



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES Y
ESPORAS DE *Lecanicillium lecanii* EN ARROZ - QUITINA DE
CAMARÓN Y EFECTO SOBRE *Brevycorine brassicae*”**

JHONY NAVAT ENRIQUEZ VARA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada **PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES Y ESPORAS DE *Lecanicillium lecanii* EN ARROZ - QUITINA DE CAMARÓN Y EFECTO SOBRE *Brevycorine brassicae*** realizada por el alumno **JHONY NAVAT ENRIQUEZ VARA**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR: _____
DRA. KEIKO SHIRAI MATSUMOTO

ASESOR: _____
DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR: _____
M.C. JORGE VALDEZ CARRASCO

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, julio 2008

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES Y ESPORAS DE *Lecanicillium lecanii* EN ARROZ – QUITINA DE CAMARÓN Y EFECTO SOBRE *Brevicoryne brassicae*.

Jhony Navat Enriquez Vara, M.C.

Colegio de Posgraduados, 2008

El objetivo del presente estudio fue utilizar arroz mezclado con quitina cruda de camarón como sustrato e inductor de quitinasas y proteasas de *Lecanicillium lecanii* en fermentación en medio sólido, además, se evaluó el efecto patogénico de conidios y enzimas producidas en medio sólido sobre el pulgón cenizo de la col. Cinco aislamientos de *L. lecanii* fueron caracterizados considerando el tamaño del conidio, la velocidad de germinación (GT₅, GT₅₀, y GT₉₅), crecimiento radial en placa en dos medios de cultivo, esporulación y virulencia. La correlación entre el tamaño del conidio, la tasa máxima de crecimiento en placa y la tasa específica de crecimiento fueron altamente significativas. *L. lecanii* ATCC 26854 fue seleccionado por presentar altos porcentajes de infección y por su alta producción de enzimas extracelulares en fermentación en medio sólido (FMS) y líquido (FML). El incremento del contenido de humedad en FMS, tanto en bolsas de polipapel y matraces de 250 mL mejoro de manera significativa la producción de proteasas, endoquitinasas, N-acetilhexosaminidasas así como la concentración de conidios (5.4 X 10⁸ conidia /gss). También se encontró que la máxima actividad de proteasas fue a las 120 horas de cultivo, las endoquitinasas a las 96 horas y β-N-acetilhexosaminidasas a las 120 horas, con rendimientos de 9.79 U/g sustrato en base seca, 3.96 U/g ss y 0.795 U/g ss, respectivamente. El rango de mortalidad con el extracto enzimático y conidios de *L. lecanii* sobre *Brevicoryne brassicae* fue mayor (TL₅₀ (95.3 horas)) comparado con la aplicación de conidios obtenidos en arroz o ADS (Agar-Dextrosa-Sabouraud). La mezcla de quitina cruda de camarón y arroz no produjo la cantidad de enzimas esperadas. Investigaciones posteriores podrán ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de virulencia entre aislamientos de *L. lecanii*.

Palabras clave: *Lecanicillium lecanii*, *Brevicoryne brassicae*, fermentación sólida, exo enzimas, quitina, quitinasas, proteasas, control biológico, virulencia.

**PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ENZYMES AND SPORES OF *Lecanicillium lecanii*
ON RICE-CHITIN OF SHRIMP AND EFFECT ON *Brevicoryne brassicae*.**

Jhony Navat Enriquez Vara, M.C.

Colegio de Posgraduados, 2008

The aim of this study was to utilize rice mixed with raw shrimp chitin both as substrate and inducer of chitinases and proteases of *Lecanicillium lecanii* in solid state fermentation, beside, the effect of conidia and enzymes produced in solid state fermentation was evaluated on the cabbage aphid. Five isolates of *L. lecanii* were characterized considering the size of conidia, germination speed (GT5, GT50, and GT95), radial growth rate in two culture media, sporulation and virulence. The correlation of infectivity with conidia size, maximum rate of growth and specific rate of growth was highly significant. *L. lecanii* ATCC 26854 was selected considering its high rate of infection and production of extracellular enzymes in solid (FMS) and liquid state fermentation (FML). The increase of moisture content in FMS in polythene bags and flasks of 250 mL improved the proteases, endochitinases, N-acetyl-hexosaminidasas and conidia (5.4×10^8 conidia /gss) yield significantly. The highest proteases activity required 120 hours, endochitinases 96 hours and B-N-acetyl-hexosaminidasas 120 hours with yields of 9.79 U/g substrate on dry basis, 3.96 U/g ss and 0.795 U/g ss respectively. Mortality rates with enzymatic extract and conidia took longer time (TL 50 (95.30 hours) compared with conidia harvested from rice or ADS. Raw shrimp chitin mixed with rice did not produce the expected amount of enzymatic extracts. Further research will expand our understanding of the mechanisms of virulence among isolates of *L. lecanii*.

Keywords: *Lecanicillium lecanii*, *Brevicoryne brassicae*, solid state fermentation, exoenzymes, chitin, chitinases, proteases, biological control, virulence

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Patología de Insectos del Postgrado en Entomología y Acarología, Campus Montecillo, Colegio de Posgraduados y en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Raquel Alatorre Rosas y la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. Parte del trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del proyecto SEP-CONACyT No. 46173 y con el apoyo del proyecto de la Comunidad Económica Europea (ICA4-2001-10185).

Dedicatoria

A mi madre, Gloria Vara Vásquez por permitirme ser lo que soy, sobre todo por ese apoyo incondicional en la realización de mis inquietudes.

A mis hermanas Neftalí Guadalupe y Ada.

A mi sobrino Jorge.

A todos aquellos que me dieron una enseñanza de la vida (mis maestros), a los que me hicieron tropezar y sobre todo a la inteligencia universal que me ha permitido llegar hasta donde estoy (Dios).

Agradecimientos

Agradezco al pueblo de México que por medio de sus impuestos hicieron posible que el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me apoyara económicamente para la realización de mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados (CP) y a su personal docente por darme la oportunidad de aprender entre sus aulas y laboratorios.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por su apoyo y facilidades otorgadas durante mi formación.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por creer en mí e impulsar lo que soy. Gracias por todos esos conocimientos y experiencias transmitidos. Agradezco su disposición y tiempo para escuchar mis inquietudes que siempre tuvieron una buena culminación. Muchas gracias por su amistad y el privilegio de haberla conocido.

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por su asesoría, tiempo y facilidades otorgadas durante mi estancia en el Laboratorio de Biopolímeros. Gracias por todos los conocimientos transmitidos y por enseñarme que todo en esta vida se puede, trabajando duro en compañía de los mejores.

A Jorge Valdez Carrasco por su tiempo, asesoría y facilidades otorgadas durante mi formación. Gracias por esos consejos que me ayudaron a aterrizar mis ideas.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado por su asesoría y acertados comentarios a mi tesis.

Al Dr. Ariel Guzmán Franco y al Dr. Humberto Vaquera Huerta por su tiempo en leer mi trabajo de tesis, así como las asesorías en los análisis estadísticos.

A mis amigos el Dr. Francisco Hernández, Marco Reyes, Eliu Herrera, Verónica Romero (Mi princesita), Carolina Pérez, Gabriela Hernández y Martha Estrada por su amistad, apoyo y comprensión. Gracias por esos momentos que pasamos juntos y que hicieron de mi estancia en el CP una experiencia única en mi vida.

A mis estimados amigos del CP Víctor, Jorge, Fabián y Toñis, y a Divanery de la UAMI.

A los colegas del Laboratorio de Biopolímeros: Chua, Neith, Laura, Gustavo, Diana, Mónica, Zaizy, Bety, Memo, Marco, Maribel y Karla. Por todos esos momentos que compartimos.

A mis maestros y amigos del camino rojo (temazcal) por darme conocimiento, medicina, sabiduría y fuerza.

Contenido

	PÁGINA
Resumen	iii
Abstract	iv
Dedicatoria y Agradecimientos	vi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Cuadros	xiv
Introducción General	xv
Hipótesis	xvii
Objetivo General	xvii
Objetivos particulares	xvii
Capítulo 1. Antecedentes	1
1.1 <i>Lecanicillium lecanii</i>	1
1.1.1 Descripción del patógeno	1
1.1.2 Características morfológicas	1
1.1.3 Hospederos	2
1.2 Proceso de infección	2
1.2.1 Relación patógeno-huésped	3
1.2.2 Características de la espora (conidio)	4
1.2.2.1 Pared celular	4
1.2.3 Adhesión	5
1.2.4 Germinación	6
1.2.5 La cutícula de los insectos como barrera	7
1.3 Enzimas degradadoras de la cutícula	8
1.3.1 Enzimas proteolíticas	9
1.3.1.1 Endoproteasas	9
1.3.1.2 Exoproteasas	11
1.3.2 Enzimas quitinolíticas	11
1.3.3 Enzimas lipolíticas y estererasas	13
1.3.4 Regulación de la producción de enzimas	14

1.4 Producción de quitinasas por <i>L. lecanii</i> en medio sólido	16
1.4.1 La quitina como sustrato	17
1.4.2 Inducción de las quitinasas utilizando diferentes fuentes de Carbono	19
1.4.3 Condiciones de producción de quitinasas	21
1.4.4 Uso de las quitinasas en la agricultura	23
1.5 Literatura citada	24
Capítulo 2. Patogenicidad de aislamientos de <i>L. lecanii</i> sobre el pulgón cenizo de la col, <i>Brevicoryne brassicae</i> : correlación con el tamaño de conidio, velocidad de germinación, crecimiento radial y esporulación.	36
2.1 Resumen	36
2.2 Introducción	37
2.3 Materiales y Métodos	38
2.3.1 Aislamientos y preparación de inóculo	38
2.3.2 Bioensayo	39
2.3.3 Tamaño del conidio	40
2.3.4 Velocidad de germinación	40
2.3.5 Crecimiento radial en dos medios de cultivo	41
2.3.6 Esporulación en dos medios de cultivo	42
2.4 Resultados	42
2.4.1 Bioensayo	42
2.4.2 Tamaño de conidios	43
2.4.3 Velocidad de germinación	44
2.4.4 Crecimiento radial	45
2.4.5 Esporulación	47
2.5 Discusión	47
2.6 Conclusión	50
2.5 Literatura citada	50

Capítulo 3. Efecto de la humedad del sustrato arroz-quitina de camarón en la producción de esporas y enzimas en medio sólido de <i>L. lecanii</i> .	55
3.1 Resumen	55
3.2 Introducción	56
3.3 Materiales y Métodos	57
3.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	57
3.3.1.1 Inóculo	57
3.3.2 Cultivo en medio sólido	58
3.3.2.1 Medición de crecimiento y esporulación	58
3.3.3 Actividad Enzimática	59
3.3.3.1 N-acetil-hexosaminidasas	59
3.3.3.2 Endoquitinasas	59
3.3.3.3 Proteasas	60
3.3.4 Análisis estadístico	60
3.4 Resultados	61
3.5 Discusión	62
3.6 Conclusión	64
3.5 Literatura citada	64
Capítulo 4. Producción y determinación del efecto de conidios y enzimas extracelulares de <i>L. lecanii</i> producidas en arroz-quitina de camarón en medio sólido, sobre el pulgón cenizo de la col.	67
4.1 Resumen	67
4.2 Introducción	68
4.3 Materiales y Métodos	69
4.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	69
4.3.1.1 Inóculo	69
4.3.2 Cultivo en medio sólido	69
4.3.2.1 Determinación de la biomasa	70
4.3.2.2 Esporulación	71

4.3.3 Actividad Enzimática	71
4.3.3.1 N-acetil-hexosaminidasas	71
4.3.3.2 Endoquitinasas	72
4.3.3.3 Proteasas	72
4.3.4 Bioensayo	72
4.3.5 Análisis estadístico	74
4.4 Resultados	75
4.5 Discusión	80
4.6 Conclusión	83
4.7 Literatura citada	84
5. Conclusión General	89
6. Recomendaciones	91

Índice de Figuras

Figura 1	Degradación de quitina mediante endoquitinasas, exoquitinasas y oligosacaridasas. N-acetil-D-glucosamina (NAG); grupo acetilo (●) (Tomado de Horsch <i>et al.</i> , 1997).	19
Figura 2	Producción de proteasas por <i>L. lecanii</i> ATCC26854 en medio sólido utilizando como sustrato arroz con quitina de camarón al 0.5% (▲). Los datos son la media de seis determinaciones y las barras corresponden al error estándar.	75
Figura 3	Producción de β -N-acetilhexosaminidasas (▲) y endoquitinasas (●) por <i>Lecanicillium lecanii</i> en medio sólido utilizando como sustrato arroz – quitina de camarón al 0.5%. Los datos son la media de seis determinaciones y la barras corresponden al error estándar.	76
Figura 4	Producción de biomasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC 26854 en medio sólido utilizando como sustrato arroz – quitina de camarón al 0.5%(▲). Los datos experimentales son la media de tres determinaciones. La línea corresponde al ajuste de los datos al modelo de crecimiento logístico.	77
Figura 5	Esporulación de <i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC 26854 en medio sólido utilizando como sustrato arroz – quitina de camarón al 0.5% (▲). Los datos experimentales son la media de cuatro determinaciones. La línea corresponde al ajuste de los datos al modelo de Richards.	77
Figura 6	Proporción de áfidos infectados a diferentes tiempos con el ajuste de los datos a la curva del modelo de regresión Logística: (▲) extracto enzimático obtenido de la fermentación en arroz – quitina de camarón al 0.5% y mezclado con conidia de <i>L. lecanii</i> producidas en este mismo sustrato; (■) extracto de la fermentación de arroz y mezclado con las conidias producidas en arroz; y (◆) conidias producidas en ADS mezcladas con una solución de Tween 80 al 0.01%.	78

