que la epicutícula del insecto ha sido penetrada por las lipasas, el hongo invasor produce grandes cantidades de la serin-proteasa Pr1, la cual degrada el material proteico. Por otro lado la degradación de proteínas solubles transformadas en aminoácidos por aminopeptidasas y exopeptidasas se lleva a cabo para proveer de nutrientes al hongo. Las enzimas proteolíticas que son estudiadas con mayor frecuencia son las subtilisina serin-proteasa Pr1 y la tripsina proteasa Pr2. El gen Pr1 está relacionado con once isoformas que han sido identificadas y clonadas, incluyendo una metaloproteasa, estas proteasas antes mencionadas son las secretadas durante el primer estado de la degradación de la cutícula de los insectos (Sun y Liu, 2006; Yu *et al.*, 2012).

2.5.3. Quitinasas

La quitina es un polímero de β -1,4 N-acetil glucosamina y es uno de los polímeros más abundantes de la naturaleza después de la celulosa y se ha considerado el componente principal de las paredes celulares de los hongos y del exoesqueleto de los invertebrados. Las quitinasas hidrolizan los puentes β -1,4 del polímero de la quitina, produciendo predominantemente N, N'-diacetilquitobiosa. Las quitinasas están ampliamente distribuidas en plantas, bacterias, hongos, insectos y vertebrados. Éstas colaboran con las proteasas durante la degradación de la cutícula de los insectos y están asociadas con diferentes estadios del ciclo de vida (germinación, crecimiento hifal, morfogénesis, nutrición y defensa contra competidores) de los HE (Adams, 2004). Las quitinasas cumplen con funciones críticas en los procesos de crecimiento y degradación de la pared celular del hongo y de la degradación de la cutícula del insecto, siendo la quitina el mayor componente de ambos. Usualmente la virulencia de los hongos se asocia a la actividad quitinolítica de las quitinasas extracelulares (Mondal *et al.*, 2016; Hamid *et al.*, 2013).

2.5.3.1. Importancia y características de las quitinasas en los HE.

Las quitinasas han recibido especial atención debido al rol que desempeñan en el control biológico de insectos plaga y hongos fitopatógenos. Las quitinasas han sido divididas en 2 grupos principales: endoquitinasas (E.C 3.2.1.14) y exoquitinasas. La endoquitinasas cortan en lugares al azar los polímeros de la quitina en sitios internos formando dímeros de di-acetilquitobiosa y multímeros solubles de bajo peso molecular de GlcNAc tales como quitotriosa y quitotetraosa. Las exoquitinasas han sido divididas en dos subcategorías: quitobiosidasas (E.C.3.2.1.29) las cuales se encargan de catalizar la liberación progresiva de di-acetilquitobiosa comenzando por el lado no reductor y 1-4B-glucosaminidasas (E.C.3.2.1.30), cortando los productos oligoméricos de las endoquitinasas y las quitobiosidasas, generando así monómeros de GlcNAc. Las quitinasas de los hongos tienen un alto nivel de similitud con las quitinasas clase III de las plantas.

La mayoría pertenece a la familia 18 de la superfamilia de las glicosilhidrolasas. La estructura básica de la familia 18 de las quitinasas consiste en 5 dominios o regiones: (1) dominio catalítico, (2) región de señal N-terminal de péptido, (3) dominio de unión de quitina, (4) región rica en serin/treonina, y (5) región de la extensión C-terminal (Li, 2006). Las quitinasas de los hongos pueden ser divididas en tres diferentes subgrupos A, B y C, basados en la secuencia de aminoácidos de sus módulos de GH 18, estos subgrupos difieren en la arquitectura de sus sitios de unión, por consiguiente difieren en las actividades enzimáticas que realizan (exo y endo) (Eijsink *et al.*, 2008).

En contraste con muchas otras enzimas involucradas en degradación de substratos para propósitos nutricionales, las quitinasas tienen múltiples funciones en la biología de los HE (Seidl, 2008), dentro del subgrupo A las quitinasas están presentes durante el proceso de crecimiento y autólisis del hongo (White *et al.*, 2002), el subgrupo B son las quitinasas que se encuentran envueltas en el proceso de nutrición y durante el proceso de infección a los insectos, las cuales a diferencia de otras quitinasas los genes del subgrupo B están regulados por estimulación nutricional, en general son inducidas por la presencia de quitina, por otro lado, muchas de ellas son sobre expresadas durante estrés nutricional y son reprimidas en presencia de glucosa o fuentes de carbono fáciles de metabolizar (Hartl *et al.*, 2012).

2.6. Identificación de enzimas a través de estudios Proteómicos

En la era post-genómica, la proteómica se ha convertido en una herramienta poderosa para estudiar el proteoma y para examinar las alteraciones en los perfiles de proteínas. Similar a la genómica y a la transcriptómica, la proteómica permite rápidos análisis de un amplio conjunto de proteínas producidas en un momento dado. La proteómica envuelve la combinación de aplicaciones avanzadas como la separación de las proteínas basadas en el uso de geles llamadas electroforesis de una y dos dimensiones (1-DE y 2-DE), también hay otras técnicas libres de geles, como la cromatografía líquida (LC) y técnicas de

identificación tales como la espectrometría de masas (MS), también se utilizan herramientas de análisis y bioinformática para caracterizar a las proteínas en mezclas biológicamente complejas (González *et al.*, 2010). La proteómica en combinación con otras técnicas, constituyen una herramienta exitosa para proveer información importante acerca de factores de patogenicidad y virulencia, permite el análisis y la localización específica de las proteínas (proteoma a nivel de organelos, membrana celular, pared celular, proteínas secretoras, etc.), el estudio de modificaciones post-traduccionales y la interacción entre huésped-patógeno. En el caso de los hongos una nueva área es definida como secretómica, la cual es definida como la combinación de las proteínas nativas y la maquinaria celular envuelta en su secreción, sobre todo se refiere a las proteínas implicadas en la adhesión, penetración del tejido y efectores de la invasión con otros factores de virulencia (Marra *et al.*, 2006; Rampitsch *et al.*, (2006); Fernández y Novo, 2013). La proteómica es también una herramienta para identificar expresión de proteínas de los HE bajo distintas condiciones e inductores (Tabla 4) y se ha aplicado para identificar los perfiles de las proteínas secretadas al medio durante el proceso de infección (Harit *et al.*, 2018).

2.11. El concepto de agresividad y virulencia en la patología de insectos

La agresividad de una cepa se mide en función de; si es patogénica y el nivel de virulencia, sin embargo, desde la década de los 40's la definición de estos últimos dos conceptos dentro de diferentes disciplinas han sido tema de discusión y lo mismo ha ocurrido dentro del área de patología de invertebrados. Autores como Shapiro y colaboradores (2004) definen que específicamente, patogenicidad es la cualidad de ser patogénico, la habilidad potencial de un organismo de producir enfermedad, mientras que la virulencia es el poder de un organismo de producir enfermedad, el grado de patogenicidad dentro de un grupo de especies. En la Tabla 3 se presentan algunas de las definiciones que distintos autores han dado sobre patogenicidad y virulencia.

Autor	Patogenicidad	Virulencia
Steinhaus and Martignoni (1970)	Cualidad o el estado de ser patogénico. La habilidad de producir enfermedad.	El poder de un organismo de producir enfermedad. El grado de patogenicidad dentro de un grupo de especies.
Aizawa (1971)	La habilidad de una muestra o de cierta especie de organismos que producen enfermedad en varios huéspedes.	Grado de patogenicidad contra una especie de huésped en condiciones controladas dentro de un grupo de especies o microorganismos
Cantwell (1974)	La cualidad de ser patogénico.	La cualidad de ser virulento, la cualidad de ser venenoso; el poder de producir enfermedad de un microorganismo
Tanada and Fuxa (1987)	La habilidad de invadir y dañar los tejidos del huésped. Aplicado a grupos o especies de patógenos	El poder de producir enfermedad de un patógeno, la habilidad de invadir y dañar los tejidos del huésped. EL grado de patogenicidad de un grupo de especies.
Tanada and Kaya (1993)	Sinónimo cercano a virulencia pero aplicado a grupos o especies	El poder de producir enfermedad de un microorganismo. La habilidad de un microorganismo de invadir y causar daño al huésped. La capacidad relativa de un microorganismo de debilitar los mecanismos de defensa del huésped. El grado de patogenicidad dentro de un grupo de especies.
Lacey and Brooks (1997)	La cualidad o el estado de ser patogénico. La habilidad potencial de producir enfermedad aplicado a grupos o especies	El poder de un organismo de producir enfermedad. El grado de patogenicidad dentro de un grupo de especies.
Thomas and Elkinton (2004)	El número de individuos muertos relacionado al número de individuos expuestos a un patógeno	El número de individuos muertos relacionado al número de individuos infectados.

Tabla 3. Definiciones y discrepancias de patogenicidad y virulencia dentro del área de patología de invertebrados, según los autores mencionados (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004).

NÚMERO DE ACCESO*	DESCRIPCIÓN
A0A0A2W0R3	Pr1A Alkaline serine protease
A0A0A2VW01	Pr1B Alkaline protease 1
A0A0A2VRL8	l-ascorbate peroxidase
A0A0A2VJ73	Alpha galactosidase
A0A0A2VDM1	Putative glycosidase crf1
A0A0A2VIV9	(Cysteine hydrolases) protein
A0A0A2VJP2	ATP dependent RNA helicase glh 2
A0A0A2VQS8	Cell_wall_mannoprotein_1
A0A0A2V7C2	Beta-1,3 exoglucanase (Carbohydrate-binding WSC domain)
A0A0A2V928	Catalase peroxidase
A0A0A2VPJ3	Extracellular aldono-Lactonase
A0A0A2VSY1	Subtilisin like proteinase Spm1
A0A0A2VUK5	Endo chitosanase
A0A0A2V8V1	Vacuolar protease A
A0A0A2VHX5	Six-hairpin glycosidase GH13
A0A0A2VL54	Autolysin (Lysine Motif, LysM domain-containing protein)
A0A0A2VR76	Carboxypeptidase Y A
A0A0A2V6S0	LysM motifs (double) protein
A0A0A2VB74	Endo beta N acetylglucosaminidase F2
A0A0A2VDW0	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily
A0A0A2VFU8	Thioredoxin reductase
A0A0A2VG14	Chitinase D
A0A0A2VKM6	Metallo-Zn-Carboxypeptidase A-like protein (M14A)
A0A0A2VMQ3	Fluoride ion transporter
A0A0A2VUX9	Putative dipeptidyl peptidase 5
A0A0A2VWX1	Alpha N arabinofuranosidase
A0A0A2VZ64	Glucan 1,3 beta glucosidase
A0A0A2W0E3	Tripeptidyl peptidase sed2
A0A0A2W0S0	Lipase 1
A0A0A2V532	Chitinase, Glycosyl hydrolase 18 family (GH18)
A0A0A2VAD7	Small secreted protein
A0A0A2VC64	Glutathione reductase
A0A0A2VCD5	Transcription factor Opi1
A0A0A2VCZ9	Neutral cholesterol ester hydrolase
A0A0A2VDJ2	Hypoxia up-regulated protein 1
A0A0A2VES3	Regulation of enolase protein 1 (DUF1349)
A0A0A2VFI0	Cytochrome oxidase assembly protein 1
A0A0A2VFS0	Dolichyl phosphate mannose protein mannosyltransferase 1
A0A0A2VGF4	Putative serine protease S8 K12H47-like
A0A0A2VJQ2	Assimilatory nitrite reductase (NirD) small subunit
A0A0A2VM88	Putative alpha beta glucosidase agdC
A0A0A2VMZ6	RNA pyrophosphohydrolase (Nudix)
A0A0A2VR04	Putative 60S ribosomal protein MRP49
A0A0A2VRG8	Putative U3 small nucleolar RNA-associated protein
A0A0A2VW39	tRNA Guanine 37 N1 methyltransferase
A0A0A2W0I5	Pre rRNA processing protein esf1
A0A0A2W3A3	Beta glucosidase
A0A0A2W457	3 phosphate dehydrogenase

A0A0A2W4E7	Ribose import ATP binding protein RbsA
A0A0A2WIE5	Aspartic protease
A0A0A2W0I5	Pre rRNA processing protein esf1

Tabla 4. Proteínas presentes al cuarto día en el sobrenadante de *B. bassiana* en presencia de insecto (Tomada y modificada de Dionisio et al., 2016).

*Números de acceso de Genbank e InterPro.

3. JUSTIFICACIÓN

La agresividad de una cepa de HE radica en el conjunto de factores que son necesarios para iniciar la infección en el hospedero. Los factores más importantes son las enzimas extracelulares, dentro de las cuales, se les ha otorgado un papel primordial a las quitinasas, y se ha asumido que en el inicio de la infección son fundamentales para atravesar la primera barrera física que es el exoesqueleto de los insectos. Sin embargo, en un trabajo previo realizado dentro del laboratorio de control microbiano, se identificaron tres cepas que aun cuando tienen infectividad verificada hacia insectos, aparentemente no presentan actividad quitinolítica. De este modo, en este trabajo se plantea caracterizar cepas infectivas de hongos entomopatógenos que no presentan actividad quitinolítica y ver su correlación con la patogenicidad y virulencia de las cepas.