Índice de Cuadros

Cuadro 2.1	Mortalidad de adultos de <i>Brevicoryne brassicae</i> expuestos a cinco aislamientos de <i>Lecanicillium lecanii</i> .	43
Cuadro 2.2	Aislamientos de <i>L. lecanii</i> , lugar de origen y media del largo de las conidia.	44
Cuadro 2.3	Velocidad de germinación de cinco aislamientos de <i>Lecanicillium lecanii</i> .	45
Cuadro 2.4	Parámetros cinéticos del crecimiento radial en placa y esporulación en medio ADS de los diferentes aislamientos de <i>L. lecanii</i> .	46
Cuadro 2.5	Parámetros cinéticos del crecimiento radial en placa y esporulación en medio AA de los diferentes aislamientos de <i>L. lecanii</i> .	46
Cuadro 3.1	Producción en medio sólido de enzimas y conidios de <i>Lecanicillium lecanii</i> en bolsas de polipapel utilizando diferentes proporciones de agua en el sustrato arroz-quitina (AQ).	62
Cuadro 3.2	Producción en medio sólido de enzimas y conidios de <i>Lecanicillium lecanii</i> en matraces de 250 mL utilizando dos proporciones de agua en el sustrato arroz-quitina (AQ).	62
Cuadro 4.1	Estimación de los parámetros de mortalidad, la TL_{50} y la respuesta relativa de la dosis aplicada (RRD) sobre los adultos ápteros de <i>B. brassicae</i> tratados con la suspensión conidio-extracto enzimático.	79

INTRODUCCIÓN GENERAL

Lecanicillium lecanii (Ascomycota: Hypocreales) es un importante patógeno de áfidos, mosca blanca, trips y escamas, que considerando su alta virulencia ha sido desarrollado como agente de control biológico o micoinsecticida (Hall, 1981; Deshpande, 1999; Shah y Pell, 2003). Los micoinsecticidas constituyen un porcentaje muy pequeño del total del mercado de los insecticidas (Tamez *et al.*, 2001). Una consideración importante en el desarrollo de micoinsecticidas es que éstos, comparados con los insecticidas organosintéticos requieren de más tiempo para matar a los insectos, tiempo durante el cual los insectos infectados pueden causar daños a los cultivos (St. Leger *et al.*, 1996). El incremento en la virulencia de *L. lecanii* puede lograrse mediante el entendimiento de los mecanismos de patogénesis, la modificación genética de factores de la virulencia y la formulación de productos que permitan reducir el inóculo y el tiempo de mortalidad de los insectos.

Una de las ventajas de los hongos entomopatógenos es que los insectos no necesitan ingerirlo; actúan por contacto. *L. lecanii* infecta principalmente a los áfidos mediante la penetración de la cutícula (Ascary *et al.*, 1999). Los conidios del hongo se adhieren sobre la cutícula y germinan. La cutícula del insecto está constituida principalmente de una matriz de quitina mezclada con proteínas (Clarkson y Charnley, 1996). Las microfibrillas de quitina constituyen el 30 % de la cutícula de los insectos y representa una barrera para la infección (St. Leger *et al.*, 1986a). Los hongos entomopatógenos como *L. lecanii* producen extracelularmente proteasas y quitinasas que degradan los componentes estructurales de la cutícula (proteínas y quitina), lo que permite la penetración de las hifas a través del integumento y el acceso a nutrientes en la hemolinfa (Charnley y St. Leger, 1991). Considerando que la cutícula es la principal barrera para la infección, se ha propuesto utilizar a las quitinasas y proteasas que se producen durante el crecimiento de los hongos en fermentación en medio sólido o líquido para acelerar el proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos (Samsinakova *et al.*, 1971; Patil *et al.*, 2000; Nahar *et al.*, 2004).

Las quitinasas son enzimas constitutivas y durante el crecimiento de los hongos tanto en fermentación en medio sólido (FMS) como en líquido (FML) son detectadas en bajos niveles. La adición de inductores como la quitina a los medios de cultivo incrementa su producción (St. Leger *et al.*, 1986 b; Bidochka y Khachatourians, 1988). *L. lecanii* presenta tanto cualitativa como cuantitativamente actividades altas de quitinasas y proteasas en FMS y FML utilizando como inductor quitina de camarón y en cultivo superficial en agar-quitina coloidal (Matsumoto *et al.*, 2001; Barranco *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2008). Los rendimientos de quitinasas y proteasas dependen de factores tales como el pH, temperatura, sustrato (quitina y sus derivados), el microorganismo, el tipo de inóculo y el proceso de fermentación (Pandey *et al.*, 1999).

En fermentación en medio sólido se han encontrado los rendimientos más altos de quitinasas comparado con la fermentación en medio líquido, además, el extracto crudo enzimático obtenido en fermentación sólida puede utilizarse directamente como fuente de enzimas (Pandey *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 2004). Por otra parte, el método más común para la producción masiva de las esporas, con las cuales están elaborados los micoinsecticidas, es la fermentación sólida debido a los altos rendimientos que se obtienen, utilizando granos de arroz como sustrato (Mendoca, 1992; Dorta *et al.*, 1996).

Por todo lo mencionado anteriormente y considerando que, el hongo entomopatógeno *L. lecanii* puede propagarse masivamente en fermentación en medio sólido y líquido; que durante su crecimiento en sustratos como quitina de camarón secreta enzimas extracelulares como quitinasas y proteasas, se consideró que utilizando la mezcla de conidios mas enzimas extracelulares como quitinasas y proteasas producidas en medio sólido coadyuvarían en el proceso de patogénesis de *L. lecanii* sobre el pulgón cenizo de la col reduciendo el inóculo y el tiempo de mortalidad de los insectos. Para determinar esto, se planteo la siguiente hipótesis:

H: “Durante la producción masiva de *Lecanicillium lecanii* en medio sólido utilizando arroz - quitina de camarón, se producen quitinasas y proteasas que pueden coadyuvar en la virulencia de los conidios de *L. lecanii* sobre *B. brassicae*”

Con esta hipótesis, surgió el presente proyecto de investigación cuyo objetivo general fue:

Correlacionar características morfológicas y fisiológicas con la virulencia de diferentes aislamientos de *L. lecanii*, determinar las enzimas extracelulares producidas en fermentación sólida y evaluar la actividad patotóxica, enzimas-conidias sobre el pulgón *Brevicoryne brassicae* (L).

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

1. Comparar la virulencia de cinco aislamientos de *Lecanicillium lecanii* de diferente origen sobre el pulgón cenizo de la col, *B. brassicae* y su correlación con el tamaño de conidio, velocidad de germinación, crecimiento radial y esporulación para un mejor entendimiento de la interacción hongo-insecto.
2. Determinar el papel de la humedad del sustrato arroz-quitina de camarón al 0.5% en la producción de esporas y enzimas en medio sólido de *L. lecanii*.
3. Determinar las enzimas extracelulares de *L. lecanii* producidas en fermentación sólida.
4. Evaluar el efecto de conidias y enzimas extracelulares de *Lecanicillium lecanii* producidas en sustrato arroz quitina de camarón, sobre el pulgón cenizo de la col.

Para alcanzar los objetivos antes mencionados y poner a prueba la hipótesis, el trabajo de investigación se dividió en cuatro capítulos. El capítulo 1 presenta una revisión bibliográfica sobre la interacción insecto-hongo y el papel que juegan las

enzimas extracelulares en el proceso de patogénesis así como la producción masiva de hongos entomopatógenos y de enzimas extracelulares en fermentación en medio sólido. El capítulo 2 presenta los resultados de la interacción insecto-patógeno, en esta parte se caracterizaron morfológica y fisiológicamente aislamientos de diferente origen de *L. lecanii*, con base en su respuesta a la velocidad de germinación, esporulación, crecimiento radial en dos medio de cultivo y tamaño del conidio. Se identificaron los factores que mejor explican la virulencia. De los aislamientos caracterizados se selecciono a la cepa ATCC 26854 para la propagación masiva en fermentación sólida utilizando como sustrato una mezcla de arroz con quitina de camarón.

El capítulo 3 presenta el estudio sobre el efecto de la adición de diferentes cantidades de agua en el sustrato arroz-quitina de camarón en bolsas de poli papel y matraces de 250 mL, en la esporulación y producción de N-acetil-hexosaminidasa, endoquitinasas y proteasas del aislamiento ATCC26854 de *Lecanicillium lecanii*.

El capítulo 4 contiene información sobre la cinética de esporulación y producción de enzimas extracelulares en arroz mezclado con quitina cruda de camarón como sustrato e inductor de quitinasas y proteasas de *Lecanicillium lecanii* en fermentación en medio sólido. Además, se incluye el estudio sobre patogenicidad de los conidios obtenidos de cultivos en arroz (A), arroz-quitina al 0.5% (AQ) y agar-dextrosa-sabouraud (ADS) más el extracto enzimático obtenido del cultivo AQ sobre adultos de *B. brassicae*.

El trabajo realizado permitió corroborar la hipótesis de que la utilización del sustrato arroz-quitina de camarón funciona como inductor en la producción de proteasas, quitinasas y esporas de la cepa *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854, sin embargo, los rendimientos de las enzimas fueron bajos en comparación con otros sistemas de producción de quitinasas, debido probablemente a la represión catabólica ocasionada por la alta concentración de carbohidratos presentes en el grano de arroz

Literatura citada

- Askary, H., Benhamou, N. and Brodeur, J. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 1-13
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1988. N-Acetyl-D-Glucosamine mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(11):2699-2704.
- Barranco, F.J.E., Alatorre, R.R., Gutiérrez, R.G., González, V. and Saucedo, C.G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* 30:910-915.
- Charnley, A.K. and St. Leger, R.J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In : Cole, E.T. and Hoch, H.C. (eds) 1991. *Fungal spore disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, NY. p 267-287.
- Clarkson, J.M. and Charnley, A.K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*. 4 :197-203.
- Deshpande, M.V. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology* 25(3):229-243.
- Dorta, B., Ertola, R.J. and Arcas, J. 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 19:434-439.
- Hall, R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scales. In: Burges, H.D. (ed) *Microbial Control of Pest and Plant Disease*. Academic Press, New Yourk. pp 483-498.
- Marin, C. Ma. C., Matsumoto, Y., Ramírez, C.L., Rocha, P.Z., Viniegra, G. and Shirai, K. 2008. Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. 2008. *Process Biochemistry*. 43 (1): 24–32

- Matsumoto, S.Y. J. Saucedo, C.G., Revah, S. and Shirai, K. 2001. Chitinases production in solid state fermentation and submerged fermentation by *Verticillium lecanii* with silage shrimp as substrate. In: Muzzarelli, R.A.A. (ed) 2001. Chitin Enzymology. Atec Edizioni, Italia. p 381-389.
- Matsumoto, S.Y.J., Saucedo, C.G., Revah, S. and Shirai, K. 2004. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry* 39:665-671.
- Mendoca, A.F. 1992. Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brazil. In: Lomer, C.J. and Prior, C. (Eds.) 1992. Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International, UK. 394pp.
- Nahar, P., Ghormade, V. and Deshpande, M. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisoplae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal Invertebrate Pathology*. 85:80-88.
- Palande, P.R. y Pokharkar, D.S. 2005. Evaluation of *Verticillium lecanii* Against *Brevicoryne brassicae* on Cole Crops. *Annals of Plant Protection Science* 13(1): 213-269.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77(1):149-162.
- Patil, R.S., Ghormade, V. y Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 473-483.
- Ramírez, C.L., Marín, C. Ma.C., Huerta, S., Revah, S. and Shirai, K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry* 41:1106–1110.
- Samsinakova, A., Misikova, S. y Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 322-330.
- Shah, P.A. and Pell. J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:413-423.

- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1986 a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 47:167-177.
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1986 b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi regulation of production of Chitinolytic Enzymes. *Journal of General Microbiology*: 132:1509-1518.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceeding National Academia Science USA* 93: 6349-6354.
- Tamez, G.P., Galán, W. L.J., Medrano, R. H., Gacrcía, G. C., Rodríguez, P. C., Gómez, F. R.A. y Tamez, G.R.S. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL* 4 (2): 143-152.

CAPÍTULO I

Antecedentes

1.1 *Lecanicillium lecanii*

1.1.1 Descripción del patógeno

El género *Lecanicillium* parece haber sido observado por primera vez en Ceylan (Sri Lanka) por el año de 1861, infectando *Lecanium coffea* (Hemiptera: Coccidae). Posteriormente se encontró sobre *Lecanium viridae* en café por Zimmermann, en Java (Indonesia) y brevemente fue descrito en 1988 con el nombre de *Cephalosporium lecanii*. Zimmermann propagó este hongo en agar con nutrientes y destacó la importancia de utilizarlo como agente de control biológico de escamas (Petch, 1925). Desde el punto de vista taxonómico *L. lecanii* ha recibido diferentes nombres, entre los que se mencionan: *Cephalosporium lecanii* Zimmermann (1898), *Cephalosporium aphidicola* Petch (1931), *Cephalosporium muscarium* Petch (1931), *Verticillium hemileiae* Bouriquet (1939) (Brady, 1979), *Verticillium lecanii* (Hall 1981; Samson *et al.*, 1981) y *Lecanicillium lecanii*. El género *Lecanicillium* Gams & Zare fue introducido para acomodar a los hongos anamorfos entomopatógenos y micopatógenos previamente clasificados en *Verticillium* sección Próstata (Zare y Gams 2001) tomando en cuenta su similitud a nivel molecular (secuencia de la región ITS, β tubulin y DNA mitocondrial).

1.1.2 Características morfológicas:

Las colonias llegan a alcanzar desde 15-30 mm de diámetro después de 10 días a 20°C sobre PDA (papa-dextrosa-agar) o MEA (extracto de malta agar), son compactas de color blanco a blanco amarillento con amarillo oscuro en el reverso de la colonia. Los conidióforos que se originan de hifas aéreas se diferencian en fialides simples, en pares o en verticilos de consistencia delicada y relativamente cortos de 11-20(-30) x 1.3-1.8 μ m. Los conidios adheridos en cabezuelas mucilaginosas en el ápice de las fialides, típicamente son cortos de forma elipsoide a curvados con extremos en

punta, de 2.5-3.5 (-4.2) x 1-1.5 μm , homogéneos en tamaño y forma. Puede haber presencia de cristales octaédricos en el medio de cultivo. La temperatura óptima de crecimiento es de 21-24° C (13-15 mm diámetro) y a temperatura de 33° C ya no crece (Brady, 1979; Zare y Gams, 2001; Zare y Gams, 2003).

1.1.3 Hospederos

Lecanicillium lecanii es un patógeno común de escamas en zonas tropicales y semitropicales. Este entomopatógeno comúnmente conocido como la enfermedad del halo blanco, se ha aislado de homópteros como: áfidos (Hall, 1976; Hall y Burges, 1979; Feng *et al.*, 1990), mosca blanca (Hall, 1982; Drummond y Heale, 1988; Kanagaratnam *et al.*, 1982) y de escamas (Samsinakova y Misikova, 1973; Easwaramoorthy y Jayaraj, 1978). Aunque también se ha aislado de trips (Skinner *et al.*, 1991; Puterka *et al.*, 1994), coleópteros (Barson, 1976) y ortópteros (Harper y Huang, 1986; Jonson *et al.*, 1988).

El entomopatógeno *L. lecanii* fue el primer hongo estudiado y desarrollado para su uso como micoinsecticida con uso inundativo en invernadero, debido principalmente al alto porcentaje de humedad que requiere para germinar y esporular. En el mercado internacional se encuentran dos productos comercializados por la compañía Koppert Biological Systems en Holanda: Vertalec para áfidos y Mycotal para mosquita blanca y trips (Shah y Pell, 2003).

1. 2 Proceso de infección

El proceso de infección de los áfidos por *L. lecanii* es una secuencia de acontecimientos que van desde la exposición de la cutícula con los conidios hasta la liberación de los conidioforos sobre el cadáver de los pulgones. En base a las observaciones microscópicas, estos eventos incluyen: 1) adhesión de los conidios sobre la cutícula, 2) germinación, producción de los tubos germinativos y ramificación de las hifas que colonizan la superficie del integumento, 3) penetración del tubo

germinativo por medio de presión mecánica y producción de enzimas degradadoras de la cutícula tales como quitinasas, 4) colonización de la procutícula por la proyección lateral de las hifas, 5) producción de blastosporas e invasión masiva de la hemolinfa del áfido y otros tejidos internos, 6) asimilación directa de nutrientes y acumulación de lípidos y 7) producción de conidióforos a través del integumento y desarrollo y liberación de las conidia sobre el cadáver del pulgón (Askary *et al.*, 1999).

1.2.1 Relación patógeno-huésped

Los hongos entomopatógenos son de gran importancia dentro de los agroecosistemas por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos. De manera especial, *L. lecanii* se ha observado sobre escamas, pulgones y mosca blanca (Samsinakova y Misokova, 1973; Hall, 1976; Drummond y Heale, 1988). Lo anterior puede explicarse considerando la alta susceptibilidad del hospedero o por la estrecha asociación patógeno-huésped, en éste último caso, el insecto huésped puede ejercer una presión de selección tal que favorezca a pocos genotipos del patógeno; es decir, hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedero (Maurer *et al.*, 1997; St. Leger *et al.*, 1997b).

La manifestación epizootica de los hongos entomopatógenos presenta una alta correlación con la densidad de la población hospedera y del patógeno, además del efecto de los factores bióticos y abióticos micro ambientales (Glare, 1991). Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y persistencia de los hongos entomopatógenos y con ello influyen en la ocurrencia de una enfermedad se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa, el viento, además de los metabolitos secundarios de las plantas, los insecticidas y fungicidas. La susceptibilidad y la relación con los hospederos se asocian con los nutrimentos presentes sobre el cuerpo de los insectos, en el caso de los pulgones se encuentra una alta concentración de nutrientes sobre la cutícula, carbohidratos, lípidos, que favorecen la propagación, dispersión y persistencia de los hongos (Brey *et al.*, 1986; Steinkraus, 2006).

Las esporas de los entomopatógenos tienen requerimientos específicos de agua y temperatura, así como de otros factores ambientales que en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno y que les permiten llevar a cabo el proceso infectivo sobre el hospedero (Hajek y St. Leger, 1994; Hajek, 1997).

Para comprender los mecanismos y procesos de la asociación patógeno-hospedero, es necesario conocer los factores que favorecen la actividad de la conidia como unidad infectiva al igual que la composición del insecto hospedero, como medio para la germinación y desarrollo del hongo.

1.2.2 Características de la espora (conidio)

En los Ascomycetos anamorficos como *L. lecanii*, los conidios constituyen la unidad por medio de la cual se lleva a cabo el proceso de infección. La germinación, patogenicidad, virulencia y agresividad dependerá de la composición estructural de la conidia (pared celular y citoplasma), así como de la capacidad para adaptarse a ambientes diversos donde habitan sus hospederos (Boucias y Pendland, 1991).

1.2.2.1 Pared celular

Considerando la pared celular, *L. lecanii* posee conidios hidrofílicos. Éstos se distinguen por la presencia de una cubierta mucilaginosa producida durante la maduración de la espora. El mucilago que rodea a la espora facilita su dispersión a través de la lluvia o le permite adherirse a la cutícula del insecto hospedante (Boucias y Pendland, 1991; Kershaw y Talbot, 1998).

La pared celular de los hongos está constituida por polisacáridos (80%), proteínas (3-20%), lípidos, pigmentos y sales inorgánicas en cantidades menores. La quitina en forma de microfibrillas es el polisacárido característico de la pared celular en hongos, aun cuando puede encontrarse en otros organismos como los insectos. Este

polímero es un polisacárido no ramificado, constituido de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), donde los monómeros están unidos por enlaces β -1,4 por lo que existen tres tipos de quitina: α , β y γ (Ruiz, 1991).

Las proteínas son glicoproteínas, cuya fracción glicosilada está formada por galactosa y manosa (Ruiz, 1991; Wessels, 1999). Los lípidos en la pared celular de los hongos están presentes en un rango de 1 a 10 % de su peso seco; con ácidos grasos, siendo los más abundantes C16 y C18. La coloración característica de la pared celular se debe a la presencia de melaninas, producto de la oxidación de diferentes fenoles. La importancia de estos pigmentos se debe a su carácter protector ante efectos deletéreos ocasionados por la luz o por las enzimas líticas (Ruiz, 1991).

En la pared celular ocurren cambios durante las diferentes etapas de desarrollo de los hongos, cambios que ocurren mediante el ensamblaje de los componentes celulares como polisacáridos microfibrilares, la asociación de polisacáridos de reforzamiento y de complejos de proteínas (glicoproteínas). Las glicoproteínas inician su ensamblaje a nivel del lumen, en el interior del retículo endoplásmico rugoso; posteriormente, son transportadas a diferentes compartimientos membranosos del retículo endoplásmico liso y del aparato de Golgi, hasta alcanzar la superficie celular mediante el aparato vesicular. Este conglomerado vesicular conduce a las glicoproteínas y otros componentes hacia la pared celular pasando por la membrana plasmática; los otros componentes siguen esta vía para integrarse a la pared celular, tanto para la formación de la espora, como del desarrollo de micelio (Ruiz, 1991; Wessels, 1999).

1.2.3 Adhesión

Las conidias de los hongos entomopatógenos en particular *L. lecanii* se adhieren sobre la cutícula del insecto en forma pasiva. El proceso de adherencia es muy complejo, pero por lo general hay tres etapas: adsorción, la cual es física o química y no es controlada por el patógeno; adhesión, en la cual el organismo secreta un

adhesivo proteico o glucoproteico; y colonización, que depende de los factores ambientales que controlan el crecimiento. La adsorción es controlada por dos tipos de fuerzas: la de atracción de van der Waals y la repulsión electrostática (Rutter y Vincent, 1980; Boucias et al., 1988). Una infección puede ser abortada en la epicutícula si un factor esencial como la adhesión, desarrollo microbial o patogénesis es ausente. Específicamente, durante la infección el hongo debe estar en un ambiente húmedo, lo cual favorece tanto la germinación como la esporulación.

1.2.4 Germinación

Una vez que las conidias se acoplan a la cutícula (epicuticula) y encuentran las condiciones favorables, inician su proceso de hinchamiento o hidratación. La germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996). La hidratación de la conidia es favorecida por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por el sistema inmune del insecto. Los conidios de *Metarhizium anisopliae* presentan un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobina, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto. Sin embargo, se han encontrado esterases y proteasas en conidios no germinados, lo que sugiere una modificación de la superficie cuticular previa a la germinación, ya que durante la hidratación la espora no sólo absorbe agua, sino también nutrientes. (St. Leger, 1993a; Boucias y Pendland, 1991; Wessels, 1994; Kershaw y Talbot, 1998; Charnley, 2003).

Después del hinchamiento de la espora tiene lugar la formación del tubo germinativo, durante este proceso las hidrofobinas participan como mediadoras en las interacciones bióticas y abióticas, y en respuesta activan una serie de rutas metabólicas en forma de cascadas de transducción de señales para el incremento y ensamble de nuevos componentes de la pared en desarrollo. En el crecimiento apical se forma una protuberancia de los conidios hidratada conocido con el nombre de

Spitzenkörper, que simultáneamente actúa como sistema de reconocimiento y a su vez de activador de un sin número de mecanismos (Ruiz, 1991; Charnley, 1994; Wessels, 1994). Los iones H^+ y Ca^{2+} entran en la punta de la hifa a través de un mecanismo de transporte pasivo y son expulsados por mecanismos dependientes de energía. Este flujo transcelular permanece constante y mantiene el desarrollo del tubo germinativo y la formación del apresorio, una estructura especializada formada en el tubo germinativo (Ruiz, 1991; Wessels, 1994). El tubo germinativo se puede ramificar de tal manera que rastrea y reconoce la superficie del insecto (estructura topológica) para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula (Wessels, 1999).

La penetración de la epicutícula es mediante la clavija producida por el apresorio o mediante la entrada directa de los tubos germinativos. La epicutícula tiene multicapas (lamelas) y cada capa con propiedades específicas. La epicutícula exterior aparece en muchos insectos mecánicamente frágil y puede ser penetrada con la aplicación de fuerza física (Hajek y St. Leger, 1994). Paralelamente, el hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas y lipasas que van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo (St. Leger *et al.*, 1986b; Charnley, 1989; Charnley, 2003).

1.2.5 La cutícula de los insectos como barrera

La cutícula de los insectos es una barrera efectiva contra la penetración de los hongos entomopatógenos. La parte superficial del integumento es la epicutícula con dos capas bien definidas, la capa externa y la capa interna. La capa externa, es fácilmente penetrada por la hifa debido a la secreción de las enzimas extracelulares tales como esterases que desestabilizan física y químicamente la cutícula. Los lípidos de la epicutícula producen un ambiente altamente hidrofóbico que previene la colonización de muchos de los microbios (Buckner *et al.*, 1996). Adicionalmente, ciertos lípidos tales como ácidos grasos de cadena corta, aldehídos, ceras, cetonas y alcoholes poseen actividad antimicrobiana. Una vez que la epicutícula es fracturada, la

hifa continúa su penetración de manera directa, de tal modo que puede producir un desarrollo lateral de las hifas colonizando la procutícula. Las hifas se ramifican sobre las lamellas de la procutícula, en esta capa se encuentran proteína y quitina en forma helicoidal (Boucias y Pendland, 1998).

1.3 Enzimas degradadoras de la cutícula

Cuando *Metharhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii* son cultivados en medio líquido utilizando cutícula de insectos como única fuente de carbono, estos hongos producen una variedad de enzimas extracelulares degradadoras de la cutícula correspondiendo su aparición con los mayores componentes tales como proteína, quitina y lípidos (St. Leger *et al.*, 1986b). Existe una marcada variación en los niveles de enzimas entre aislamientos y especies, pero, las endoproteasas son consistentemente producidas en grandes cantidades en todos los aislamientos.

Las enzimas aparecen secuencialmente, las esterasas y proteasas (endoproteasas, aminopeptidasas y carboxilasas) son las primeras en aparecer antes de las 24 horas y se incrementan rápidamente después de las 48 horas. Enseguida de las proteasas aparecen las N-acetilglucosaminidasas (NAGasas). Quitinasas y lipasas son producidas entre los tres y cinco días. El orden de aparición de las enzimas obedece a la secuencia de solubilización de los constituyentes de la cutícula. La aparición de las quitinasas es presumiblemente el resultado de una inducción debido a la disponibilidad de quitina después de la degradación de las proteínas (Smith y Gula, 1983; St. Leger *et al.*, 1986 d). El retraso en la detección de las lipasas parece deberse al hecho de que la enzima intracelular está vinculada en gran medida a cultivos jóvenes. Mediante pruebas con enzimas purificadas sobre la cutícula de langosta *in vivo*, St. Leger *et al.* (1986c) mostraron que el pretratamiento o combinación con endoproteasas (Pr1) fue necesario para una alta actividad quitinolítica. Samsinakova *et al.* (1971) y Smith *et al.* (1981) también llegaron a la conclusión de que la quitina en la cutícula es protegida por la proteína.