4. HIPÓTESIS

A las quitinasas de los hongos entomopatógenos se les ha otorgado un papel primordial para dar inicio a la infección del hospedero, siendo que existen cepas de hongos entomopatógenos infectivas a las que no se les ha detectado actividad quitinolítica, consideramos que la presencia de quitinasas no es fundamental para la infección del hospedero.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cepas infectivas de hongos entomopatógenos con base a su actividad quitinolítica y su relación con la infectividad

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar la ausencia de actividad quitinolítica en tres cepas de hongos entomopatógenos.
2. Analizar el perfil de proteínas extracelulares secretadas al medio en cepas con y sin actividad quitinolítica.
3. Evaluar mediante bioensayos en laboratorio, si existe correlación entre nivel de agresividad y la actividad quitinolítica, evaluada con base en los valores de CL_{50}

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se utilizaron un total de cinco cepas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología y Control Microbiano de Plagas del Colegio de Postgraduados Campus Campeche. La selección de las cepas se hizo con base en un estudio previo del que más adelante se hará mención, en el cual, mediante la utilización de un kit de medición de diferentes actividades enzimáticas se determinó que una cepa de *M. anisopliae* y dos cepas de *B. bassiana*, no presentaron actividad de quitinasa. Estas correspondieron a dos cepas de *M. anisopliae* y tres cepas de *B. bassiana*, cuyo origen se muestra en la Tabla 5.

CLAVE	ESPECIE	ORIGEN	Fenotipo*
Ma008	<i>M. anisopliae</i>	<i>Calakmul (suelo)</i>	Quitinasa -
Ma005	<i>M. anisopliae</i>	<i>Champoton (Cercopidae)</i>	Quitinasa +
Bb005	<i>B. bassiana</i>	<i>Calakmul</i>	Quitinasa +
Bb017	<i>B. bassiana</i>	<i>Calakmul (suelo)</i>	Quitinasa -
Bb019	<i>B. bassiana</i>	<i>Calakmul (suelo)</i>	Quitinasa -

Tabla 5. Nombre y origen de las cepas de estudio

*El fenotipo fue evaluado en este trabajo, por lo que se modificó durante el desarrollo del mismo.

6.2 Diseño experimental

Uno de los primeros pasos para este trabajo fue comprobar la ausencia de actividad quitinolítica (Chi-) en las cepas Ma008, Bb019 y Bb017, para lo cual se siguió el diseño experimental mostrado en la figura 7. Las presumibles Chi-, fueron confrontadas contra una cepa de cada especie que en un trabajo previo se reportó actividad de quitinasa (Pech-Chuc, 2013).

Las cepas se crecieron en medio rico definido para producir biomasa suficiente para que el micelio posteriormente se continuara creciendo en medio mínimo en presencia y ausencia de quitina (con inducción, y sin inducción).

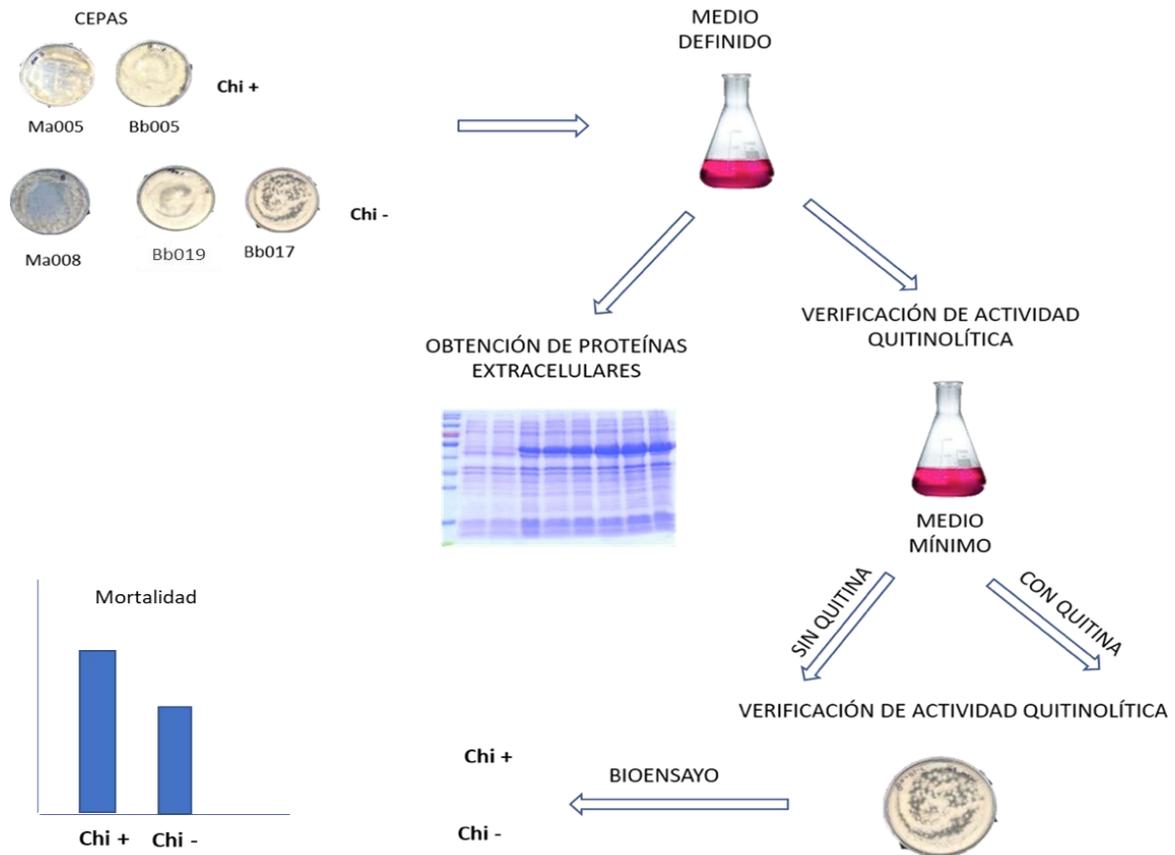


Figura 7. Diseño experimental realizado en este trabajo. Las cepas referidas en el esquema fueron evaluadas para verificar primero su condición de ausencia de producción de quitinasa. Para lo cual se crecieron en medio mínimo bajo condiciones de inducción y no inducción, utilizando como inductor quitina coloidal. Así mismo se determinó si bajo la condición de inducción había alguna modificación en la expresión de proteínas totales al medio de cultivo. Una vez determinada la de alguna cepa como no productora de quitinasa (Chi-), se evaluó para determinar si la condición de no producir quitinasa se veía reflejada en una baja infectividad, con relación a una cepa productora de quitinasa. También se caracterizó a nivel de las estructuras de reproducción asexual.

6.3. Obtención de cepas y mantenimiento.

Las cepas fueron recuperadas a partir del cepario mediante sembrado por estrías en cajas Petri con medio comercial PDS (Papa Dextrosa Sabouraud) Marca BD Bioxon. Se sembraron un total de tres cajas Petri por cepa. Una vez esporuladas las cajas se utilizaron para generar el resto de cultivos derivados de cada cepa para los diferentes experimentos realizados en este trabajo.

6.4. Crecimiento en medio líquido para la obtención de biomasa, obtención de proteínas extracelulares y evaluación de actividad quitinolítica.

6.4.1. Producción de Biomasa

A partir de cajas Petri previamente esporuladas, se cortaron seis tiras de medio de cultivo con esporas de aproximadamente 5 mm de grosor y 1 cm de largo, y fueron colocadas en un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de una solución de tritón al 0.01%, para la liberación de las esporas los tubos se mantuvieron en agitación por 5 minutos. El sobrenadante se recuperó por decantación y se distribuyó en tubos cónicos de 2 ml y se centrifugaron en una centrífuga MicroCL 17R de Thermofisher durante 5 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se resuspendió en 100µl de agua destilada estéril. Se estimó la concentración de esporas con un hematocitómetro de Neubauer (ver procedimiento) y se calculó el número total de esporas en 100 µl. Una vez determinado el número de esporas totales, las esporas se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) marca BD Bioxon, agregando la cantidad requerida en µl para tener un inóculo inicial de 1×10^6 esporas. Los matraces se colocaron en una incubadora de la marca Thermo scientific modelo MaxQ 4450, a 28°C en agitación a 180rpm durante 3 días para cada experimento.

Este mismo procedimiento se realizó para cada una de las cepas a evaluar, realizando 3 repeticiones biológicas.

6.4.2. Obtención de proteínas extracelulares.

Los matraces se colocaron en una incubadora de la marca Thermo scientific modelo MaxQ 4450, a 28°C en agitación a 180rpm por 3 días. Al tercer día se recuperó el micelio por filtración (Figura 8), para obtener micelio en cantidad igual y libre del medio rico (CDS) este se pesó y se enjuagó con medio mínimo. El micelio recuperado se colocó en matraces con 25 ml de medio mínimo (NaCl 0.003%, MgSO4 0.03% y KHPO4 0.015%) (Kaur y Padmaja, 2009) y con 25 ml de medio mínimo con quitina (grado práctico de Sigma®) como inductor, ambas condiciones fueron colocadas nuevamente a 28°C en agitación a 180rpm por 3 días. Al tercer día se filtraron los sobrenadante almacenándolos a -20°C hasta su uso. El micelio filtrado fue conservado a -80°C para futuros análisis. Los sobrenadantes se utilizaron para obtener las proteínas extracelulares presentes en el medio.



Figura 8. Crecimiento fúngico para la producción de micelio, precipitación de proteínas extracelulares totales, y determinación de actividad quitinolítica. El micelio obtenido a partir de medio rico se utilizó como inóculo para su crecimiento

en medio mínimo. A) producción de biomasa en medio CDS, B) obtención de sobrenadante, C) peso de micelio.

6.4.3. Precipitación de proteínas

Las proteínas secretadas al medio se obtuvieron mediante la técnica de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (Sivaraman, 1997). Los sobrenadantes de los cultivos obtenidos para la extracción de proteínas extracelulares almacenados a -20°C fueron descongelados a 4°C , una vez descongelados se les vertió una solución de TCA al 10% por 24 horas, después de este tiempo el sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 30 minutos, el sobrenadante se eliminó dejando únicamente 1 ml del mismo para resuspender las proteínas, se pasaron a tubos cónicos de 1.5 ml y se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla 3 veces con 500 μl de acetona fría al 100%, centrifugando por 5 minutos a 12500 rpm a 4°C entre cada lavado, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 150 μl de agua Ultrapura. Las muestras se almacenaron a -20°C .

6.5. Determinación de proteínas extracelulares mediante gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

6.5.1 Presencia e integridad de proteínas

Para verificar la presencia, peso e integridad de proteínas extracelulares vertidas al medio mínimo bajo condiciones de inducción y sin inducción, se verificó la presencia de proteínas mediante el corrimiento de una muestra en un gel de poliacrilamida: se preparó un gel de acrilamida/bis-acrilamida al 12% (ANEXO), utilizando un gel concentrador al 4%, Se cargaron un total de 16.7 μl . El gel se corrió en un sistema de electroforesis vertical (BioRad) a 60 V, una vez que las proteínas pasaron del gel concentrador al gel separador se cambió la potencia a 100 V constantes por 1 hora 25 minutos.

Para la visualización de las bandas en los geles, después de ser retirados de los cristales y lavado con dH₂O, se colocaron dentro de una solución de tinción al 0.1% de Phitagel Blue R por 60 minutos, después de ese tiempo, los geles se enjuagaron nuevamente con dH₂O y se procedió a desteñir con una solución desteñidora (ANEXO), durante 70 minutos, se colocaron piezas de toallas de papel que se iban intercambiando durante este periodo para la absorción del colorante que se iba desprendiendo del gel, transcurridos los 70 minutos los geles se retiraron de la solución para desteñir y se colocaron en dH₂O en recipientes herméticos para su conservación y obtención de imágenes.

6.6. Determinación de actividad enzimática

Se utilizó el kit Chitinase Assay Kit Catalog Number CS0980 de Sigma basado en la hidrólisis enzimática de sustratos de quitinasa. Esta hidrólisis libera *p*-nitrofenol, el cual, bajo una ionización en pH básico puede ser medido colorimétricamente en charolas de 96 pozos (Figura 9) a 405 nm. Para cuantificar la actividad quitinolítica total se llevaron a cabo reacciones separadas con los tres sustratos que proporciona el kit (4-nitrofenol N,N'-diacetil-β-D-quitobiosa, 4-Nitrofenol N-acetil-β-D-glucosamina y 4-Nitrofenol β-D-D-N,N,N''- triacetil quitotriosa) utilizando como control positivo, quitinasa de *Tricoderma viride*, la solución estándar es *p*-nitrofenol, y la solución de paro de reacción de carbonato de sodio, todos incluidos en el Kit. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante: la solución estándar y los sustratos se equilibraron a 37°C por media hora en baño seco, una vez equilibrados se colocaron los sustratos y después las muestras a evaluar la actividad quitinolítica, y que correspondieron al sobrenadante obtenido de cultivos crecidos bajo las condiciones mencionada en el punto 6.2. Se incubó la reacción por 30 minutos en horno a 37°C deteniendo la reacción agregando 200 μl de solución de paro y se midió la reacción a 405 nm en el multilector de placa VICTOR 2030 de Perkin Elmer.