1.3.1 Enzimas proteolíticas

La cutícula de los insectos está constituida por 70 % de proteínas (Hepburn, 1985), muchos de los hongos entomopatógenos necesitan obtener estas proteínas como nutrientes durante el proceso de penetración. Los hongos son los únicos que tienen la capacidad de penetrar el integumento a través de procesos mecánicos y enzimáticos. Se ha documentado que cuando el hongo inicia el proceso de infección secreta una gran cantidad de proteasas para solubilizar las proteínas (St. Leger *et al.* 1988). Se han utilizado diversas pruebas para detectar la producción de proteasas por los hongos entomopatógenos en medio de cultivo y existen protocolos para la purificación de estas enzimas mediante punto isoeléctrico y cromatografía de afinidad (St. Leger *et al.* 1987, Hurion *et al.* 1979). Las proteasas de *Metarhizium anisopliae* ofrecen el mejor modelo y entendimiento sobre el papel de estas proteínas en la patogénesis.

1.3.1.1 Endoproteasas

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* produce tres tipos de endoproteasas durante el crecimiento en cutícula de cucaracha. Éstas fueron separadas por medio del punto isoelectrico y se caracterizaron de acuerdo con su especificidad al sustrato, éstas son: serina proteasas tipo subtilisina (denominada Pr1), serina proteasa tipo tripsina (Pr2) y metaloproteasa tipo termosilina (St. Leger, 1995a).

Las dos serina proteasas tipo subtilisina que produce *M. anisopliae* son referidas como Pr1a (pI~10, Mr=29 kDa) y Pr1b (pI~9, Mr=31.5 kDa). Tanto la Pr1a como la Pr1b muestran propiedades físicas y químicas similares, la secuencia del primer aminoácido y su respectivo aminoácido terminal mostró únicamente 53 % de homología (St. Leger *et al.*, 1994). De manera general son alcalinas, serina proteasa con una histidina como residuo en el sitio activo (St. Leger *et al.*, 1987). Estas enzimas poseen una amplia similitud en la especificidad primaria por los aminoácidos con un grupo hidrofóbico al lado del segundo átomo de carbono (por ejemplo fenilalanina, leucina, metionina), pero,

también poseen una especificidad secundaria por las cadenas hidrofóbicas extendidas de péptidos con el sitio activo en los cinco subsitios de los residuos. Esta comparación de no especificidad demuestra que tiene una buena actividad sobre otras proteínas (caseína, elastina, seroalbumina bovina BSA y colágeno) y cutícula de insecto (St Leger *et al.*, 1989 a). Por otra parte, estas enzimas aparecen igual de efectivas en la degradación de mezclas heterogéneas de proteínas de la cutícula de los insectos, sugiriendo que tienen el potencial para la degradación de proteínas no específicas durante la patogénesis o saprotrofia (St. Leger, 1995 a).

En *M. anisopliae* se han distinguido dos serina proteasas con actividad de tripsina y una de menor actividad. La síntesis de esta proteasa es inducida al crecer el hongo en cutícula de insecto o BSA (St. Leger *et al.*, 1988). La proteasa Pr 2 (serina-proteasa tipo tripsina) es inducida por cualquier proteína cuando el hongo crece en un medio sin nitrógeno, pero esta enzima no es inducida si el medio es escaso en carbono o azufre (Paterson *et al.*, 1993).

La Pr2 presenta varias isoformas (pI ~ 4.2-5.2), éstas muestran similar preferencia por romper grupos carboxilo de aminoácidos cargados positivamente, preferentemente la arginina es el sitio específico primario. Las isoformas Pr2 muestran una alta actividad sobre proteínas solubles en la cutícula que por proteínas insolubles (St. Leger, 1995a). Las isoformas de Pr2 son secretadas por dos estructuras infecciosas, por el apresorio sobre la cutícula y por la hifa dentro de la cutícula (St. Leger *et al.*, 1996a).

St. Leger *et al.* (1994), identificaron una proteasa de la clase metalo-proteasa tipo termolisina. Esta enzima es una proteasa con actividad de amplio rango de proteínas (incluyendo elastina, gelatina y cutícula de insecto) y también puede hidrolizar el sustrato de la Pr1, pero, difiere con las isoformas de la Pr1 en que es inhibida por fosforamidon y 1,10-fenantrolene (St. Leger *et al.*, 1994).

1.3.1.2 Exoproteasas

La acción de las enzimas Pr1 sobre la cutícula del insecto libera péptidos con una longitud media de residuos de 5 aminoácidos. Una mayor degradación por peptidasas será necesaria para la nutrición de los hongos. Dos clases de aminopeptidasas fueron aisladas de cultivos de *M. anisopliae* y clasificadas como aminopeptidasa M de amplia especificidad con una actividad óptima sobre el aminoácido alanina (aminoácido más común en la cutícula) y una post-prolina dipeptidil peptidasa IV que remueve los grupos X-prolyl de los polipeptidos. La aminopeptidasa M (pH óptimo = 7-8, Ma = 33 kDa) existe con seis isoformas (pl 5-6) que son sensibles a los inhibidores típicos de las metaloenzimas (St. Leger *et al.*, 1993 b; St. Leger *et al.*, 1995b). La dipeptidil aminopeptidasa (pH óptimo 8, Ma =74 kDA) existe con dos isoformas (pl 5-6) y son inhibidas por DFP indicando que son serina hidrolasas (St Leger, 1995 a).

1.3.2 Enzimas quitinolíticas

La quitina es el principal componente de la cutícula de los insectos y la pared celular de los hongos; por lo tanto las quitinasas tienen importantes funciones relacionadas con el desarrollo de la pared del hongo y la degradación de la cutícula de los insectos. Durante el crecimiento sobre la cutícula de los insectos, los hongos entomopatógenos producen una mezcla de endo y exo quitinasas. El papel de ésta compleja mezcla en la penetración de la cutícula es desconocido. Las enzimas con actividad de endoquitinasas son más efectivas en la solubilización de los polímeros de la cutícula, asisten en la penetración. Mientras las exoquitinasas se relacionan con la degradación de oligómeros liberados por las endoquitinasas, dando como resultado quitobiosa y NAG, que pueden ser tomados por el hongo para su nutrición (St. Leger *et al.*, 1996 b). En el proceso de patógenesis las endoquitinasas cortan polímeros largos, mientras las exo producen oligómeros. La mayor función de las formas exo presumiblemente es la reducción de polímeros a mono y oligómeros para la nutrición y la continua inducción de enzimas (St. Leger *et al.*, 1986b).

Coudron *et al* (1984) demostraron la producción de quitinasas y exoquitinasas en *Beauveria bassiana*, *M. anisopliae* y *Nomurea rileyi* en presencia de GlcNAc. Estos autores encontraron baja actividad de exoquitinasas en conidios y conidios germinados; un rápido incremento de la actividad enzimática ocurre durante la fase micelial, y alcanza su pico máximo a los dos días de ocurrida la esporulación persistiendo durante 9 días. St. Leger *et al.* (1991) purificaron endoquitinasas filtrando cultivos de *M. anisopliae* desarrollados en quitina molida al 1%. La enzima purificada no hidrolizo a la quitobiosa (dimeros de N-acetilglucosamina), sólo mostró algunas trazas de actividad sobre quitotriosa (trimero), pero rápidamente degradó quitotetrosa (tetramero). Quitosano coloidal (quitina deacetilada) y quitina cristalina fueron menos susceptibles a la degradación que la quitina coloidal. Las quitinasas tienen mucha similitud con las que producen otros microorganismos (Stirling *et al.*, 1979). Estas propiedades incluyen un pH óptimo de 5.3, un peso molecular de 33 KDa, y la ausencia de algún cofactor como requerimiento. La hidólisis de quitina cristalina produce únicamente un producto de bajo peso molecular en 24 horas tal como N-acetilglucosamina (NAG).

Se ha demostrado la presencia de un gran número de isoformas de quitinasas producidas en cultivos de *M. anisopliae* (St. Leger *et al.* 1993c). La gran diferencia en el peso molecular de las enzimas sugiere que éstas son producto de diferentes genes (St. Leger *et al.*, 1996b). Las isoformas producidas en cutícula de cucaracha por *M. anisopliae var. anisopliae* 2575 y *M. anisopliae var. acridum* 324 pueden clasificarse por medio del punto isoeléctrico (pI) como básico o ácido. Estos últimos son dominantes. Las isoformas de 43.5 y 45 kDa con pI de 4.8 mostraron similitud entre el N terminal sugiriendo que estas enzimas no son producidas por genes separados.

Pinto *et al.* (1997) reportan una endoquitinasa de 30 KDa de un aislamiento de *M. anisopliae* parecida a la reportada previamente por St. Leger *et al.* (1991). Sin embargo, otra endoquitinasa de 60 kDa (Kang *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1999) difiere de las isoformas reportadas por St. Leger *et al.* (1991) y St. Leger *et al.* (1996b) no únicamente en la Mr, sino también en el N terminal de la proteína y la secuencia de los nucleótidos.. En ambos casos las enzimas fueron similares a las isoformas

caracterizadas por St. Leger y colaboradores en tener una actividad endo y exo. Bogo *et al.* (1998) aislaron los cDNA para quitinasas que codificaron para una endoquitinasa de 58 kDa. La secuencia coincide con 423 aminoácidos con una predicción final de producto de 43 kDa. Esta fue comparada con la quitinasa de 45 kDa purificada bioquímicamente por St. Leger *et al.* (1996b).

La N-acetilglucosaminidasa fue parcialmente purificada de cultivos de *M. anisopliae* desarrollados en 1 % de quitina molida. La enzima tuvo una actividad sustancial sobre p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina, así como en la quitobiosa, quitotriosa y quitotetraosa, el mayor producto liberado en cada caso es N-acetilglucosamina (NAG), mostrando que la enzima es una verdadera NAGasa en vez de una quitobiasa (St. Leger *et al.*, 1991). La enzima tiene poca actividad sobre quitina coloidal o cristalina. Su tamaño de 110-120 kDa, está dentro del rango de enzimas similares de otras fuentes (Reyes and Byrde, 1973).

1.3.3 Enzimas lipolíticas y esterasas

Se han hecho pocos trabajos sobre las enzimas que actúan sobre lípidos y esteroides, esto debido principalmente a que los sustratos no son componentes importantes de la epicutícula y procutícula. Sin embargo, los hidrocarburos que componen la epicutícula son capas de ceras, que algunos hongos las utilizan para germinar (Lecuona *et al.*, 1991). En general las esterasas pueden diferenciarse de las lipasas porque las primeras atacan a ácidos grasos de cadena corta (C_2 - C_4) y las lipasas atacan a ácidos grasos de cadena larga ($>C_8$) (Shnitka, 1974). La actividad de las esterasas producidas por *M. anisopliae* en cultivos jóvenes (3 días) fue mayor contra cadenas de ácidos grasos cortas y medias utilizándose como sustrato p-nitrofenol ester, algunas trazas de actividad ocurrieron con cadenas de diez carbonos, esto sugiere que las lipasas no son producidas extracelularmente por micelio joven. La actividad sobre C_{14} se incrementó en cultivos viejos (7-14 días). El retardo en la producción de las lipasas extracelulares in vitro fue confirmada usando una lipasa y como sustrato aceite de olivo (St. Leger et al. 1986a). El pico de producción de las

esterasas en una columna Sephadex G100 tuvo un perfil muy similar a la obtenida para la endoproteasa Pr1. La Pr1 también degrada al p-nitrofenil ester, es probablemente una de las principales contribuyentes a la actividad de las esterasas (Charnley, 2003).

1.3.4 Regulación de la producción de enzimas

La producción correcta de enzimas, en cantidad suficiente, con una secuencia apropiada, en el lugar y tiempo correcto son críticas para el parasitismo (Charnley, 2003). La región promotora de la Pr1 ha sido secuenciada, los sitios de unión son similares a los de la regulación de nitrógeno y el carbono en *Aspergillus nidulans*. (Screen *et al.*, 1997; Screen *et al.*, 1998). La Pr1 es el mayor producto de la formación del apresorio sobre superficies artificiales o en la cutícula de insectos. En cultivos pobres en nitrógeno y carbono tanto Pr1 y Pr2 se encuentran presentes (St. Leger *et al.*, 1988c), mientras en medios mínimos (sales y no nutrientes) y proteína soluble como seroalbumina bovina (BSA) se reprime la producción de Pr1 a la vez que permiten la síntesis de Pr2. Generalmente la Pr2 es menos regulada que la Pr1 (Charnley, 2003).

La Pr1 es reprimida por la utilización de metabolitos fácilmente asimilables (por ejemplo glucosa y alanina) (St. Leger *et al.* 1988, St. Leger *et al.*, 1989 a). El sistema de mensajes que interviene en el efecto de la carencia de nutrientes y la regulación de la transcripción de los genes de la Pr1 todavía no se ha establecido. Las evidencias indican que los cAMP no participan (St. Leger *et al.*, 1988; St. Leger *et al.*, 1989b).

Los niveles extracelulares tanto de Pr1 y Pr2 aumentan en cultivos suplementados con cutícula de insecto o con otros polímeros insolubles (celulosa). La Pr1 es específicamente inducida por medio de los péptidos que componen la cutícula de los insectos, pero no por otras proteínas solubles o insolubles (Paterson *et al.*, 1994a; Paterson *et al.*, 1994b). Péptidos de entre 150 – 2000 Da liberados de la cutícula de los insectos por Pr1 o Pr2 inducen la producción de la Pr1 a un nivel similar a la obtenida con cutícula no tratada. La desproteínización y la extracción de lípidos de

la cutícula de los insectos mantienen una baja producción de Pr1. La Pr2, en contraste es inducida por proteínas no específicas (Paterson *et al.*, 1993).

De este modo, la síntesis rápida de proteasas es únicamente posible en tejidos del hospedero cuando la concentración de compuestos fácilmente metabolizables es baja. Este es el caso de la cutícula de los insectos donde los componentes son en gran medida insolubles hasta que son liberados por las enzimas degradadoras de la cutícula (St. Leger *et al.*, 1986c). Sin embargo, la represión podría operar si la liberación de productos de la degradación de la cutícula excediera los requerimientos de los hongos. Así, el proceso de patogénesis involucra la infección relacionada con la morfogénesis y producción de enzimas que ocurre únicamente cuando es necesario para el patógeno establecer una relación nutricional con el hospedero (Charnley, 2003).

La síntesis de quitinasas es regulada por *M. anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1986d) mediante los productos de la degradación de la quitina, a través de un mecanismo inductor-represor. Alta actividad de quitinasas se observa únicamente en cultivos suplementados con quitina, pero no con otros polímeros como pectina, xilan y celulosa. St. Leger *et al.* (1986d) demostraron que en cultivos con deficiencia de carbono el mejor inductor de la quitinasas fue la N-acetilglucosamina (NAG). La glucosamina también permite la producción, esto posiblemente se deba a que la quitina procedente de fuentes naturales (incluida la de los insectos) es parcialmente desacetilada (Hackman y Goldberg, 1974).

St. Leger *et al.* (1998) mostraron que las proteasas y quitinasas fueron únicamente sintetizadas en el pH al cual funcionan con eficacia, independientemente de que el medio contenga el sustrato inductivo tal como la cutícula de insecto, aunque para la mayoría de las enzimas de la cutícula aumentaron 3 veces más su actividad que en el pH óptimo. Las aminopeptidasas fueron producidas a pH 7 (actividad enzimática óptima = pH 7), las metaloproteasas a pH 6-8 (pH óptimo = 7) y la Pr 2 y la Pr1 fueron producidas a pH 8 (pH óptimo de 8). El análisis Northern blot del ARN correspondió a siete secuencias de cDNA de codificación de proteasas y quitinasas

confirmando que el pH del medio juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes de las proteínas secretadas. Durante la infección de los hongos el pH del insecto aumentó de 6.3 a 7.7. La alcalinización de la cutícula, posiblemente por el hongo en sí, es una señal fisiológica que desencadena la producción de los factores de patogenicidad. Es conveniente resaltar que las quitinasas fueron producidas a pH 5 y 8 (pH óptimo = 5); el pH 8, óptimo para la producción de la Pr1 también es importante para la actividad de las quitinasas.

De acuerdo con los cambios observados en el pH de la cutícula durante la micosis, St. Leger *et al.* (1999) observaron que *M. anisopliae* 2575 neutraliza el pH ambiental durante el crecimiento en medio sólido conteniendo extracto de levadura mediante la producción de amonio o ácidos orgánicos (oxálico, succinato y acético). Mutantes de este hongo no producen ácidos orgánicos por que tienen la habilidad de reducir el crecimiento a pH 8 sugiriendo que la producción de ácidos es una habilidad para crecer a pH altos. Los mutantes hiperproductivos de ácido redujeron la producción de proteasas debido a la acidificación del medio. El amoniaco es producido por deaminasas que son reguladas por inducción y represión catabólica. Si bien este trabajo establece la posibilidad de que el amoníaco puede ser un factor de virulencia de hongos entomopatógenos, también complica la interpretación de la función orgánica de producción de ácido por estos hongos (Charnley, 2003).

1.4 Producción de quitinasas por *Lecanicillium lecanii* en medio sólido

L. lecanii produce proteasas, quitinasas y lipasas que degradan la cutícula de los afidos (Askary *et al.*, 1999). Por lo que se considera que la sobrevivencia y efectividad de estos hongos entomopatógenos depende de su capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas (Paterson *et al.*, 1994; St. Leger *et al.*, 1996b; Askary *et al.*, 1997).

Debido a la importancia que tienen las quitinasas dentro del proceso de patogenicidad tanto de insectos como de hongos fitopatógenos, Higuchi *et al.* (1998) y Patil *et al.* (2000) sugieren el tratamiento con estas enzimas antes o en forma

simultánea con conidios de los hongos entomopatógenos para un control más efectivo de las plagas y enfermedades de las plantas cultivadas.

Las quitinasas como productos bioinsecticidas requieren ser producirlas masivamente, esto puede lograrse a través de la fermentación en medio líquido o sólido. Comparando ambos sistemas, en medio sólido se han reportado altos rendimientos utilizando quitina de camarón o de chapulín como inductor de proteasas y quitinasas (Barranco *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2004).

La fermentación en medio sólido (FMS) consiste en un cultivo aerobio o anaerobio de microorganismos que crecen en la superficie o al interior de una matriz sólida porosa. Esta matriz puede estar constituida por un sustrato húmedo o por un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes que se encuentran disueltos en una solución sin escurrimiento de líquidos (Roussos y Perraud-Gaime, 1996). Entre los principales factores que afectan la síntesis de enzimas microbianas en un sistema FMS se encuentran: selección del sustrato y del microorganismo adecuado; pre-tratamiento del sustrato, tamaño de las partículas (entre las partículas del espacio y la superficie) del sustrato; contenido de agua y actividad de agua (a_w) del sustrato, humedad relativa, tipo y tamaño del inóculo, el control de temperatura de la fermentación de materia/remoción de calor metabólico, período de cultivo, mantenimiento la uniformidad en el entorno del sistema de FMS y la atmósfera de gases, es decir, la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de evolución de dióxido de carbono (Pandey, 1999).

1.4.1 La quitina como sustrato

La quitina es un polisacárido compuesto por moléculas de N-acetil-D-glucosamina (NAG) unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. Es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, calculándose que más de 100 billones de toneladas de quitina son producidas anualmente por desechos de

crustáceos y microorganismos (Muzzarelli, 1977; Simpson *et al.*, 1994; Subasinghe, 1995).

Para la extracción de quitina proveniente de residuos de camarón se utilizan procesos químicos y biológicos. El método convencional de producción involucra el uso de ácidos y álcalis fuertes, proceso que es ecológicamente agresivo y contaminante. Shirai *et al.* (2001), Cira *et al.* (2002) y Plascencia *et al.* (2002) mencionan que un método amigable con el ambiente lo constituye la fermentación de los desechos de camarón por medio del ensilado utilizando el ácido de la fermentación bacteriana, lo que permite obtener valor agregado a los residuos tales como quitina, pigmentos y proteínas.

La hidrólisis enzimática de la quitina se lleva a cabo por medio de un sistema quitinolítico que es clasificado como: endo-quitinasas (EC 3.2.1.1.4), exo-quitinasas (EC 3.2.1.14), quitobiosas (EC 3.2.1.30) y β -N-acetilhexosaminidasas (EC 3.2.1.52). Las endo-quitinasas rompen al azar en puntos internos de la cadena de la quitina, produce oligómeros de N-acetil glucosamina de bajo peso molecular tales como: quitotetrarosa y quitotriosa, eventualmente libera diacetilquitobiosa como producto predominante. Las exo-quitinasas liberan diacetil-quitobiosa con la producción de N-acetil glucosamina u oligómeros. La β -N-acetilhexosaminidasa divide a la diacetilquitobiosa así como la quitotriosa y quitotetrarosa en monómeros de N-acetil glucosamina (Figura 1) (Deshpande, 1986; Nuero, 1995; Flach *et al.*, 1992; Tronsmo *et al.*, 1996).

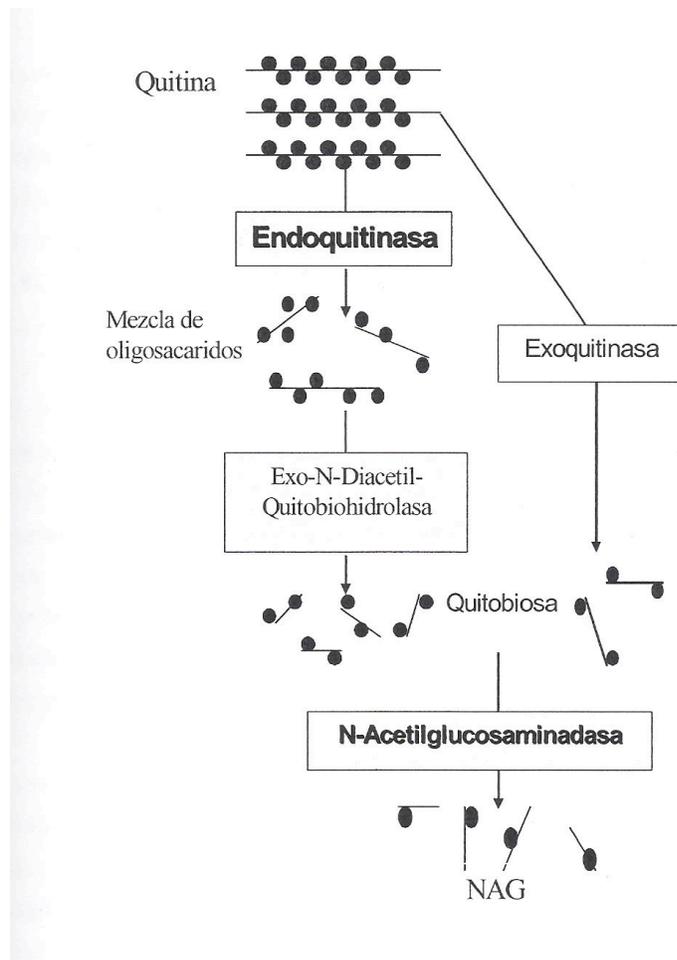


Figura 1. Degradación de quitina mediante endoquitinasas, exoquitinasas y oligosacaridasas. N-acetil-D-glucosamina (NAG); grupo acetilo (●) (Tomado de Horsch *et al.*, 1997).

1.4.2 Inducción de quitinasas en diferentes fuentes de carbono

Las quitinasas son producidas por los hongos constitutivamente durante el crecimiento apical y son detectadas en bajos niveles. La adición de quitina a los medios de cultivo induce la producción extracelular de las quitinasas (Young *et al.*, 1985; Deshpande, 1986; St. Leger *et al.*, 1986d; Biodochka y Khachatourians, 1988; Nuero, 1995; Fenice *et al.*, 1996).

Además de la quitina, algunas fuentes de carbono actúan como inductores de las quitinasas tales como glucosamina, N-acetilglucosamina, quitobiosa y quitooligosacaridos, la selección de alguna de estas fuentes de carbono depende del microorganismo con el que se trabaje. Por ejemplo, *Serratia marcescens* utiliza a la quitobiosa como inductor, pero, cuando se utiliza un derivado de la quitina más hidrolizado como la N-acetilglucosamina la producción de esta enzima es reprimida (Deshpande, 1986).

Oranusi y Trinci (1985) mencionan que la producción de quitinasas depende del substrato utilizado. Cuando ellos utilizaron quitina coloidal los rendimientos de quitinasas de bacterias tales como *Vibrio alginolyticus*, *Streptomyces griseus*, *Arthobacter G12*, *Bacillus* sp. y *Cytophaga* aumentaron, pero, cuando el medio fue preparado con quitina coloidal más glucosa, la quitinasas no fueron detectadas en el medio de cultivo porque la glucosa provoco una represión. Por otra parte, la actividad quitinolítica disminuyó considerablemente cuando la pared celular de hongos fue adicionada al medio de cultivo.

La expresión de quitinasas extracelulares por hongos muestra un patrón similar al de las bacterias en términos de inducción-represión. Por ejemplo, la síntesis extracelular de quitinasas en *M. anisopliae* y *B. bassiana* es regulada por niveles de N-acetilglucosamina mediante un mecanismo de inducción-represión (St. Leger *et al.*, 1996b). St. Leger *et al.* (1993b) obtuvieron niveles altos de quitinasas usando quitina como única fuente de carbono, y disminuyó en un 86 % cuando se utilizo alanina como fuente de carbono, y no se detectó actividad quitinolítica al utilizar celulosa como sustrato. Esto indica que la producción de enzimas es regulada por la degradación de los productos de la quitina.

Bidochka y Khachatourians (1988) encontraron que niveles altos de actividad quitinolítica fueron detectados cuando creció *B. bassiana* sobre cutícula de insectos, liberando suficiente NAG para proporcionar al hongo la fuente de carbono y nitrógeno necesaria para su crecimiento. La producción de quitinasas es inducida con NAG a

bajas concentraciones ya que cuando se aumentó la concentración la actividad quitinolítica disminuyó considerablemente.

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* produce quitinasas extracelulares únicamente durante la penetración e invasión de la cutícula de los insectos, estas enzimas son extremadamente reguladas por los productos de la degradación de la cutícula de los insectos. Además de la quitina como inductor de la producción de quitinasas existe otro mecanismo de inducción, este es el pH del medio donde se desarrolla el hongo. Las quitinasas muestran una estabilidad enzimática a pH óptimos, de 5 a 7 para *M. anisopliae* y de 4 a 9 para *B. bassina* (St. Leger *et al.*, 1998; Khachatourians, 1991).

Por último, la producción de quitinasas está regulada por un mecanismo de represión catabólica que a su vez es regulado por un mecanismo de inducción-represión. Dependiendo del hongo van a ser los compuestos represores o inductores (St. Leger *et al.*, 1986d; St. Leger *et al.*, 1993b; Fenice *et al.*, 1996; Tronsmo *et al.*, 1996). La función de la represión catabólica en la producción de enzimas por los microorganismos como los hongos es asegurar y organizar una utilización secuencial de las fuentes de carbono, cuando más de una está presente en el medio. Bajo estas condiciones, la célula cataboliza la fuente de carbono de más fácil procesamiento como por ejemplo la glucosa, mientras que las síntesis de ciertas enzimas requeridas para la utilización de otros sustratos es reprimida hasta que el sustrato primario se haya agotado.

1.4.3 Condiciones de producción de quitinasa

Tomando en consideración los avances existentes en la literatura, para la producción y actividad quitinolítica en hongos filamentosos como *Lecanicillium lecanii* se debe considerar diferentes factores, tales como: tiempo de incubación, pH del medio, temperatura en que se realiza el proceso, humedad del sustrato, actividad de agua del sustrato, edad del inóculo, tipo de inóculo (conidias o micelio) y tipo de

fermentación (Nuero, 1995; Fenice *et al.*, 1996; Barranco *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2004).