Las unidades de actividad enzimática definidas como: una unidad es capaz de liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol del sustrato apropiado por minuto a pH 4.8 y 37°C se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(A_{405} \text{ muestra} - A_{405} \text{ blanco}) \times 0.05 \times 0.3 \times \text{DF}}{A_{405} \text{ estándar} \times \text{tiempo} \times V_{\text{enz}}}$$

Donde:

A_{405} muestra = absorbancia de la muestra at 405 nm

A_{405} blanco = absorbancia del blanco a 405 nm

0.05 = $\mu\text{mol/ml}$ de *p*-nitrofenol en la solución Standard

0.3 = volumen final de la placa de 96 pozos después de la reacción al agregar la solución de paro (ml)

DF = Factor de dilución – las veces que se diluyó la muestra original

A_{405} estándar = absorbancia de la solución estándar a 405 nanómetros

tiempo = minutos de incubación

V_{enz} = volumen de la muestra (ml)

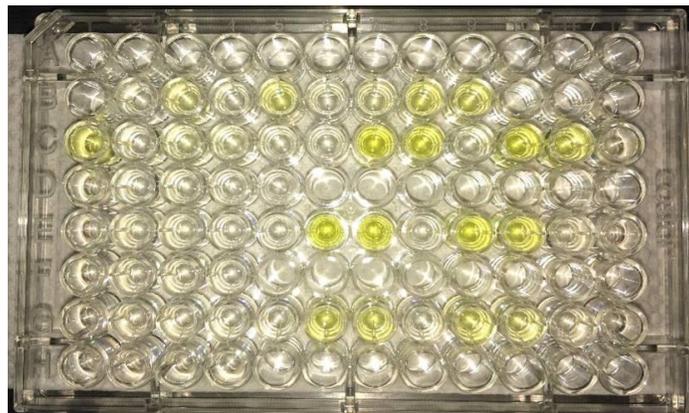


Figura 9. Evaluación de actividad quitinolítica mediante la determinación de la presencia *p*-nitrofenol (coloración amarilla) en el medio de crecimiento de los HE.

6.7. Detección de actividad quitinolítica mediante tinción con calcofluor.

Se determinó la actividad quitinolítica mediante un ensayo utilizando tinción con Calcofluor Blanco (Zou *et al.*, 2002) el cual tiene como característica el enlace con la quitina, pero no con las moléculas de b-1,4 N-acetil glucosamina (Mahea e Ishida, 1965). En cajas Petri con medio mínimo (NaCl 0.003%, MgSO₄ 0.03% y K₂HPO₄ 0.015%), agar al 2% y quitina hidrolizada con el método de Hankin y Anagnostakis (1975), se hicieron pozos de 2mm de profundidad con pipeta plástica de serología y se colocaron dentro de las perforaciones 10µl de una solución con 1x10⁸ conidios. Se dejaron en incubación a 27°C por 5 días, posteriormente se observó en luz UV (Figura. 10) en el fotodocumentador MultiDoc-it Digital Imaging System UVP marca Analytikjena para determinar la actividad quitinolítica.

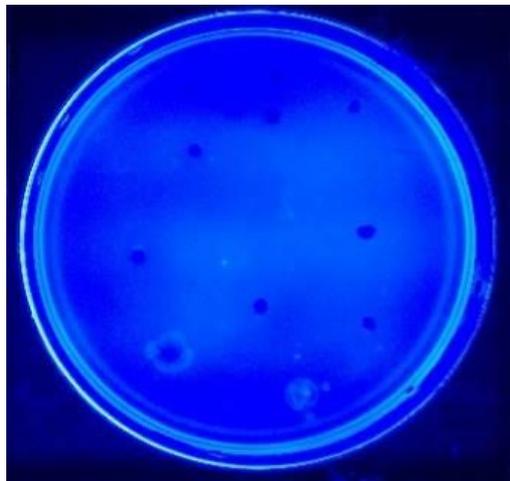


Figura 10. Caja Petri bajo luz UV, para ensayo cualitativo de actividad quitinolítica.

6.8. Bioensayos para la evaluación de la infectividad y agresividad de las cepas no productoras y productoras de quitinasa.

Se realizaron bioensayos para establecer si había correlación entre la expresión de quitinasa con la infectividad y la agresividad de las cepas. En primero lugar se trató de evaluar sobre un organismo modelo de evaluación que se utiliza comúnmente debido a su alta susceptibilidad a entomopatógenos. Este es el caso

de la Palomilla de la cera (*Galleria mellonella*) (Figura 11) la cual se cuenta con una colonia con más de 10 generaciones en laboratorio. Previo al bioensayo, se produjeron conidios para las evaluaciones con el procedimiento señalado en la siguiente sección.

6.8.1. Producción de inóculo para la evaluación de la infectividad

Bolsas de arroz se inocularon con las cepas a evaluar y dejaron hasta su maduración de acuerdo al procedimiento de producción masiva estandarizado en la Unidad de Producción de Bioinsecticida (UPBIO®) del Campus Campeche.

En un contenedor diseñado específicamente para ese uso en la UPBIO®, 10 kg de arroz se mantuvieron en remojo durante una hora. Posteriormente se drenó el agua y enjuagó el arroz dos veces con agua corriente. Posteriormente en bolsas de polipapel de 2 kg de capacidad, se depositaron alrededor de 250 g de arroz una vez que se drenó el excedente de agua. Las bolsas fueron selladas y esterilizadas durante 20 minutos a 15 libras y 121° C en autoclave HICLAVE™ modelo HVE-50. Una vez esterilizadas y que alcanzaron la temperatura ambiente fueron inoculadas con 20 ml de una solución con micelio previamente crecida durante 3 días a partir de cultivos previamente esporulados. Las bolsas se dejaron madurar durante tres semanas y estas produjeron la cantidad suficiente para todos los bioensayos.



Figura 11. a) Frascos con dieta y con larvas en primer y segundo instar de *G. mellonella*. b) Larva de *G. mellonella*

6.8.2. Recuperación de esporas y preparación de diluciones seriales.

A partir de bolsas esporuladas de cada cepa, se recuperaron aproximadamente 10 g de arroz con esporas en un tubo cónico de 50 ml previamente pesado. Se agregaron 20 ml de agua destilada estéril con Triton® X-100 (surfactante no iónico) al 0.001% para liberar las esporas. Se recuperó el sobrenadante hacia tubos cónicos de 15 ml, enjuagando dos veces para recuperar el mayor número de esporas. El tubo de 15 ml se centrifugó a 45000 rpm en una centrifuga clínica Durafuge100, durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y las esporas concentradas se resuspendieron en 1.5 ml de agua destilada estéril y se almacenaron en un tubo cónico de 2.0 ml de capacidad.

La suspensión de esporas se cuantificó en una cámara de Neubauer de la manera siguiente. Se realizaron diluciones seriales con un factor de 10 hasta 10^{-4} (10000 veces). Se verificó en el microscopio de contraste de fases aquella dilución a la cual se pudiera contar con facilidad. Se realizaron un total de 10 conteos y se aplicó la siguiente fórmula para obtener la concentración final expresada en conidios/ml.

Conidios totales= $\frac{(\text{Promedio del conteo}) (\text{dilución}) (1 \times 10^6)}{80}$

80

Una vez determinada la concentración de la solución concentrada se hicieron los cálculos necesarios para obtener diluciones seriales con las siguientes concentraciones: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 esporas/ml.

6.8.3. Evaluación de la infectividad sobre *Galleria mellonella*.

Se evaluaron un total de 15 larvas de tercer estadio temprano para cada concentración más un control sin aplicación, solo agua destilada. En función de la susceptibilidad reportada para esta especie, se evaluaron dos métodos de inoculación: aplicando los conidios directamente sobre la región dorsal, y

sumergiendo la larva en la suspensión de conidios directamente secando el excedente sobre un papel filtro (Figura.12).

Las larvas fueron depositadas en cajas Petri con dieta artificial (Anexo). Se evaluó durante siete días, registrando la mortalidad a partir del tercer día. El mismo procedimiento se utilizó para cada aislamiento.



Figura 12. A) Bioensayo 1 con larvas de *G. mellonella* a las cuales se les colocó 0.2 μ l con esporas a distintas concentraciones y se colocaron en cajas Petri con dieta. B) Bioensayo 2, larvas de *G. mellonella* sumergidas en solución con esporas a distintas concentraciones y colocadas en tubos cónicos de 2 ml con una porción de 0.2g de alimento.

6.8.4. Evaluación de la infectividad sobre *Sitophilus granarius*.

Se utilizó la cría de gorgojo del maíz *S. granarius* que se tiene en el laboratorio de Control Microbiano de Plagas, con más de 15 generaciones en el laboratorio.

Se evaluaron un total de 15 adultos para cada concentración más un control sin aplicación, solo agua destilada. Cada individuo se sumergió en la suspensión de esporas y el excedente se absorbió con un papel filtro. Los 15 individuos correspondientes a una concentración a evaluar, fueron depositados en una caja Petri de plástico estéril con 10 gr de granos de arroz (Figura 13) y un algodón humedecido que proporcionará suficiente humedad para el desarrollo de la infección de los HE.

Se evaluó durante siete días, registrando la mortalidad a partir del tercer día.

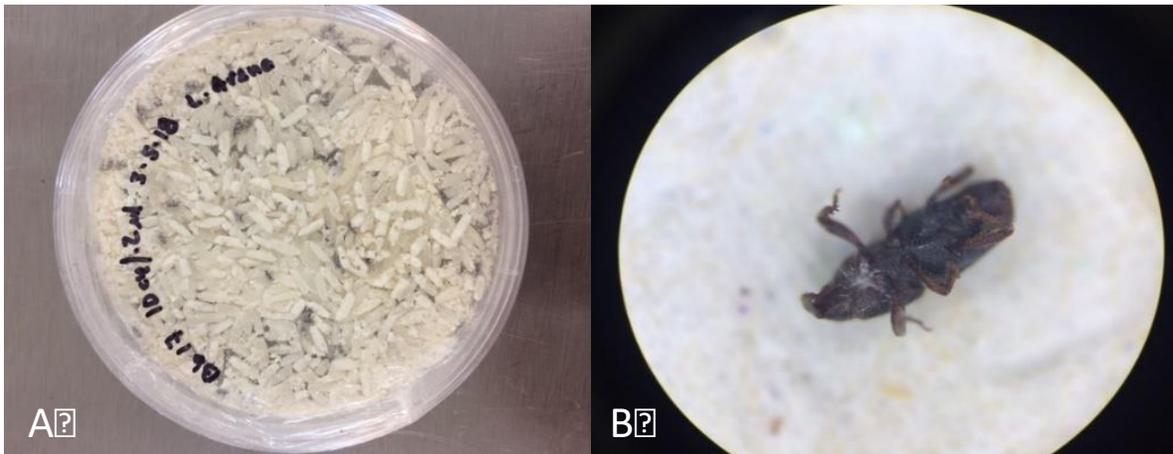


Figura 13. A) Caja Petri con granos de arroz y *S. granarius* previamente sumergidos en solución con esporas a diferentes concentraciones. B) *S. granarius* infectado con HE.

6.8.5. Evaluación de la infectividad sobre *Tetranychus urticae*.

Se utilizó una colonia de *Tetranychus urticae* (Figura 14) establecida en el laboratorio de Control Microbiano, y el protocolo establecido para un trabajo simultáneo (Alfaro, 2019, en preparación). Se evaluaron un total de 15 hembras adultas para cada concentración más un control sin aplicación, solo agua destilada. Por su tamaño no es posible aplicación por inmersión por lo que se siguió el siguiente procedimiento: círculos de hojas de papaya con un diámetro de 2.6 cm², se impregnaron por inmersión con una solución de 10⁸ hasta 10⁴ esporas/ml. Los círculos se colocaron dentro de cajas Petri sobre recuadros de espuma verde de floristería húmedos (Figura 15), en una solución de cloro al 0.05% (para retardar el crecimiento de saprofitos). Los ácaros fueron depositados con ayuda de un pincel y un microscopio estereoscópico para evitar daño a los individuos. Se evaluó durante siete días, registrando la mortalidad a partir del tercer día.



Figura 14. Hembra adulta de *Tetranychus urticae* estado morfológico sobre el que se realizaron todos los bioensayos.

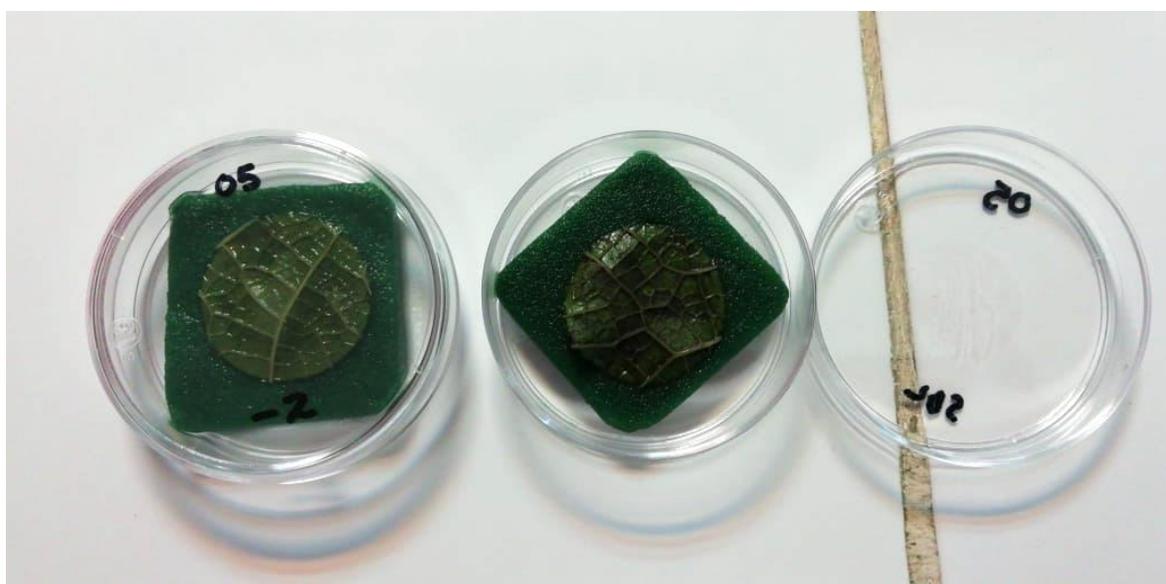


Figura 15. Círculos de hojas de papaya utilizadas en el bioensayo, tanto como alimento como para vehículo de los conidios para la infección de las hembras adultas de *T. urticae*.

6.9 Microcultivos

Con el fin de observar si existían diferencias del crecimiento y en la formación de conidióforos entre las cepas con y sin actividad quitinolítica se prepararon microcultivos; para cada cepa se colocó sobre un porta objetos un corte de medio

solido de papa dextrosa agar (PDA) con antibiótico (Rifampicina 300) al 30%, sobre el cual se pusieron 10 µl de esporas recuperadas de medio esporulado, se le colocó un cubreobjetos (Figura 16), todas las cepas en 3 repeticiones y se mantuvieron en cámara húmeda por 3 días a 27°C. Al tercer, cuarto y sexto día se retiraron los cubreobjetos para observar al microscopio el crecimiento y diferencias de desarrollo entre las cepas.

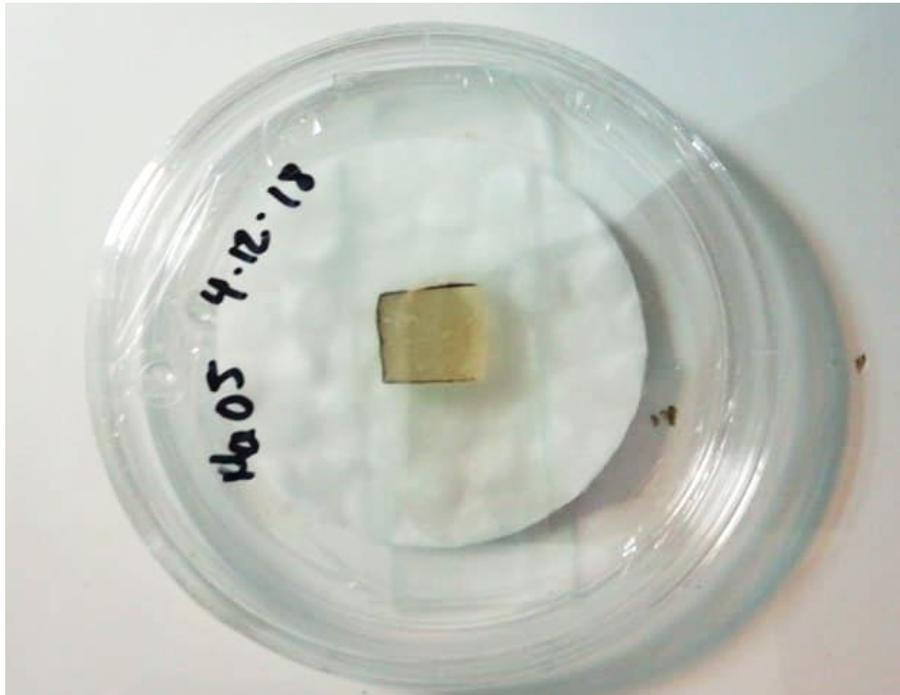


Figura 16. Crecimiento de HE en microcultivo para la caracterización de las estructuras de reproducción asexual y la morfología de micelio y conidios. Los microcultivos se observaron diariamente por un período de seis días.

7. RESULTADOS

7.1. Proteínas extracelulares

La presencia de proteínas extracelulares recuperadas por precipitación y corridas en geles de poliacrilamida nos demostraron claras diferencias en la obtención de proteínas entre las diferentes condiciones de crecimiento. En todos los casos se observó que la menor producción de proteína ocurrió cuando las cepas fueron crecidas en medio rico definido (CDS), lo cual fue observado por el número de bandas obtenidas en comparación con las obtenidas en las otras dos condiciones de crecimiento; medio mínimo, y medio mínimo con quitina como inductor (Figura 17 y 18). Como se puede observar en la figura 17 la mayor inducción de proteínas extracelulares se da bajo la condición de crecimiento en medio mínimo, sin inductor.

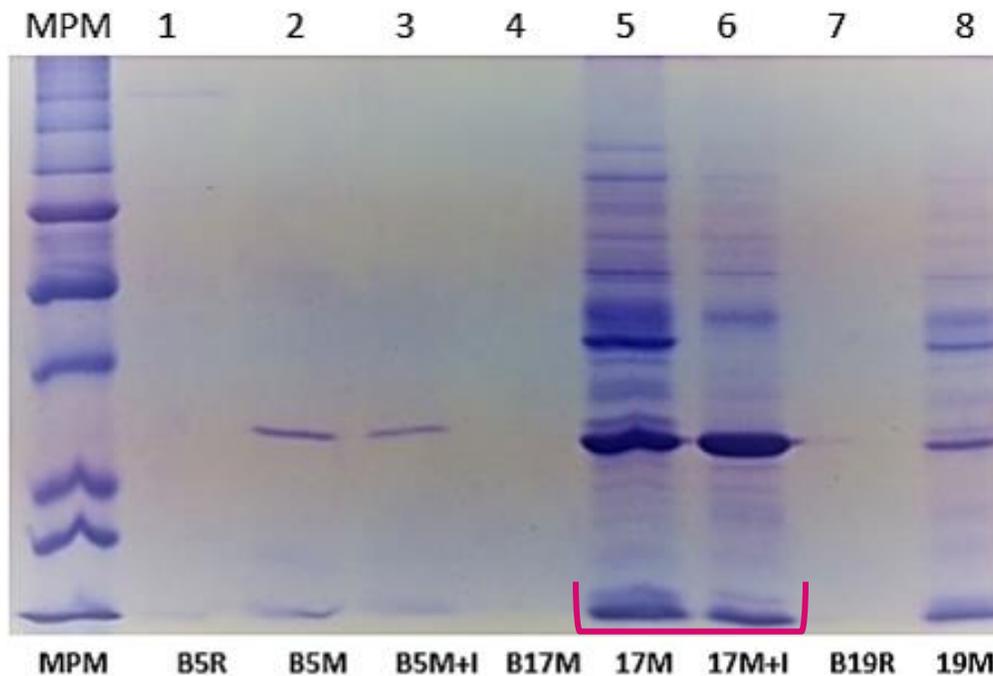


Figura 17. Obtención de proteínas extracelulares por precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Las condiciones de crecimiento son indicadas en cada carril (R=Medio rico, M=medio mínimo, M+I=medio con inducción). Nótese la ausencia de bandas en la condición de crecimiento en medio rico y el aumento considerable de proteínas (número de bandas) en crecimiento con medio mínimo y en

presencia de inductor: carriles 5 (muestra Bb017 M), 6 (muestra Bb017 M+I) y 8 (muestra Bb019 M).

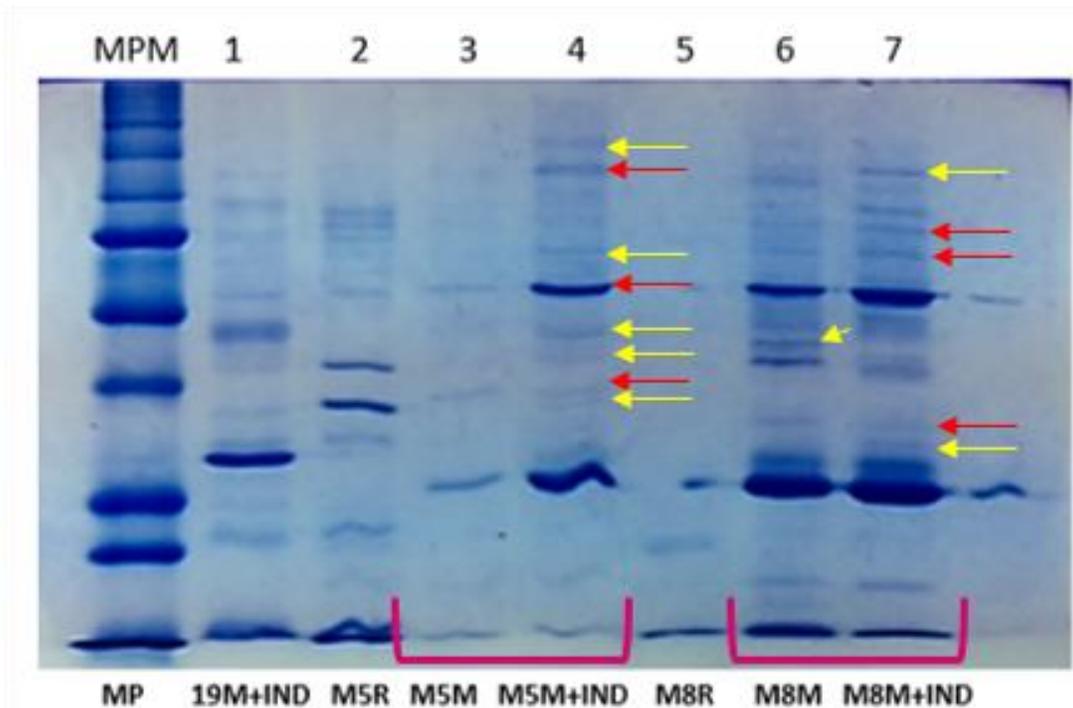


Figura 18. Obtención de proteínas extracelulares por precipitación con ácido tricloro-acético (TCA). Las condiciones de crecimiento son indicadas en cada carril (R=medio rico, M=medio mínimo, M+I=medio con inducción). Carril 1: Bb019 M+I, Carril 3: Ma005 M, Carril 4: Ma005 M+I, Carril 6: Ma008 M, Carril 7: Ma008 M+I. Las flechas amarillas señalan presencia de bandas distintas entre ambas condiciones, las flechas rojas señalan bandas presentes en ambas condiciones pero con intensidad distinta.

Así mismo, al comparar las bandas obtenidas en las cepas de *B. bassiana* se observa que la presencia del inductor (quitina) no es un factor que haya provocado la inducción de más proteínas o proteínas diferenciales en esta condición de crecimiento. En el caso de la cepa de *M. anisopliae* Ma005, esta si produjo una cantidad de proteínas significativa en medio rico, que permitió ver la presencia de bandas, pero que casi ninguna correspondió a las bandas presentes bajo la condición medio mínimo, y medio mínimo más inductor (ver figura 18, carril 2). La cepa de *B. bassiana* Bb005 produjo una cantidad mínima de proteína en las tres

condiciones (Figura 17, carriles 1,2 y 3); así mismo de las cepas *B. bassiana* Bb017 y *M. anisopliae* Ma008, se obtuvo un mayor número de bandas , en la condiciones de medio mínimo y medio mínimo más inductor (Figuras 17 y 18).

7.2. Análisis cualitativo de actividad de quitinasa.

El método de tinción con calcofluor está basado en la unión de este a las moléculas de quitina, en ausencia de la misma esta unión no ocurre. Un ensayo previo utilizando esta metodología nos permitió observar mediante análisis cualitativo la presumible ausencia de actividad quitinolítica en alguna de nuestras cepas. En el experimento realizado todas las cepas fueron evaluadas bajo crecimiento en cajas Petri con agarosa, medio mínimo y quitina hidrolizada. El ensayo nos indicaba la presumible ausencia de actividad quitinolítica exclusivamente en las cepas Ma005 y Ma008 (Figura 19). Los resultados no se tomaron como conclusivos ya que la técnica del calcofluor presentó problemas en la tinción y aunque hubo repeticiones, la presencia de halos que indicaba presumible actividad de quitinasa, no fueron suficientemente claros que nos permitieran con este ensayo aceptar o descartar alguna de las cepas. Este ensayo se realizó de manera complementaria al ensayo enzimático de actividad de quitinasas.