Durante la fase exponencial de crecimiento es cuando *L. lecanii* comienza a producir las quitinasas (N-acetilhexosaminidasas), pero, previamente se producen otras enzimas como proteasas y endoquitinasas (Fenice *et al.*, 1996; Shirai, 2006). *L. lecanii* produce quitinasas en medios con quitina coloidal como única fuente de carbono e inicia la actividad quitinolítica desde las 24 horas hasta alcanzar el máximo de actividad hasta las 72 horas. La adición de 0.2 % de glucosa produce un retraso de 24 horas en la producción de quitinasas pero se mejoran los rendimientos (Fenice *et al.*, 1998). La productividad de las enzimas puede incrementar cuando se reemplaza quitina coloidal con quitina cruda (Matsumoto *et al.*, 2004).

El pH del medio es limitante en la producción de quitinasas, por lo general este pH se encuentra en el mismo rango en que las enzimas muestran su máxima actividad. *L. lecanii* produce quitinasas en pH de 4-7, pero con una actividad alta a pH 5 (Fenice *et al.*, 1998). La producción de quitinasas puede aumentar a medida que el pH cambia de 5 a 8, mientras que a un pH constante de 5 la actividad de las quitinasas se reduce (Rocha, 2007).

La producción de quitinasas se incrementa significativamente cuando la quitina coloidal o quitina cruda es mezclada con el soporte en FMS, o cuando el micelio se usa como inóculo, en lugar de las esporas, (Matsumoto *et al.*, 2004; Suresh y Chandrasekaran, 1999).

También es importante tomar en consideración que el soporte utilizado en la fermentación sólida influye en procesos fisicoquímicos tales como la productividad y pureza del extracto enzimático de las quitinasas. Por ejemplo, con el bagazo de caña de azúcar como soporte en la fermentación sólida se obtienen altos rendimientos. Sin embargo, los extractos enzimáticos mostraron una alta concentración de impurezas provenientes del soporte, que puede dificultar la purificación (Matsumoto *et al.*, 2004).

El soporte hecho con espuma de poliuretano (PUF) saturado con quitina coloidal puede proporcionar extractos enzimáticos más limpios con alto rendimiento de las enzimas. Sin embargo el tamaño y la forma de PUF influyen en la morfología y fisiología de los hongos, así como el tipo de quitinasas producidas (endo o exo quitinasas) (Marin *et al.*, 2008).

1.4.4 Uso de la quitinasas en la agricultura

Las quitinasas no tienen establecido un uso a escala comercial, por su alto costo. Sin embargo, existe investigación en diferentes campos particularmente en la aplicación de las quitinasas como bioinsecticidas y acerca del entendimiento acerca de los mecanismos antagónicos (Shirai, 2006).

En el área de control biológico se ha sugerido el uso de los extractos enzimáticos crudos con alta actividad quitinolica para el control de enfermedades foliares y en el pretratamiento o el uso simultaneo de la mezcla de conidias de hongos entomopatógenos para el control de insectos de cuerpo blando (Deshpande, 1999, Patil *et al.*, 2000; Nahar *et al.* 2004). Sin embargo el desarrollo de tecnología adecuada para la obtención de grandes cantidades de extractos enzimáticos, así como para su aplicación en el campo agrícola, aun constituye un reto.

1.5 Literatura Citada

- Askary, H., Benhamou, N. and Brodeur, J. 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology* 87 (3):359-368.
- Askary, H., Benhamou, N. and Brodeur, J. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 1-13
- Barranco, F. J.E., Alatorre, R.R., Gutiérrez, R.G., González, V. and Saucedo, C.G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:910-915.
- Barson, G. 1976. Laboratory studies on the fungus *Verticillium lecanii*, a larval pathogen of the large elm bark beetle (*Scolytus scolytus*). *Annals of Applied Biology* 83:207-214.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1988. N-Acetyl-D-Glucosamine mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(11):2699-2704.
- Bogo, M. R., Rota, C. A., Pinto, H., Ocampos, M., Correa, C. T., Vainstein, M. H. and Schrank, A. 1998. A chitinase encoding gene (chitl gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology* 37:221-225.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. and Latgé, J.P. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54(7): 1795-1805.
- Boucias, D.G. and Pendland, J.C. 1991. Attachment of mycopathogen to cuticle. In: Cole, G.T. and Hoch, H.C. (ed) 1991. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, USA. pp. 101-127.
- Boucias, D.G. and Pendland, J.C. 1998. *Principles of insect pathology*. Kluwer Academic Publishers.
- Brady, B.L. 1979. *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. Description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute Set-61 No. 610.

- Brey, P.T., Latgé, J.P. and Prevost, M.C. 1986. Integumental penetration of the pea aphid *Acyrtosiphum pisum*, by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *Journal of Invertebrate Pathology* 48:34-41.
- Buckner, J.S., Mardaus, M.C. and Nelson, D.R. 1996. Cuticular lipid composition of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* pupae. *Comprehensive Biochemical Physiology* 114B:207-216.
- Charnley, A.K. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In: Whipps, J.M. and Lumsden, R.D. (ed) 1989. *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge University Press. Great Britain. pp 86-125.
- Charnley, A.K. and St. Leger, R.J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole, G.T. y Hoch, H.C. (Edts). 1991. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York, USA. Ed. Plenum Press. 267- 286.
- Charnley, A.K. 1994. Recent advances in the study of entomopathogenic fungi. In: XXVIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Montpellier, France. 28 August-2 September. pp. 292-297.
- Charnley, A.K. 2003. Fungal pathogens of insect: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research* 40:241-321.
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. and Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37:1359-1366.
- Cooper, R. M. and Wood, R. K. S. 1975. Regulation of synthesis of cell-wall degrading enzymes by *Verticillium lecanii* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersiei*. *Physiological Plant Pathology* 5:135-156.
- Cooper, R. M., Rankin, B. and Wood, R. K. S. 1978. Cell-wall degrading enzymes of vascular wilt fungi II. Properties and modes of action of polysaccharidases of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology* 13:101-134.
- Coudron, T.A., Kroha, M.J. and Ignoffo, C.M., 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Canadian Biochemistry and Physiology* 79B: 339-348.

- Deshpande, M.V. 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 45:273-281.
- Deshpande, M.V. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology* 25(3):229-243.
- Drummond, J., Heale, J.B. and Gillespie, A.T. 1987. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology* 111:193-201.
- Drummond, J. y Heale, J.B. 1988. Genetic studies on the inheritance of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52:57-67.
- Easwaramoorthy, S. and Jayaraj, S. 1978. Effectiveness of the white halo fungus, *Cephalosporium lecanii*, against field populations of coffee green bug, *Coccus viridis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32:88-96.
- Feng, M.G., Johnson, J.B. and Kish, L.P. 1990. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Hypomycetes) for six species of cereal-infesting aphids (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 19:815-820.
- Fenice, M., Selbmann, L., Di Giambattista, R., Petruccioli, M. and Federici, F. 1996. Production of extracellular chitinolytic activities by a strain of the antarctic entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Chitin Enzymology* 2:285-292.
- Fenice, M., Selbmann, L., Di Giambattista, R. and Federici, F. 1998. Chitinolytic activity at low temperature of an Antarctic strain (A3) of *Verticillium lecanii*. *Research in Microbiology*. 149(4):289-300(12).
- Flach, J., Pilet, P.E. and Jolles, P. 1992. What's new in chitinase research?. *Experientia* 48:701-716.
- Glare R. Travis 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. In: Arora D.K., Ajello L., K.G. Mukerji. *Handbook of Applied Mycology. Humans, Animals and Insects*. Marcel Dekker, Inc. New York. Vol. 2: 547-611.

- Hackman, R. H. and Goldberg, M. 1974. Light scattering and infra-red spectrophotometric studies of chitin and chitin derivatives. *Carbohydrate Research* 38:3545.
- Hajek, A.E. y Leger, R. J. St. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review Entomology* 39:293-322.
- Hajek, A.E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology* 15:193-249.
- Hall, R.A. 1976. *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 389-391.
- Hall, R.A. and Burgues, H.D. 1979. Control of aphids in glasshouses with the fungus, *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology* 93:235-246.
- Hall, R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scales. In: Burges, H.D. (ed) *Microbial Control of Pest and Plant Disease*. Academic Press, New Yourk. pp 483-498.
- Hall, R.A. 1982. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouse by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology* 101: 1-11.
- Harper, A.M. and Huang, H.C. 1986. Evaluation of the entomophagous fungus *Verticillium lecanii* (Moniliales:Moniliaceae) as a control agent for insects. *Environmental Entomology* 15:281-284.
- Hegedus, D. and Khachatourians, G. 1995. The impact of biotechnology on hypomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances* 13:455-490.
- Hepburn, H.R. 1985. Structure of the integument. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (Eds) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol 3. Pergamon, Oxford. pp. 1-58.
- Higuchi, T. Okubo, K. Saiga, T., Senda, S. Enzymatic treatment in control of insects pests with entomopathogenic fungi. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 10067613 A2 10 Mar 1998 Heisei*. (CA 1998;128:Patent 254077).
- Horsch, M., Mayer, C., Sennhauser, U. and Rast, D. 1997. β -N-Acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents. *Pharmacology Therapy* 76:187-218.

- Hurion, N., Fromentin, H., and Keil, B. 1979. Specificity of the collagenolytic enzyme from the fungus *Entomophthora coronata*: Comparison with the bacterial collagenase from *Achromobacter iophagus*. Archives of Biochemistry Biophysics 192: 438-445.
- Johnson, D.L., Huang, H.C. and Harper, A.M. 1988. Mortality of grasshoppers (Orthoptera:Acrididae) inoculated with a Canadian isolate of the fungus *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrate Pathology 52: 335-342.
- Kanagaratnam, P, Hall, R.A. and Burges, H.D. 1982. Control of glasshouses whitefly, *Trialeturodes vaporariorum*, by an aphid strain of the fungus *Verticillium lecanii*. Annals of Applied Biology 100:213-219.
- Kang, S. C., Park, S. and Lee, D. G. 1998. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters 165: 267-271.
- Kang, S. C., Park, S. and Lee, D. G. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 73: 276-281.
- Kershaw, M.J. and Talbot, N.J. 1998. Hydrophobins and repellents: Proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. Fungal Genetic Biology 23:18-33.
- Khachatourians, G.G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: Howard, D.H., and Miller, J.D. (Eds.) The Mycota VI. Human and animal relationship. Springer. Berlin, Alemania. pp 331-364.
- Khachatourians G.G. 1991. Physiology and Genetics of entomopathogenic fungi. In: Arora D.K., Ajello. L.K.,G. Mukerji. Handbook of Applied Mycology Humans, Animals and Insects. Marcel Dekker, Inc. New York. 613-663
- Lecuona, R., Riba, G., Cassier, P. and Clement, J. L. 1991. Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *Beauveria brongniartii*. Journal of Invertebrate Pathology 58:10-18.
- Marin, C. Ma. C., Matsumoto, Y., Ramírez, C.L., Rocha, P.Z., Viniegra, G. and Shirai, K. 2008. Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. 2008. Process Biochemistry. 43 (1): 24–32

- Matsumoto, Y., Saucedo, C.G., Revah, S. and Shirai, K. 2004. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry* 39:665-671.
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P.A., Bridge, P.D. and Riba, G. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycology Research* 101(2):159-164.
- Muzzarelli, R.A.A. 1977. Chitin. Oxford:Pergamon Press.
- Nahar, P., Ghormade, V. and Deshpande, M. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisoplae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 85:80-88.
- Nuero, O.M. 1995. Production of chitinase by *Fusarium* species. *Current Microbiology*. 30(5):287-289.
- Oranusi, N.A. and Trinici, A.P.J. 1985. Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. *Microbios* 43:17-30.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77(1):149-162.
- Paterson, I.C. Charnley, A.K., Cooper, R.M. and Clarkson, J.M. 1993. Regulation of production of trypsin-like proteases by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisoplae*. *FEMS Microbiology Letters* 109: 323-328.
- Paterson, I. C., Charnley, A. K., Cooper, R. M. and Clarkson, J. M. 1994a. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisoplae*. *Microbiology* 141:3153-3159.
- Paterson, I. C., Charnley, A. K., Cooper, R. M. and Clarkson, J. M. 1994b. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisoplae*. *Microbiology* 140: 185-189.
- Patil, R.S., Ghormade, V. y Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 473-483.

- Petch, T. 1925. Studies in entomogenous fungi. Transactions of British Mycological Society 16:55-75
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society 16:55-75.
- Pinto, A. D. S., Barreto, C. C., Schrank, A., Ulhoa, C. J. and Vainstein, M. H. 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Canadian Journal of Microbiology 43: 322-327.
- Plascencia, J.M., Olvera, M.A., Arredondo, J.L.A. and Shirai, K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp-head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. Journal of Science Food and Agriculture 82:753-759.
- Puterka, G.J., Humber, R.A. and Poprawski, T.J. 1994. Virulence of fungal pathogens (Imperfect fungi: Hyphomycetes) to pear psylla (Homoptera: Psyllidae). Environmental Entomology 23(2):514-520.
- Reyes, F. and Byrde, R. J. W. 1973. Partial purification and properties of N-acetylglucosaminidase from the fungus *Sclerotinia fructigena*. Biochemical Journal 131:381-388.
- Rocha, P. Z. 2007. Cultivo en medio líquido de *Lecanicillium lecanii* utilizando quitina e hidrocarburos como fuente de carbono. Tesis de especialidad en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 43 p.
- Ruiz, H.J. 1991. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press. USA. pp 248.
- Roussos, S. y Perraud-Gaime, I. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. In: Galindo, E. (Ed). 1996. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. pp. 341-348.
- Rutter, P.R. and Vincent, B. 1980. The adhesion of microorganisms to surfaces: physico-chemical aspects. In: Berkeley, R. C. W., Lynch, J. M., Melling, J., Rutter P. R. and Vincent, B. (ed.) 1980. Microbial adhesion to surfaces. London, United Kingdom: Ellis Horwood Limited. pp. 79-91.