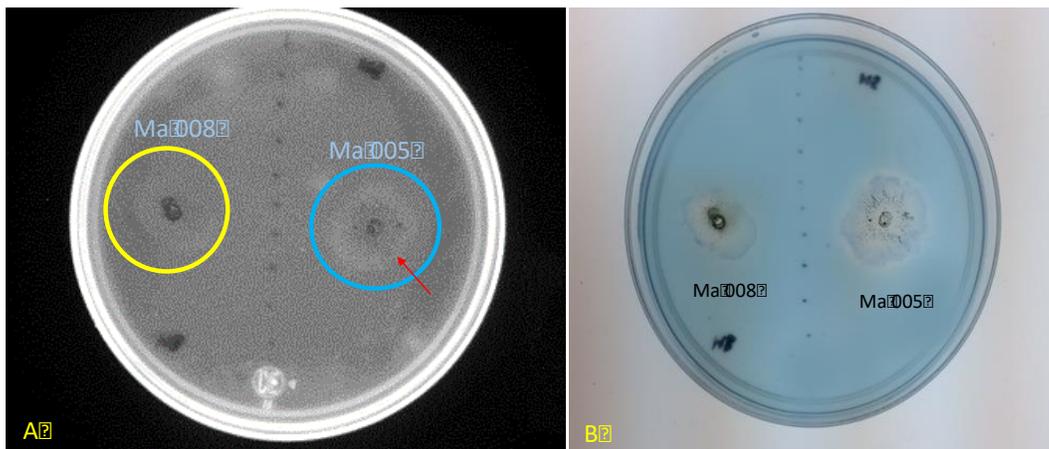


Figura 19. Crecimiento de las cepas Ma005 y Ma008 en agarosa más quitina coloidal. Se puede apreciar A) un halo blanco (flecha roja) alrededor de la sombra que se formó por el crecimiento del micelio de la cepa Ma005, el halo blanco no se

tiñó por el calcofluor lo que indica actividad quitinolítica. En la cepa Ma008 (círculo amarillo) únicamente se observa la sombra ocasionada por el crecimiento micelial, no se aprecia actividad quitinolítica. B) foto tomada en transiluminador donde se aprecia el crecimiento micelial alrededor de los pozos para las mismas dos cepas de *M. anisopliae*, se observó una halo de aproximadamente un mm alrededor del crecimiento de la colonia.

7.3. Cuantificación de proteínas secretadas al medio

Se cuantificaron las proteínas secretadas al medio de las tres repeticiones biológicas de los medios de cultivo donde crecieron las cepas (con inducción y sin inducción). En base a los resultados obtenidos de la cuantificación (Figura 20) se pudo observar que las cepas Bb005, Ma005 y Ma008 tienden a producir mayor número de proteínas bajo inducción, mientras que las cepas Bb017 y Bb019 tienden a mantener la cantidad de proteínas excretadas al medio.

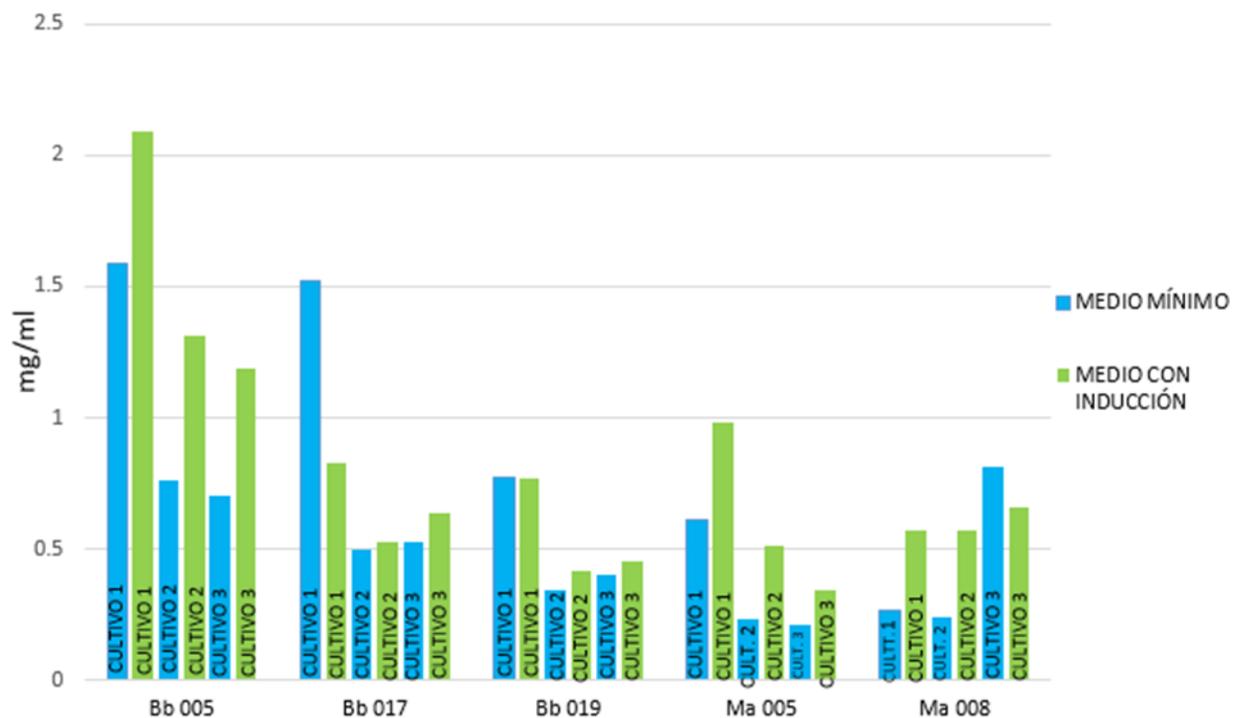


Figura 20. Cuantificación de proteínas secretadas al medio de cultivo bajo 2 condiciones, sin inducción y con inducción.

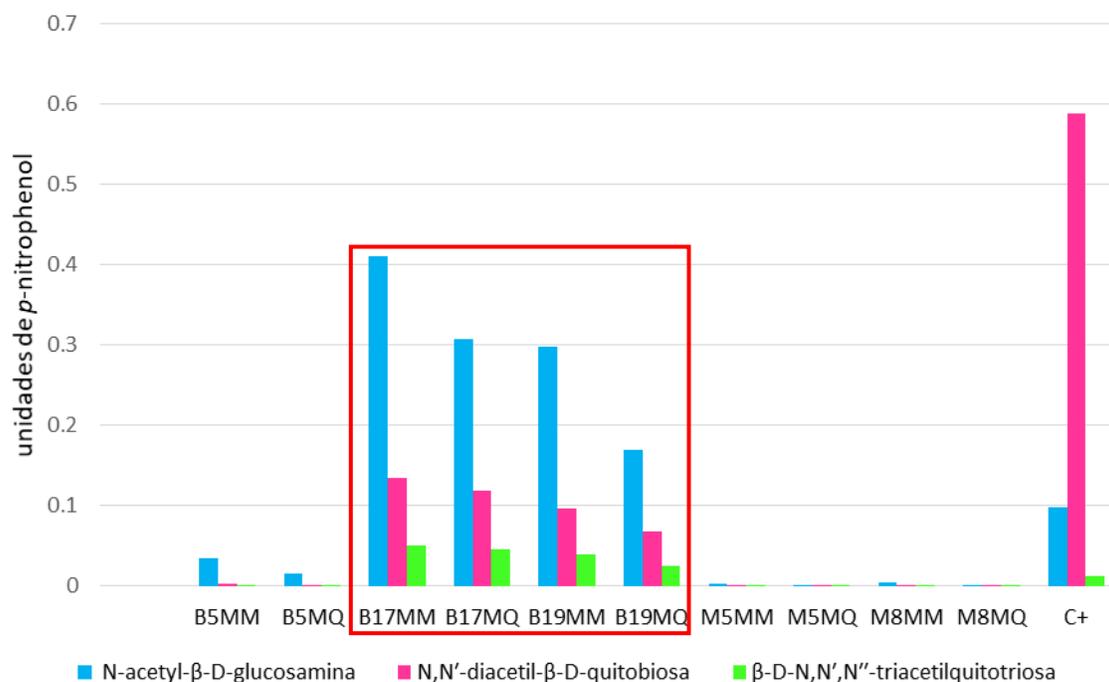
7.4. Actividad de quitinasa determinada enzimáticamente.

Las cepas de HE fueron evaluadas bajo tres condiciones de crecimiento: medio rico definido, medio mínimo e inducción en medio mínimo. Las condiciones de medio mínimo y medio mínimo más inductor, son condiciones de estrés que favorecen la expresión de enzimas extracelulares de acuerdo con la literatura (Hartl *et al.*, 2012). En la tabla 6 se presentan los resultados de la evaluación de actividad quitinolítica específica, que así mismo determina tanto actividad de endoquitinasas como actividad de exoquitinasas. De este modo, y con base en los resultados, las cepas de *M. anisopliae* Ma005 y Ma008, y la cepa de *B. bassiana* Bb005 (Figura 22) presentaron los valores más bajos de actividad, muy por debajo de la quitinasa control que incluye el kit (quitinasa de *Trichoderma*) la cual es una enzima purificada y concentrada.

CEPA	CONDICIÓN	ACTIVIDAD		
		N-acetil	Quitobiosa	Triacetil quitotriosa
HBb005	MM	0.03467	0.00369	0.00197
	MM + Q	0.01519	0.00059	0.00069
	MR	0.04308	0.00160	0.00162
HBb017	MM	0.41042	0.13454	0.05023
	MM + Q	0.30838	0.11848	0.04595
	MR	0.00650	0.00059	0.00063
HBb019	MM	0.29754	0.09625	0.03916
	MM + Q	0.16945	0.06735	0.02600
	MR	0.00446	0.00064	0.00075
HMa005	MM	0.00384	0.00074	0.00054
	MM + Q	0.00155	0.00059	0.00030
	MR	0.01078	0.00103	0.00122
HMa008	MM	0.00432	0.00042	0.00088
	MM + Q	0.00205	0.00023	0.00018
	MR	0.00536	0.00093	0.00102
CONTROL		0.09754	0.58817	0.01201

Tabla 6. Valores de actividad específica de quitinasa (N-acetil-Glu), endoquitinasa (quitobiosa, que es un dímero de N-acetil-Glu) y exoquitinasa (Triacetil quitobiosa, que es un trímero de N-acetil-Glu) para las cinco cepas evaluadas (indicadas en cada columna). La tabla muestra los valores (Unidades/ml) obtenidos para cada actividad. En azul los valores del control del kit (quitinasas purificadas de *Trichoderma*). En rojo se muestran todos los valores que quedaron por debajo del valor obtenido para la quitinasa control.

Las cepas de *B. bassiana* Bb017 y Bb019 tuvieron valores por encima del control para el caso de los tres actividades. Este resultado se puede apreciar mucho mejor de manera gráfica en la figura 21, y de manera visual en la figura 23. En todos las cepas, las actividades presentaron valores por debajo del control cuando fueron crecidas en medio rico definido, lo que fue observado en la obtención de proteínas totales (ver geles de la sección 7.1.). Se realizó una segunda determinación, utilizando en la evaluación exclusivamente los aislamientos que no presentaron actividad quitinolítica de la misma especie (*M. anisopliae*), obteniendo el mismo comportamiento que en el primer ensayo (con diferentes valores de actividad).



* Una unidad libera 1.0 μmoles de p-nitrofenol por el sustrato que se utilice

Figura 21. Gráfica de actividad quitinolítica. Se observa que las cepas *B. bassiana* 017 y *B. bassiana* 019 si presentan actividad quitinolítica con los tres sustratos (recuadro rojo). **MM**=medio mínimo, **MQ**=medio mínimo con quitina como inductor, **C+**=Control positivo corresponde a quitinasa de *T. viride*.

MUESTRA	GLUCOSAMINIDE	CHITOBIOSIDE	TRIACETILQUITOTRIOSIDE
TRICO C+	0.142290373	0.042994194	0.041470345
M5MM	0.002750883	0.000361997	0.000545112
M5MQ	9.0824E-05	0.000270256	-1.78125E-05
M8MM	0.001909265	0.000151454	0.000200633
M8MQ	0.001903139	-0.000351697	-7.75857E-05

* Una unidad libera 1.0 μ moles de *p*-nitrofenol por el sustrato que se utilice.

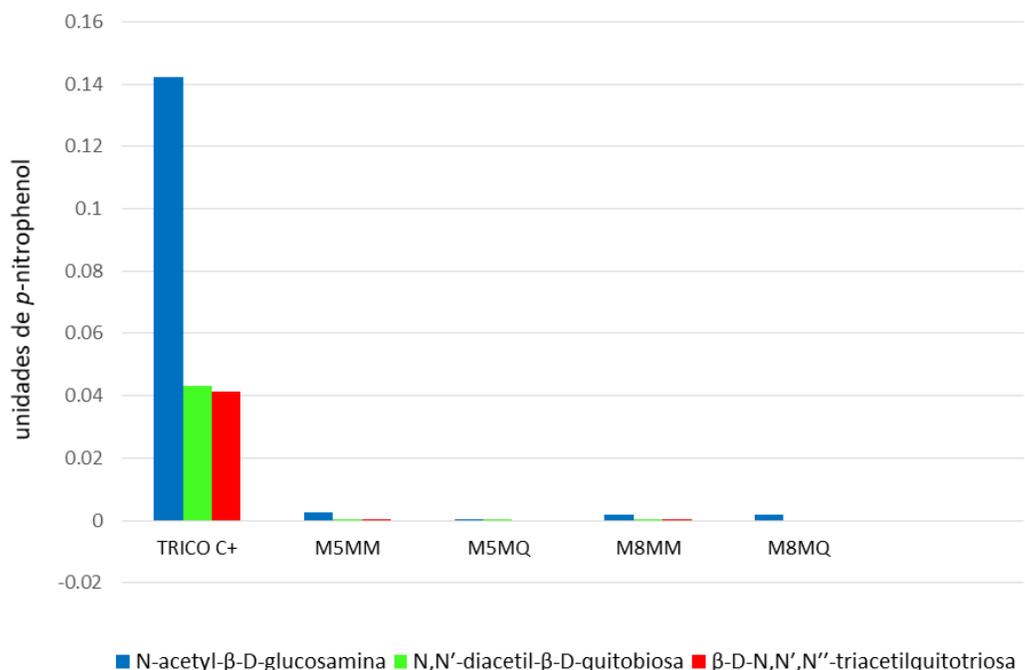


Figura 22. Gráfica y valores de actividad correspondientes a un segundo análisis de actividad enzimática. La cepa Ma008 presentó menor actividad e incluso valores negativos respecto a las unidades de *p*-nitrofenol liberadas. El recuadro superior presenta las unidades enzimáticas de las proteínas extracelulares secretadas bajo las distintas condiciones de crecimiento. MM=medio mínimo, MQ=medio mínimo con quitina como inductor, C+=Control positivo corresponde a quitinasa de *T. viride*.

Durante el ensayo enzimático se pudo observar el cambio de coloración de las muestras y la intensidad del mismo como se puede apreciar en la figura 22, esto se debe a que durante la reacción enzimática se libera *p*-nitrofenol, para cualquiera de los tres sustratos, todo esto sucede en un ambiente ácido (pH 4.8).

Cuando se aplica la solución de paro que es carbonato de sodio a una alta concentración, el *p*-nitrofenol se ioniza y se convierte en *p*-nitrofenilato que es amarillo.

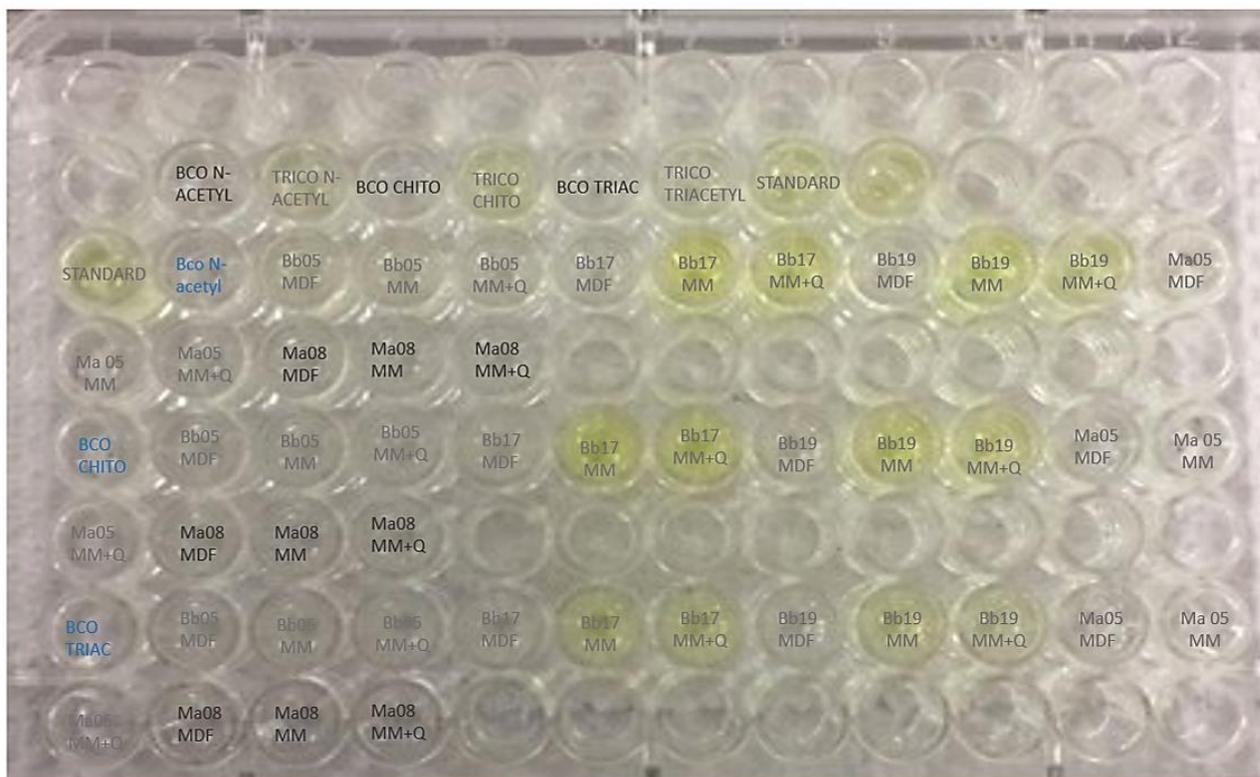


Figura 23. Placa de 96 pozos donde se puede visualizar el cambio de coloración en las muestras que liberaron *p*-nitrofenol.

7.5. Bioensayos

Una vez confirmada la ausencia de actividad quitinolítica para las cepas Ma005 y Ma008, mediante bioensayo se evaluó si la ausencia de esta actividad correlaciona con la agresividad de la cepa. Puesto que la evaluación solo puede ser comparable con cepas de la misma especie, en este trabajo los resultados de las actividades para la cepa Ma005 y Ma008 se evaluaron mediante bioensayo en *G. mellonella* (Lepidoptera: Noctuidae), *S. granarius* (Coleoptera: Curculionidae) y *T. urticae* (Acari: Tetranychidae). Los resultados fueron inconsistentes y no fueron

reproducibles con las dos primeras especies. Puesto que a la par de este trabajo se estaba realizando un trabajo de susceptibilidad de *T. urticae* a todo el cepario de HE del Laboratorio de Control Microbiano de Plagas, no se realizaron evaluaciones específicas sobre las cepas de *B. bassiana*, sino que se tomaron como referencia; se realizó el ensayo de manera exclusiva para las cepas de *M. anisopliae* Ma005 y Ma008 en *T. urticae*, cuyo ensayo ya estaba estandarizado y resultó altamente reproducible y no se había realizado en el trabajo previo mencionado (Pech-Chuc, 2013). En la Figura 24 se presentan los resultados de mortalidad de *T. urticae* en respuesta a los aislamientos Ma005 y Ma008. La cepa Ma005 presentó la mayor agresividad, ya que la dosis menor evaluada (1×10^4 conidios/ml), presentó una mortalidad del 90% de la población evaluada, mientras que Ma008 solo alcanzó una mortalidad del 50%. En las dosis evaluadas *T. urticae* mostró mayor susceptibilidad a Ma005. En la gráfica de la figura 25 se presentan los datos de mortalidad (preliminares) para las cepas de *B. bassiana* Bb005, Bb017 y Bb019, obtenidos no en este trabajo, sino en un trabajo paralelo (Alfaro-Valle, 2019, en preparación).

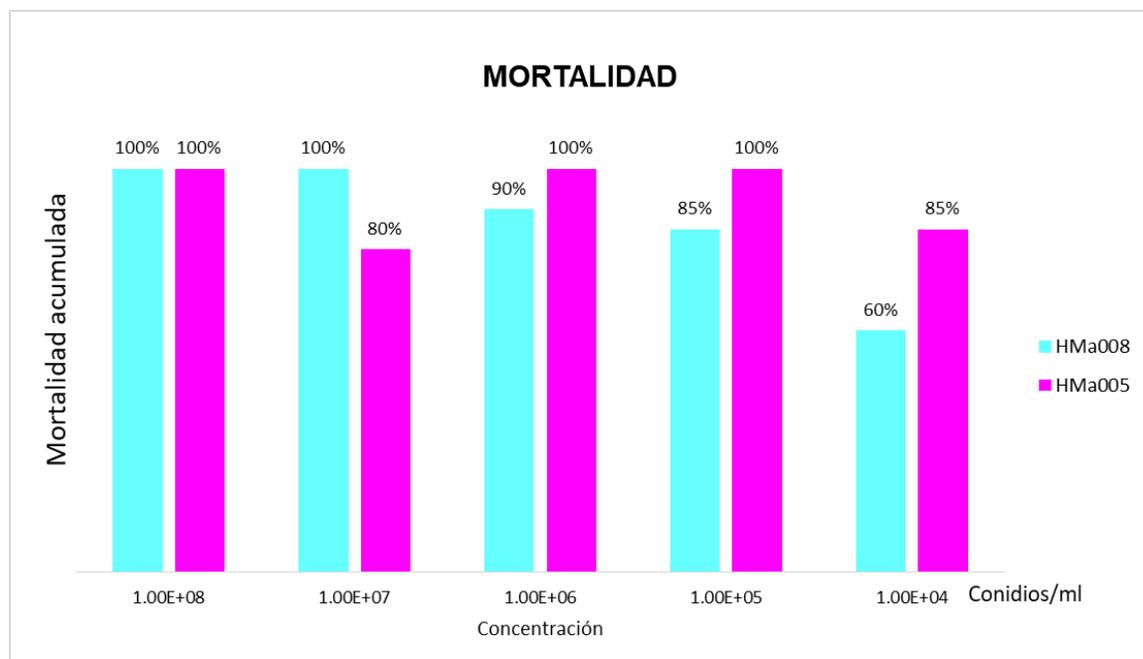


Figura 24. Gráfico de dosis contra mortalidad de *T. urticae* evaluado en su susceptibilidad a las cepas Ma005 y Ma008. Se presentan los datos totales de mortalidad, evaluada durante 7 días.

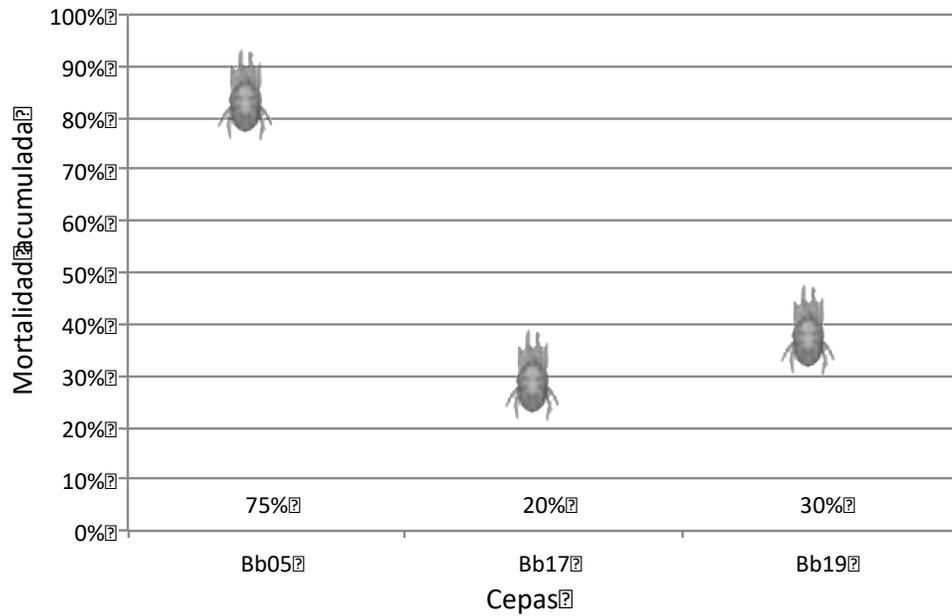


Figura 25. Mortalidad obtenida para las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* indicadas en la figura. Las mortalidades resultantes corresponden a la evaluación de una sola dosis (1×10^8 conidios/ml). Los datos corresponden a un trabajo que actualmente se realiza en otra investigación (Alfaro-Valle, 2019).



Figura 26. *T. urticae* infectados mediante bioensayo. A) Ceba Ma008 al cuarto día de la infección. B) Ceba Ma005 al cuarto día de la infección. C) Ceba Ma005 al séptimo día de la infección. D) Ceba Ma008 al séptimo día de la infección.

7.6. Microcultivos

Esta actividad se realizó con el fin de caracterizar morfológicamente a los aislamientos y detectar si existían diferencias en las estructuras reproductivas o bien algún comportamiento particular en las colonias. Se pudo confirmar que el medio de cultivo y el procedimiento fueron correctos ya que hubo formación de micelio y estructuras reproductivas, también al observar los cultivos se logró apreciar que no había diferencias durante el crecimiento y desarrollo entre las cepas de una misma especie. Respecto a las cepas de *M. anisopliae* Ma005 y Ma008, al tercer día ambas desarrollaron los conidióforos y también se observaba formación de algunos conidios (Figura 27) al sexto día en ambas cepas se observaron conidios abundantes sin que se notara alguna diferencia entre la abundancia de las estructuras.