- Samsinakova, A., Misikova, S. y Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 322-330.
- Samsinakova, A. and Misikova, S. 1973. Enzyme activities in certain entomophagous representatives of Deuteromycetes (Moniliales) in relationship to their virulence. *Ceska Mykologie* 27(1):55-60.
- Samson, R. A. 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. In: Burges, H.D. (ed) 1981. *Microbial control of pest and plant diseases*. Academic Press, London. pp. 93-105.
- Screen, S., Bailey, A., Charnley, K., Cooper, R. and Clarkson, J. 1997. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Current Genetics* 31, 511-518.
- Screen, S., Bailey, A., Charnley, K., Cooper, R. and Clarkson, J. 1998. Isolation of a nitrogen response regulator gene (*nrrl*) from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 221:17-24.
- Shah, P.A. and Pell. J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:413-423.
- Shirai, K.M., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., Gonzalez, O. R. and Hall, G.M. 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology* 28:446-452.
- Shnitka, T. K. 1974. Esterases-nonspecific esterases. In: Hayat, M.A. (Ed) *Electron Microscopy of Enzymes*, Van Nostrand-Reinhold. Princeton, N.J. pp. 1-53.
- Simpson, B.K., Gagne, N. and Simpson, M.V. 1994. Bioprocessing of chitin and chitosan. In: Martin, A.M. (ed.) 1994. *Fisheries Processing: Biotechnological applications*. Chapman and Hall. London. pp.155-173.
- Skinner, M., Perker, B.L and Bergdahl, 1991. *Verticillium lecanii*, isolated from larvae of pear thrips, *Taeniothrips inconsequens*, in Vermont. *Journal of Invertebrate Pathology* 58(2):157-163.

- Smith, R. J., Pekrul, S. and Gula, E. A. (1981). Requirements for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the cornworm *Heliothis zea*. *Journal of Invertebrate Pathology* 38:335-344.
- Smith, R.J. and Gula, E. A. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 42:319-326.
- Spencer, D.M. and Atkey, P.T. 1981. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77:535-542.
- St. Leger, R. J., Charnley, A. K. and Cooper, R. M. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi-mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 47:295-302.
- St. Leger, R. J., Charnley, A. K. and Cooper, R. M. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48:85-95.
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1986c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 47:167-177.
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1986d. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi regulation of production of Chitinolytic Enzymes. *Journal of General Microbiology* 132:1509-1518.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 253:221-232.
- St. Leger, R.J., Durrands, P.K., Charnley, A.K., and Cooper, R.M. 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology* 150:413-416.
- St. Leger, R. J., Butt, T. M., Staples, R. C. and Roberts, D. W. 1989a. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13: 253-262.
- St. Leger, R. J., Roberts, D. W. and Staples, R. C. 1989b. Calcium-mediated calmodulin-mediated protein synthesis and protein phosphorylation during

- germination growth and protease production by *Metarhizium anisopliae*. Journal of General Microbiology 135:2141-2154.
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1991. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 58:415-426.
- St. Leger, R.J. 1993a. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. In: Beckage, N.E., Thompson, S.N. and Federici, B.A. (Eds) 1993. Parasites and Pathogens of Insects. Vol. 2. Academic Press. USA pp. 211-229.
- St. Leger, R. J., Staples, R. C. and Roberts, D. W. 1993b. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. Journal of Invertebrate Pathology 61: 81-84.
- St. Leger, R.J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1993c. Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of General Microbiology* 139: 237-243.
- St. Leger, R. J., Bidochka, M. J. and Roberts, D. W. 1994. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 314: 392-398.
- St. Leger, R.J. 1995a. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany* 37(Suppl. 1):S1119-S1125.
- St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J. and Roberts, D. W. 1995b. Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. *Mycological Research* 99:1034-1040.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W. and Roberts, D.W. 1996 a. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1257-1264.
- St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W. and Roberts, D. W. 1996b. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal

- invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. Applied and Environmental Microbiology 62: 907-912.
- St. Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D.W. 1997 a. Adoption of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. Microbiology 143:1983-1992.
- St. Leger, R.J. and Roberts, D.W. 1997b. Engineering improved mycoinsecticides. Trends Biotechnology 15:83-87.
- St. Leger, R. J., Joshi, L. and Roberts, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Applied and Environmental Microbiology 64: 709-713.
- St. Leger, R. J., Nelson, J. O. and Screen, S. E. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. Microbiology 14K:2691-2699.
- Steinkraus, D.S. 2006. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. Journal of Invertebrate Pathology 92:125-131.
- Stirling, J. L., Cook, E. A. and Pope, A. M. S. 1979. Chitin and its degradation. In: Burnett, J. A. and Trinci, C. (Eds) Fungal walls and hyphal growth. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 169-188.
- Subasinghes, S. 1995. The development of crustacean and mollusc industries for chitin and chitosan resources. In: Zakaria, M.B, Wan-Muda, W.M. and Abdullah, M.P. (ed.) 1995. Chitin and Chitosan. Malaysia:Penerbit Universiti Kebangsaan. pp. 27-34.
- Suresh, P.V. and Chandrasekaran, M. 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochemistry 34:257-267.
- Tronsmo, A., Hjeljord, L., Klemsdal, S.S., Varum, K.M., Nordtveit, H.R., and Harman, G.E. 1996. Chitinolytic enzymes from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. In: Muzzarelli R.A.A. (ed) 1996. Chitin Enzymology. Atec Edizioni, Italia. 2:234-244.
- Wessels, J.G.H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. Annual Review Phytopathology 32:413-437.

- Wessels, J.G.H. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genetic Biology* 27:134-145.
- Young, M.E., Bell, R.L. and Chet, I. 1985. Kinetics of chitinases production. I Chitin hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 27 (6):761-775.
- Zare, R. and Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen.nov. *Nova Hedwigia* 73 (1-2): 1-50.
- Zare, R. and Gams, W. 2003. *Lecanicillium lecanii*. Description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute. No. 1565

CAPÍTULO II

PATOGENICIDAD DE AISLAMIENTOS DE *Lecanicillium lecanii* SOBRE EL PULGÓN CENIZO DE LA COL, *Brevicoryne brassicae*: CORRELACIÓN CON EL TAMAÑO DE CONIDIO, VELOCIDAD DE GERMINACIÓN, CRECIMIENTO RADIAL Y ESPORULACIÓN.

2.1 Resumen

Cinco aislamientos de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* provenientes de diferente insecto hospedero, incluyendo uno de una roya fueron caracterizados. Algunas características morfológicas y fisiológicas fueron evaluadas como posible explicación de la virulencia sobre el pulgón cenizo de la col. La infección de adultos ápteros de *B. brassicae* fue significativamente diferente entre aislamientos. El aislamiento más virulento fue el V3 y el menos virulento fue el ARSF 974. El tamaño del conidio mostró diferencias entre aislamientos, con conidio largo se considero a V3 con 7.29 μm , mientras que ARSF 974, ARSF 2009, ATCC 26854 y EH-460 presentaron conidios de 3.34 - 3.40 μm de largo, considerados como conidio corto. El inicio de la germinación (GT_5) vario entre 6 y 9 horas, la GT_{50} 10 y 13 horas y la GT_{95} vario entre 19 y 21 horas entre aislamientos. En medio ADS y AA se evaluó la esporulación y crecimiento radial en placa. Los aislamientos con *conidio* corto produjeron una mayor cantidad de esporas, mientras que V3 de *conidio* largo esporuló menos en ambos medios. La biomasa máxima y la tasa específica de crecimiento fueron similares en los cuatro aislamientos de *conidio* corto mientras que el V3 tuvo mayor biomasa y un crecimiento rápido. No se encontró correlación entre la esporulación, la velocidad de germinación con la virulencia, sin embargo, con respecto al tamaño del conidio, la biomasa máxima alcanzada y la tasa específica de crecimiento se obtuvo una correlación positiva. Los aislamientos V3 y ATCC 26854 mostraron mayor correlación entre la virulencia sobre el pulgón cenizo de la col y las características morfológicas y fisiológicas evaluadas, lo que permite seleccionarlos como aislamientos potenciales para el control de este pulgón.

Palabras clave: *Brevicoryne brassicae*, crecimiento radial, *Lecanicillium lecanii*, tamaño de conidio, virulencia

2.2 Introducción

El pulgón cenizo de la col *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) es una de las plagas más importantes a nivel mundial de crucíferas cultivadas (Ellis y Singh, 1993; Bujanos y Marín, 1996). En México se presenta con abundancia en los meses de enero a marzo y finales de agosto a diciembre (López *et al.*, 1991; Barrios *et al.*, 2004) y su control se realiza principalmente con insecticidas. La preocupación por el desarrollo de resistencia a los insecticidas químicos en poblaciones de áfidos (Foster y Devonshire, 1996) y el incremento de la opinión pública sobre los efectos negativos de los insecticidas en la salud humana, han conducido a la investigación de estrategias de control alternativo de estos insectos.

Dentro de las estrategias de control alternativo se incluye el uso de hongos entomopatógenos. Estos microorganismos causan niveles espectaculares de mortalidad en poblaciones de insectos. A la fecha, varios micoinsecticidas han sido desarrollados y usados en varios países (Inglis *et al.*, 2001). Éstos incluyen formulados con *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Gams y Zare y, *L. longisporum* (Petch) Zare y Gams (originalmente conocidos como *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas) y empleados contra áfidos y mosca blanca entre otros insectos plaga.

Lecanicillium es uno de los principales hongos que ha mostrado alta patogenicidad sobre diferentes poblaciones de áfidos (Feng *et al.*, 1990; Alatorre, 1994; Prommer, 1992; Belman *et al.*, 1994; Milner, 1997; Alatorre y Guzmán, 2000; Alavo *et al.*, 2001). Además se ha demostrado que *L. lecanii* presenta grandes diferencias intraespecíficas con respecto al rango de hospederos, patogenicidad, características morfológicas, fisiológicas y genéticas (Brady, 1979; Sugimoto *et al.*, 2003). Debido a la gran variabilidad intraespecífica entre aislamientos, es imprescindible la identificación de las características biológicas y fisiológicas relacionadas con la virulencia para una mejor selección y desarrollo de los hongos entomopatógenos como micoinsecticidas.

Entre los criterios de selección se incluyen viabilidad y velocidad de germinación de las esporas, que favorece el inicio de la infección (Jackson *et al.*, 1985), así como alta esporulación relacionada con el desarrollo de epizootias (Drummond y Heale, 1988). Hall (1984) y Jackson *et al.* (1985) relacionaron la velocidad de germinación y la esporulación con el tamaño de los conidios y expresión de la virulencia de *Lecanicillium lecanii* sobre el áfido *Macrosiphoniella sanborni*. Mejorar la virulencia de los hongos entomopatógenos puede lograrse entendiendo los mecanismos de patogenicidad. En el presente trabajo se comparo la virulencia de cinco aislamientos de *Lecanicillium lecanii* sobre *B. brassicae* y se correlaciono con algunas características del hongo como: velocidad de germinación, crecimiento y esporulación en placa en dos medios de cultivo y tamaño del conidio con el objetivo de entender la interacción insecto-hongo.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Aislamientos y preparación de inóculo

Un total de 5 aislamientos de *L. lecanii* procedentes de diferente hospedero y localidad fueron usados en este estudio (Cuadro 2.1). Entre éstos se incluyen dos aislados de diferente especie de áfido (ARSEF 974 y ARSEF 2009), una escama (ATCC 26854), una roya (Herbario XAL del Instituto de Ecología, A. C: EH-460) y un aislamiento de *Diatraea saccharalis* (V3).

Los hongos fueron propagados en cajas Petri (90 mm) con medio Sabouraud Dextrosa Agar (ADS), incubándose a 25° C en obscuridad durante 10 días. Todos los aislamientos fueron conservados en glicerol al 10% (v/v) a -80° C.

Los conidios de los diferentes aislamientos fueron cosechados a los 10 días de cultivos en ADS, agregando 10 ml de Tween 80 al 0.01% esterilizado y raspando la superficie con una barra de cristal. La suspensión de conidios se agito en un Vortex por dos minutos y se filtro a través de pañalina para remover grumos o fragmentos de hifas,

ajustándose a una concentración de 1×10^7 conidios/mL usando una cámara de Newbauer bajo un microscopio de luz (400x).

2.3.2 Bioensayo

Adultos ápteros de *B. brassicae* obtenidos de una colonia establecida en condiciones controladas de laboratorio fueron transferidos al envez de discos de hojas de brócoli. Los discos de 4.8 cm de diámetro de hojas de brócoli colocados en cajas petri (50 mm) se fijaron con el haz sobre agar-agua al 2% de tal manera que el envés infestado por los áfidos quedaba hacia arriba (Vidal *et al.*, 1997). Los discos de hoja con los adultos ápteros ya establecidos fueron tratados con cada uno de los aislamientos usando una torre de pulverización equipada con una boquilla de cono sólido (Cat. 1/4J-SS+SU1A-SS, Spraying Systems). Se aplicaron 5 mL de una suspensión de 1×10^7 conidios/mL de cada uno de los aislamientos a 10 libras de presión y al testigo se le aplicó una solución de Tween 80 al 0.01 %. Cajas petri con agar-agua al 2% de 30 mm de diámetro también se asperjaron para estimar el número de conidios por cm^2 y la germinación de los conidios. Cuatro círculos de hojas de brócoli con 20 pulgones cada una y cuatro cajas con agar-agua fueron asperjadas con cada uno de los aislamientos en cada ensayo. Todo el ensayo fue repetido dos veces.