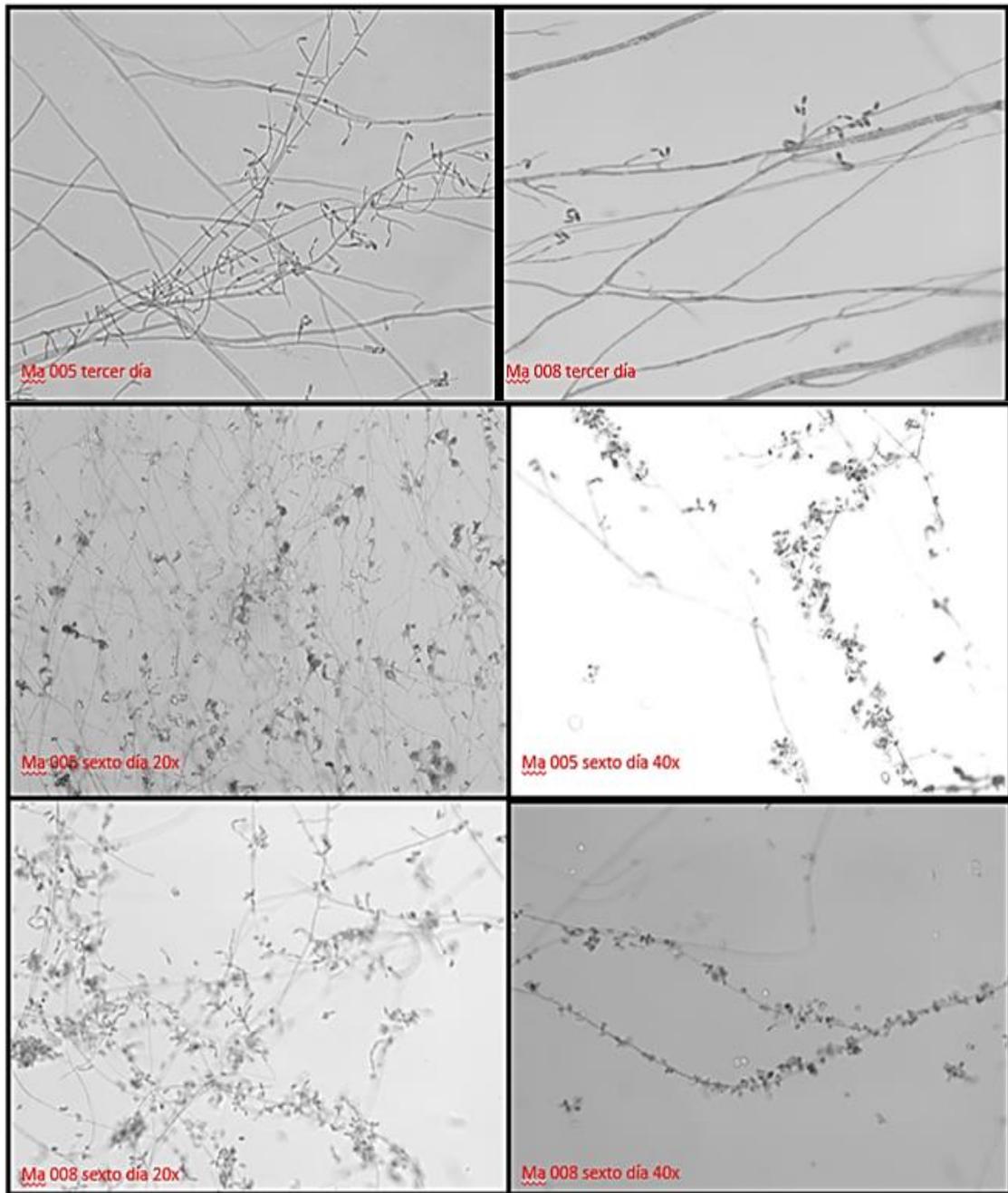


Figura 27. Fotos de microcultivos tomadas con microscopio de fluorescencia con sistema confocal modelo LSM700 marca ZEISS®. A partir del tercer día no se observaron diferencias durante el desarrollo de las cepas en cuanto a formación de conidióforos y conidios se refiere. Respecto al sexto día ambas cepas mostraron desarrollo de hifas, conidióforos y conidios abundantes.

8. DISCUSIÓN

En una investigación previa a este trabajo se reportó, con base en un ensayo semicuantitativo la posibilidad de que tres cepas de HE (Bb017, Bb019, Ma008) no tuvieran actividad de quitinasa (Pech-Chuc, 2013). El ensayo se realizó con un kit no específico diseñado para detectar actividad de enzimas bacterianas. Adicionalmente se incluyeron en este trabajo dos cepas más (Bb005 y Ma005) de las cuales ha sido demostrada su agresividad en contra de varias plagas insectiles en la península de Yucatán (Lara, 2018, comunicación verbal), y que incluso se venden comercialmente. En este trabajo, se determinó la actividad enzimática específica para quitinasas y se demostró que las cepas más agresivas que se han utilizado durante años en la región, no presentaron actividad quitinolítica. En un trabajo realizado por Screen y colaboradores en 2001, ellos reportaron en base a sus resultados que al haber sobreexpresado un gen codificante de una quitinasa, la cepa del hongo no presentó alteración en cuanto al nivel de patogenicidad sobre el insecto modelo que ellos utilizaron, lo que sugiere que la actividad de quitinasas no es el único el factor que influye sobre la patogenicidad de una cepa, ni mucho menos es determinante en dicho proceso como se pensaba previamente. De igual forma el resultado obtenido de los bioensayos realizados en este estudio con las dos cepas de *M. anisopliae* Ma005 y Ma008, productora y no productora de quitinasa respectivamente, sugiere que la quitinasa no juega un papel fundamental en la agresividad de las cepas. Hasta donde llega nuestro conocimiento no existen publicados otros trabajos relacionados con el estudio y detección de cepas productoras o no productoras de quitinasas, puesto que siempre se ha asumido que las quitinasas son parte fundamental, si no es que uno de los factores principales junto con las proteasas, durante todo el proceso de infección, por lo que este trabajo se puede considerar pionero en la búsqueda de los factores clave durante la primera etapa del proceso infectivo de los hongos entomopatógenos.

En el caso de las cepas de *B. bassiana* que si presentaron actividad, se pudo observar que de los tres sustratos utilizados para determinar la actividad enzimática el N-acetil-quitobiosido (actividad exoquitinasas) fue el que presentó

mayor actividad mientras que el sustrato N-triacetilquitotriosa (actividad endoquitinasa) fue el que se hidrolizó menos eficientemente, esto da la pauta para seguir investigando éstas cepas para abundar en el mecanismo de acción de estas enzimas. Aún cuando el objetivo de este trabajo fue caracterizar aquellas cepas que no presentan actividad quitinolítica, es importante estudiar bioquímicamente estas enzimas para poder establecer un modelo detallado del proceso de infección, que aparentemente es cepa-dependiente.

8.1. Proteínas extracelulares

De los geles obtenidos de la electroforesis en una dimensión, se observaron diferencias entre la presencia de bandas de una misma cepa pero bajo distintas condiciones (con inducción o sin inducción), también se pudieron observar que bandas presentes en ambas condiciones presentaban diferencia de intensidad (véase figuras 18 y 19). Nuestros resultados nos permiten decir que la precipitación por TCA resultó efectiva para obtener las proteínas que los HE secretaron al medio durante el periodo de incubación, sin embargo, se pudo detectar durante la cuantificación que hubo diferencias de cantidad de proteína entre el sobrenadante sin precipitar y las proteínas ya precipitadas, creyendo así que probablemente en algunos casos la cantidad real de proteínas presentes en el sobrenadante, no son el total de proteínas que se pudieron observar en el gel. Por lo que se propone en un futuro hacer tinciones con colorantes más sensibles de tal manera que logremos visualizar el mayor número de proteínas recuperadas de los sobrenadantes.

Cabe destacar que en los carriles de las muestras sometidas al crecimiento en medio mínimo, se pudieron detectar mayor número de bandas que en los carriles con inducción, como fue claramente visible en las cepas de *B. bassiana* Bb017 y Bb019 y en ambas cepas de *M. anisopliae* Ma005 y Ma008. Asociamos que esto es el resultado del crecimiento bajo condiciones de estrés debido a la ausencia de nutrientes en medio mínimo o a la producción de enzimas proteolíticas.

Respecto a la cuantificación de proteínas extracelulares totales secretadas al medio de crecimiento (punto 7.3) se observa que la cantidad de proteínas que produce cada una de las cepas en medio con inducción es mayor que a la cantidad de proteínas secretadas al medio mínimo, esto, en el caso de las cepas Bb005, Ma005 y Ma008. Se observa en Bb017 y Ma008 que existe un comportamiento distinto en uno de los cultivos (cultivo 1 y 3 respectivamente, figura 20), lo que podría asociarse que aparte de que las cepas tienden a comportarse de forma distinta aun viniendo del mismo cultivo, es probable que con quitina como inductor las cepas producen poca proteína o que las cepas al estar bajo esa condición pudiesen estar produciendo mayor número de proteínas proteolíticas que pudiesen estar degradando a las demás enzimas. La cepa Bb019 no presentó mayor cambio en cuanto a la cantidad de proteínas en el medio con inducción en ninguna de las 3 repeticiones biológicas que se llevaron a cabo.

8.2. Análisis enzimáticos

Respecto al análisis realizado con los sustratos usados para determinar la actividad endo y exoquitinolítica (kit para medir actividad enzimática específica) en las cinco cepas que se evaluaron, se puede confirmar que dentro de las cepas de una misma especie existen diferencias en cuanto al tipo de quitinasas que se expresan durante el proceso de la infección, por lo tanto en este trabajo podemos concluir que las enzimas quitinolíticas con actividad de exo- y endoquitinasas extracelulares en los HE no son las mismas incluso entre cepas de una misma especie bajo las condiciones evaluadas. En cuanto a las cepas de *B. bassiana* HBb 005 y de *M. anisopliae* en el experimento realizado con el kit, no presentaron actividad ni de exo- ni de endoquitinasas al ser evaluadas contra los sustratos que este provee, sin embargo, en el trabajo previo realizado por Pech (2013) se encontró que aparte de ser las cepas más agresivas, fueron a las que se les encontró mayor actividad quitinolítica, de igual forma dos de las tres cepas que también fueron evaluadas por Pech y que se creía no presentaba actividad de quitinasas resultó que las dos cepas de *B. bassiana*, no presentaban actividad

quitinolítica pero en el análisis que aquí reportamos además de presentar actividad de exo- y endoquitinasas son las que más eficientes para hidrolizar los sustratos. Únicamente una de las tres cepas que analizamos de *M. anisopliae*, la cepa Ma008, no presentó actividad ante ninguno de los sustratos presentes en el kit así como tampoco presentó actividad en el análisis enzimático realizado por Pech. Tomando estos resultados en conjunto podemos decir que las cepas de HE analizadas responden de manera sensible a las condiciones de crecimiento y que el ensayo enzimático utilizando un método semicuantitativo APIZYM® (bioMerieux) el cual consta de 20 micro cápsulas, las cuales contienen sustratos cromogénicos deshidratados que permiten detectar la actividad de 19 enzimas en bacteria sy no es específico de hongos filamentosos y el cual fue realizado por Pech, si bien es una herramienta para hacer un acercamiento exhaustivo de las principales actividades enzimáticas de los microorganismos no es un ensayo suficientemente fino y sensible para proponer un mecanismo de acción la infectividad de los HE.

8.3. Actividad quitinolítica en contratinción.

Durante el ensayo enzimático se detectó que las cepas de *M. anisopliae* Ma005 y Ma008 no registran actividad ni de exo- ni de endoquitinasas, y como se mencionaba en el punto anterior, la cepa Ma005 fue reportada por Pech (2013) como una de las cepas de las que se obtuvo como resultado mayor actividad quitinolítica, respecto a esta cepa en el experimento realizado a contratinción con calcofluor (Punto 6.7 de la sección de materiales y métodos) se observó un halo transparente en el medio alrededor del crecimiento micelial y no hubo tinción por parte del reactivo, lo que indica que alrededor del micelio no hay presencia de quitina por lo que se puede sugerir que Ma005 la utilizó como alimento degradándola del sustrato. Por otro lado, alrededor del crecimiento micelial de la cepa Ma008 si hubo tinción y no se detectó ningún halo transparente aunque cabe mencionar que la única diferencia entre ambas cepas fue que el tamaño del micelio era levemente menor en Ma008 que en Ma005.

8.4. Bioensayos

Durante el experimento se pudo encontrar que no hay una correlación directa entre la actividad quitinolítica de las cepas y la agresividad de las mismas al momento de la infección. Como se menciona en el punto 7.4 de Resultados, las cepas que se utilizan actualmente como bioinsecticidas comerciales provenientes de la UPBIO y que han presentado mayor agresividad al momento de ser aplicadas en bioensayos o en campo son las cepas Ma005 y Bb005, que en este trabajo no presentaron actividad quitinolítica, incluso la cepa Bb017, que presentó los valores más altos de actividad de quitinasas, fue la que menor mortalidad provocó en contra de *T. urticae* en comparación con las otras dos cepas *B. bassiana*. Por otro lado, la cepa Ma008, que tanto en el trabajo previo por Pech (2013) como en los resultados obtenidos con el ensayo enzimático previamente mencionado no presentó actividad de quitinasas, y resultó ser infectiva. Nuevamente, esto nos indica que la actividad quitinolítica de los HE es dependiente de cada cepa y que su presencia o ausencia en los sobrenadantes de cultivos de dichas cepas, responde de manera compleja ante las condiciones de crecimiento, por lo que nuevos acercamientos, tanto en la caracterización bioquímica de algunas de las enzimas, como en experimentos de presencia o ausencia de los genes de quitinasas y expresión de los mismos son necesarios para elucidar los mecanismos de acción.

8.5. Microcultivos

Respecto a las cepas en desarrollo en los microcultivos se pensó que podría haber alguna correlación entre el desarrollo de las cepas al momento del crecimiento y producción de conidios con respecto a la producción de proteínas extracelulares y específicamente enzimas quitinolíticas de una cepa, esta hipótesis surge dado que las diferencias como el tiempo de desarrollo de las cepas y el

periodo que tardan en producir estructuras reproductivas pudiera influir en la cantidad de enzimas extracelulares que producen estas cepas, sin embargo, esa posibilidad se descartó al momento de observar los microcultivos ya que no hubo diferencia detectable entre la formación de micelio y la producción tanto de conidióforos como de conidios durante el periodo de observación las cepas de *M. anisopliae* (Ma005 y Ma008) que se evaluaron. Se asume también que el sustrato utilizado fue el indicado ya que en todos los casos las cepas crecieron y produjeron estructuras reproductivas, sin embargo, para esta técnica (Microcultivos) se propone probar nuevos sustratos con quitina como inductor para observar el desarrollo y formación de estructuras de las cepas de interés.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Las cepas analizadas de *B. bassiana* Bb005, *M. anisopliae*, Ma005 y Ma008, no presentan actividad quitinolítica.
2. Las cepas de *B. bassiana* Bb017 y Bb019 presentan actividad de quitinasas, exoquitinasas y endoquitinasas contra los sustratos que se les aplicó.
3. La condición de crecimiento en medio rico definido, no favorece la producción de enzimas extracelulares.
4. Bajo las condiciones a las que fueron sometidas, las cepas presentan diferencias en la producción de proteínas.
5. La ausencia de actividad de quitinasas, no está relacionada con una pérdida en la agresividad.

En este trabajo podemos concluir que las enzimas quitinolíticas con actividad de exo- y endoquitinasas presentes en los HE no son las mismas incluso entre cepas de una misma especie y también que durante el proceso de infección no necesariamente son las quitinasas quienes logran degradar la cutícula, si no que dentro de las otras enzimas presentes puede haber otra que degrade en su mayoría los componentes del exoesqueleto y que las quitinasas se expresen poco o no se expresen, puesto que la parte de la cutícula que aunque en su mayoría es quitina, ésta se encuentra enlazada en una especie de entretejido junto con otras proteínas. Por lo tanto según los resultados de este trabajo podemos confirmar la hipótesis de que las quitinasas no son las más importantes durante el proceso de infección ni deben ser consideradas como único parámetro para medir agresividad en una cepa.

Se recomienda:

Hacer nuevos ensayos enzimáticos de actividad de quitinasas.

Probar otros métodos de precipitación de proteínas y comparar la cantidad de proteínas totales en el medio contra la cantidad de proteínas obtenidas de la precipitación. Separar a las proteínas por su punto isoeléctrico e identificar que otras enzimas están presentes durante el proceso de infección.

Hacer bioensayos finos y utilizar otros organismos modelo para observar el comportamiento de las cepas.

Llevar a cabo microcultivos con distintos tipos de sustratos adicionando quitina al medio para determinar si existe alguna correlación entre el medio de cultivo y el crecimiento micelial así como el desarrollo de conidióforos y la producción de conidios.

10. ANEXO

1. RECETA PARA GELES (2) DE POLIACRILAMIDA 12% (MANUAL BIORAD)

	Gel concentrador	Gel separador
	4%	12%
30% Acrylamide/bis	1.98 ml	6.0 ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 ml	
1.5M Tris-HCl, pH 8.8		3.75 ml
10% SDS	150 μ l	150 μ l
diH ₂ O	9 ml	5.03 ml
TEMED	15 μ l	7.5 μ l
10% PSA	75 μ l	75 μ l

2. DIETA PARA *Galleria Mellonella*

*Utilizar vaso medidor de 500ml

1L de salvado

500 ml de harina de maíz

150 ml de harina de trigo

50 ml de leche de vaca en polvo

3 cucharadas soperas de levadura de cerveza

150 ml de glicerina líquida

350 ml de miel de abeja

Mezclar primero los ingredientes secos, a parte, mezclar la miel con la glicerina una vez homogeneizados verter al resto de los ingredientes hasta formar una pasta. Almacenar hasta su uso en recipiente hermético a 4° C no más de 15 días.

3. Medio de cultivo rico definido Caldo dextrosa Saborauraud (CDS)

Para 1l de medio se pesan 30gr de CDS y se agregan a un matr az con agua destilada, posteriormente, se esteriliza a 121 C por 15 minutos. Importante dejar enfriar a temperatura ambiente antes de colocar los conidios para evitar que la alta temperatura del medio inactive la germinación de los mismos.

4. Medio mínimo (Kaur y Padmaja, 2009)

REACTIVO	PORCENTAJE
NaCl	0.003%
MgSO ₄	0.03%
K ₂ HPO ₄	0.015%

5. Buffer de corrida 10X (1 l)

REACTIVO	CANTIDAD
TRIS	30.30 g
Glicina	144.10 g
SDS	10 g
Agua destilada	1 l

6. Solución colorante Phitagel Blue para te nir los geles PAGE-SDS

REACTIVO	CANTIDAD
Metanol	225 ml
Pastilla Phitagel Blue R	1
�cido acético	46 ml
Agua destilada	230 ml

7. Solución desteñidora 1 l

REACTIVO	CANTIDAD
Metanol	200 ml
Etanol	100 ml
Ácido acético	150 ml
Agua destilada	650 ml

BIBLIOGRAFÍA

Adams, D.J., (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases, *Microbiology* 150:2029-2035.

Ali, S., Huang, Z. and Ren, S.X. (2009). Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae: Hypocreales), *Biocontrol Science and Technology*. 19: 81-89.

Charnley, A.K. (2003). Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. In: Callow JA (ed) *Advances in botanical research*. Academic, San Diego, pp 241–321

Cheong, P., Glare, T.R., Rostás, M. and Stephen, Haines, R. (2016). Chapter 14 Measuring Chitinase and Protease Activity in Cultures of Fungal Entomopathogens

De Faria, M. R., and Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256.

Dionisio, G., Kryger, P., and Steenberg, T. (2016). Label-free differential proteomics and quantification of exoenzymes from isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Insects*, 7(4):54

Eijsink, V.G., Vaaje-Kolstad, G., Varum, K.M. and Horn, S.J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends in Biotechnology*. 26(5):228–235.

Fang, W., Feng, J., Fan, Y., Zhang, Y., Bidochka, M.J., Leger, R.J.S. and 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

Fernández, R.G., Novo. J.V.J. (2013) Proteomic Protocols for the Study of Filamentous Fungi. In: Gupta V., Tuohy M., Ayyachamy M., Turner K., O'Donovan A. (eds) *Laboratory Protocols in Fungal Biology*. Fungal Biology. Springer, New York, NY.

Glare, T., Moran-Diez, M. (2016) *Microbial Base Biopesticides, Methods and protocols*. Humana Press. Nueva Zelanda.

Gonzalez-Fernandez, R., Prats, P. and Jorrin-Novo, J.V. (2010) Proteomics of plant pathogenic fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2010.

González-Fernández, R. and Jorrín-Novo Jesús V (2013). *Proteomic Protocols for the Study of Filamentous Fungi*, Springer New York. pp.299-308

Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J. and Javed, S. (2013). Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*; 5:21-9.

Hankin, L. and Anagnostakis S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3):597-607.

Harith, F. N., Abdul-Ghani, I. and Hassa, M. (2018). Proteomics as a tool for tapping potential of entomopathogens as microbial insecticides. *Insect biochemistry and physiology*. Jan; 100(1):21520

Hartl, L., Zach, S. and Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Springer. Appl Microbiol Biotechnol* 93:533–543

Hernández V., V. M., Berlanga, P., A. M. (1999). Uso de *Beauveria bassiana* como Insecticida Microbial. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. México.

Humber, R.A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98:262-266

Howard, R.W. and Blomquist, G.J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*. 50:371-393.

Kaur, G. and Padmaja, V. (2009). Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *Journal of Basic Microbiology*.49:264–274

Lara Reyna J. (2018). Comunicación verbal.

Li Duo-Chuan. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*.161: 345–360.

Maeda H, Ishida N. 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *Journal of Biochemistry*. Aug. 62(2):276-8.

Małagocka, J., Grell, M. N., Lange, L., Eilenberg, J. and Jensen, A.B. (2015). Transcriptome of an entomophthoralean fungus (*Pandora formicae*) shows molecular machinery adjusted for successful host exploitation and transmission, *Journal of Invertebrate Pathology*.128:47-56,

Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S.L., Ruocco, M. (2006) Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics*. 50:307–321

Mondal, S., Baksi, S., Koris, A. and Gyula, V. (2016). Journey of enzymes in entomopathogenic fungi *Pacific Science ReviewA: Natural Science and Engineering*.

Ortiz-Urquiza, A., and Keyhani, N.O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4:357–374

Pech Chuc. C. (2013). Diversidad genética y expresión diferencial de enzimas extracelulares en hongos entomopatógenos nativos de suelos del trópico mexicano. Tesis de Maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Campeche.

Rampitsch, C., Bykova, N.V., McCallum, B., Beimcik and E., Ens, W. (2006). Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible hostpathogen interaction. *Proteomics* 6:1897–1907

Resh, V. and Carde, R., (2003). *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science, USA. *Journal of Pathology*. 2012: 126819.

Samson, R.A., Evans, H.C., Latg, J.P., (1988). *Atlas of Entomopathogenic Fungi*, Springer, Berlin, Heidelberg,.

Sánchez-Pérez, C., Barranco-Florido, L., Rodríguez-Navarro, J.E., Cervantes-Mayagoitia, J.F. and Ramos-López, M.Á. (2014). Enzymes of Entomopathogenic Fungi, *Advances and Insights*. *Advances in Enzyme Re-search*, 2: 65-76

Sandhu, S.S., Sharma, A.K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., Sundeep Jaglan, Sharma, A. K., and Malhotra, S. (2012). Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation. *Journal of Pathogens*. Volume 2012.

Screen, S., Hu, G. y St. Leger R. (2001). Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* Show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78:260–266.

Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22:36–42.

Shapiro-Ilana, D.I., Fuxab, J., A. Lacey, L., Onstadd, D. W. and Kayae H.K. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88:1-7

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*. 19:627-662.

Sivaraman, T., Kumar, T.K., Jayaraman, G., Yu, C. (1997). The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation. *Journal of protein chemistry*. 16(4):291-7

St. Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts D.W., Staples R.C. (1992). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the

entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. European Journal of Biochemistry. 204 :991–1001

Sun M.H., Liu X.Z. (2006). Carbon Requirements of some entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. Mycopathology 161: 295-305

Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A. and Wiwat, C. (2010) Characterization of an Extracellular Lipase from the Biocontrol Fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and Its Toxicity toward *Spodoptera litura*. Journal of Invertebrate Pathology. 105: 228-235.

Téllez, J., A., Cruz, R., M. G., Mercado, F., Y., Asaff T. A. and Arana, C. A. (2009). Mecanismos de Acción y Respuesta en la Relación de Hongos Entomopatógenos e Insectos. Revista Mexicana de Micología. N° 30.

Wang, C., Typas, M.A. and Butt, T.M. (2002). Detection and characterization of Pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, FEMS Microbiology letters. Lett. 213:251-255.

White, S., McIntyre, M., Berry, D.R. and McNeil, B. (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi. Critical Reviews in Biotechnology 22(1):1–14.

Yu, G., Liu, J., Xie, L., Wang, X., Zhang, S. and Pan, H. (2012) Characterization, Cloning and Heterologous Expression of a Subtilisin-Like Serine Protease Gene *VIPr1* from *Verticillium lecanii*. Journal of Microbiology, 50:939-946.

Xiao, G., Ying, S.H., Zheng, P., Wang, Z.L., Zhang, S., Xie, X.Q., Shang, Y., St Leger, R.J., Zhao, G.P. and Wang, C. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Scientific Reports. 2: 483

Zhang, S., Widemann, E., Bernard, G., Lesot, A., Pinot, F., Pedrini, N. and Keyhani, N.O. (2012). CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Biological Chemistry. 287:13477-13486.

Zou X., Nonogaki H., and Welbaum, G.E. (2002). A gel diffusion assay for visualization and quantification of chitinase activity. Molecular Biotechnology. Sep;22(1):19-23.