Después de asperjados los círculos de hojas, se dejaron secar y se taparon, estos dispositivos fueron incubados en oscuridad a 25 °C y 95 % de humedad. A las 24 horas, muestras de 100 conidios fueron examinados en cada caja de agar-agua para estimar la germinación y la dosis/ cm^2 . Todos los aislamientos germinaron arriba del 95 % en los dos ensayos.

Los círculos de hojas con los áfidos se observaron a los cuatro días después de inoculados los pulgones. Los insectos muertos de cada círculo fueron retirados e incubados sobre papel filtro humedecido en una caja petri sellada a 25 ° C en oscuridad por 24 horas y se examinaron para confirmar la presencia de *L. lecanii*.

Debido a la variabilidad en la concentración de *conidios/cm²* a la cual fueron expuestos los afidos, un índice de infección fue obtenido dividiendo la proporción de los pulgones infectados después de cuatro días de asperjados entre la dosis en esporas/cm² (Vandenberg, 1996). El índice de infectividad fue transformado y comparado entre aislamientos mediante un ANOVA y las medias se separaron con la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD)(SAS, 1999). La proporción de pulgones infectados después de cuatro días de inoculados se transformo a la raíz cuadrada del arcoseno, dividido entre la dosis esporas/cm² transformada a Log10.

2.3.3 Tamaño de los *conidios*

La prueba fue realizada usando portaobjetos y cubreobjetos desinfectados con alcohol al 70%. Se elaboraron preparaciones semipermanentes colocando 10 µL de una suspensión de 1×10^8 conidios/mL de los diferentes aislamientos sobre un portaobjetos, se cubrieron con un cubre objetos y fueron selladas con barniz de uñas. Las muestras fueron observadas con el objetivo de 40X en un fotomicroscopio III de Carl Zeiss conectado a una cámara digital para microscopia PaxCam. A 200 *conidios* por aislamiento se les tomo una fotografía, la imagen se proceso con el programa Adobe Photoshop 7.0 y se analizo con el analizador de imágenes Image Tool 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002) midiendo el largo de los *conidios*. Además, se estimo la desviación estándar de la media del largo del *conidio* de cada uno de los aislamientos (Feng *et al.*, 2002). La correlación entre el largo del conidio y el índice de infección fueron analizados para los cinco aislamientos (SAS, 1999).

2.3.4 Velocidad de germinación

La prueba se realizo en una caja petri de 90 mm de diámetro con un triangulo de vidrio, sobre este se coloco un portaobjetos con tres círculos de ADS de 11 mm de diámetro. Por cada aislamiento se colocaron 10 µL de una suspensión de 1×10^6 conidios/mL por círculo de ADS. A cada caja de Petri se les agregó 5 mL de una solución de glicerol al 2 % para mantener alta humedad relativa, se taparon y sellaron

con parafilm. Las cajas fueron incubadas a 25° C en oscuridad. Novecientos *conidios* (300 por cada círculo), germinados y no germinados fueron observadas por caja. Por cada aislamiento se prepararon cinco cajas con tres círculos por tratamiento por lo que un total de 4,500 conidios por tratamiento fueron observados y calculado el porcentaje de conidios germinados. Las observaciones se hicieron a las 8, 12, 16, 20 y 24 horas tomando una caja por tiempo. Con el número de *conidios* germinados y no germinados por cada intervalo de tiempo se estimó la GT₅, GT₅₀ y GT₉₅ con el análisis PROBIT en SAS. El experimento se repitió dos veces. La correlación entre la GT₅, GT₅₀ y GT₉₅ con el índice de infección fue analizado (SAS, 1999).

2.3.5 Crecimiento radial en dos medios de cultivo

Se utilizaron cajas petri con 20 mL de ADS y en un medio de arroz agua (AA). En el caso del medio AA se preparó una solución de extracto de arroz precocido al 5% más 1.5 % de agar. Se empleó 100 g de arroz precocido y 100 mL de agua destilada, filtrando la solución a través de pañalina (Vilmala *et al.*, 2000). Los medios fueron esterilizados a 121 °C durante 30 minutos.

De los cinco aislamientos, círculos de 11 mm de diámetro removidos de cultivos de 10 días de desarrollo se colocaron en forma individual en el centro de la caja Petri con SDA o AA. Las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas por 15 días a 25°C en oscuridad. Se prepararon cinco cajas por cada aislamiento y combinación de medio de cultivo. El crecimiento radial fue registrado cada 48 horas mediante la toma de una fotografía, la imagen se procesó con el programa Adobe Photoshop 7.0 y se analizó con el analizador de imágenes Image Tool 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002) midiendo el área de la colonia. El área se transformó al radio de la circunferencia de la colonia, con estos datos se estimaron los parámetros de la cinética de crecimiento de los cinco aislamientos de *L. lecanii* por medio de la ecuación Logística:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left[\left(\frac{X_{\max}}{X_0} \right) - 1 \right] e^{u_{\max} t}}$$

Donde X fue la biomasa determinada mediante la medición del crecimiento radial en un tiempo dado (t); X_0 fue la biomasa inicial, X_{max} fue la biomasa máxima y μ_{max} fue la tasa específica de crecimiento. Los valores de X_0 , X_{max} , y μ_{max} fueron estimados usando una estimación no lineal (PROC NLIN) en SAS. Los parámetros de la cinética del crecimiento de *L. lecanii* se analizaron mediante un ANOVA y una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Todo el experimento se repitió dos veces. La correlación entre X_0 , X_{max} , y μ_{max} con el índice de infección fue analizado (SAS, 1999).

2.3.6 Esporulación en dos medios de cultivo

Para evaluar la esporulación de cada uno de los aislamientos de *L. lecanii* en los dos medios de cultivo, se utilizaron tres cajas del experimento anterior. Con un sacabocados de 11 mm de diámetro se tomó un círculo del borde de la colonia de 15 días de desarrollo (Sugimoto *et al.*, 2003), la rodaja se depositó en 10 mL de una solución de Tween 80 al 0.1 %. Las esporas de los hongos fueron desprendidas y suspendidas mediante agitación por 2 minutos en un Vortex. La concentración de esporas se determinó usando una cámara de Newbauer bajo un microscopio compuesto. Los datos de esporulación se analizaron por medio de un ANOVA y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). La correlación entre la esporulación con el índice de infección fue analizado (SAS, 1999).

2.4 Resultados

2.4.1 Bioensayo

La infección de adultos ápteros de *B. brassicae* varió significativamente entre los cinco aislamientos de *L. lecanii* (Cuadro 2.1; $F_{4, 35}=2.98$; $P<0.03$). A pesar de la diversidad de los aislamientos de *L. lecanii* (Cuadro 2.2), éstos tuvieron la capacidad de matar al pulgón cenizo de la col a los cuatro días después de inoculados. Los índices de mortalidad más altos se obtuvieron con el aislamiento V3, este requirió 2.3 veces menos inóculo para matar al 71 % de los áfidos, mientras que los otros aislamientos

necesitaron una mayor cantidad de inóculo para matar la misma proporción que el V3 (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Mortalidad de adultos de *Brevicoryne brassicae* expuestos a cinco aislamientos de *Lecanicillium lecanii*.

Aislamientos	Dosis (10 ³ con/cm ²)±DS ¹	% de Mortalidad ²	Índice de infección
ARSF974	8.85±4.98	61	13.021 c
ARSF2009	7.50±2.33	65	13.880 bc
ATCC26854	8.89±3.13	75	15.346 ab
EH-460	7.70±3.10	65	13.863 bc
V3	3.48±1.24	71	16.275 a

¹Promedio ± desviación estándar.

²El porcentaje de mortalidad fue corregido con la fórmula de Abbot (1925).

Media con la misma letra no hay diferencia mínima significativa (LSD) (P≤0.05).

2.4.2 Tamaño de *conidio*

El rango del largo de los *conidios* de los diferentes aislamientos se encontró entre 3.34 a 7.29 µm (Cuadro 2.2). Los *conidios* de mayor tamaño se observaron en V3, el cual presentó el doble del tamaño comparado con los otros aislamientos, con un largo de 7.29±1.59 µm. Considerando el índice de infección y el largo del conidio la correlación fue positiva (Coeficiente de correlación de Pearson =0.38961; P<0.0130).

Cuadro 2.2 Aislamientos de *L. lecanii*, lugar de origen y media del largo de los conidios.

Aislamiento	Hospedero	Origen	Largo del conidio $\mu\text{m}\pm\text{DS}^5$
¹ ARSEF974	Áfidos	Venezuela	3.340 \pm 0.63
ARSEF2009	<i>Toxoptera citricida</i>	Tucumán, Argentina	3.527 \pm 0.74
² ATCC26854	<i>Lecanium corni</i>	Czechoslovakia	3.407 \pm 0.60
³ EH-460	<i>Hemileia vastatrix</i>	Puebla, México	3.409 \pm 0.53
⁴ V3	<i>Diatraea saccharalis</i>	Colima, México	7.295 \pm 1.59

¹ARSEF=Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, EUA.

²ATCC= American Type Culture Collection, EUA.

³EH= Herbario XAL, Instituto de Ecología A.C., México.

⁴Colección del Laboratorio de Patología de Insectos Texcoco, México

⁵Promedio \pm desviación estándar.

2.4.3 Velocidad de Germinación

Los valores obtenidos al inicio de la germinación (GT_5) fueron similares entre los aislamientos ARSF 974, ARSF 2009 y ATCC 26854. El aislamiento EH-460 requirió una hora más de incubación con respecto a los aislamientos anteriores para iniciar la germinación, mientras que el aislamiento V3 inicio su germinación a las 6 horas de realizada la inoculación sobre ADS (Cuadro 2.3). De igual manera la (GT_{50}) para V3 fue más corta que en el resto de los aislamientos. Sin embargo, al considerar el tiempo que toma en germinar el 95 % de las conidias (GT_{95}) de los aislamientos de *L. lecanii* esta no mostró variaciones significativas. Los aislamientos EH-460 y V3 tuvieron la máxima germinación a las 19 horas, mientras que en el ARSF 974 ocurrió a las 20 horas, y en el ARSF 2009 y ATCC 26854 fue a las 21 horas (Cuadro 2.3). La GT_5 y GT_{50} tuvo una correlación negativa con el índice de infección (Coeficiente de correlación de Pearson para $GT_5 = -0.33842$; $P < 0.03$ y $GT_{50} = -0.33680$; $P < 0.03$).

Cuadro 2.3 Velocidad de germinación de cinco aislamientos de *Lecanicillium lecanii*

Aislamientos	Velocidad de germinación		
	GT ₅ (h) (95%L.F.)	GT ₅₀ (h) (95%L.F.)	GT ₉₅ (h) (95%L.F.)
ARSF974	8.09 (7.84-8.31) ¹	12.83(12.64-13.02)	20.37(19.92-20.86)
ARSF2009	8.09(7.83-8.34)	13.31(13.10-15.51)	21.87(21.37-22.43)
ATCC26854	8.52(8.27-8.76)	13.40(13.21-13.59)	21.08(20.62-21.59)
EH-460	9.21(8.97-9.44)	13.43(13.25-13.60)	19.57(19.20-19.98)
V3	5.57(5.30-5.82)	10.41(10.20-10.62)	19.48(18.91-20.12)

¹Intervalo de confianza (95 %).

Los resultados son la combinación de los dos experimentos.

2.4.4 Crecimiento radial

La estimación de los parámetros de la cinética de crecimiento radial mostraron que hay diferencias significativas entre aislamientos tanto en el medio ADS con la X_{max} (Cuadro 2.4; F_{4, 5}=21.41; P<0.005) y la μ_{max} (Cuadro 2.4; F_{4, 5}=20.05; P<0.006); como en el medio AA, X_{max} (Cuadro 2.5; F_{4, 5}=23.29; P<0.004) y μ_{max} (Cuadro 2.5; F_{4, 5}=195.38; P<0.0001). El V3 en medio ADS y AA presento la X_{max} (3.94 y 3.85 respectivamente) y la μ_{max} más altas (0.034 y 0.035 respectivamente, Cuadro 2.4; Cuadro 2.5). La correlación entre el índice de infección y los parámetros de crecimiento en medio ADS para X_{max} (Coeficiente de correlación de Pearson = 0.3633; P<0.02) y para μ_{max} fue positiva (Coeficiente de correlación de Pearson = 0.4033; P<0.009). De igual manera en el medio AA X_{max} (Coeficiente de correlación de Pearson = 0.363247; P<0.02) y μ_{max} fue positiva (Coeficiente de correlación de Pearson = 0.40117; P<0.01).

Cuadro 2.4 Parámetros cinéticos del crecimiento radial en placa y esporulación en medio ADS^a de los diferentes aislamientos de *L. lecanii*

Aislamiento	Xmax (cm) ¹	Xo(cm) ²	μ_{\max} (h ⁻¹) ³	Esporulación x 10 ⁶ con/mL±DS ⁴
974	2.0316 a	0.1343 ba	0.0167 a	7.1±3.7 a
2009	2.2063 a	0.15705 ba	0.0167 a	6.3±1.8 ab
ATCC26854	2.1048 a	0.16005 ba	0.0172 a	3.9±0.9 bc
EH-460	2.2656a	0.1880 a	0.0153 a	2.1±0.7 c
V3	3.9433 b	0.06305 b	0.0347 b	2.2±1.1 c

^aADS = Agar Dextrosa Sabouraud

¹Xmax = biomasa maxima alcanzada.

²Xmo = biomasa inicial.

³ μ_{\max} = tasa de crecimiento en horas.

⁴ Promedio ± desviación estándar.

Media con la misma letra indica que no hay diferencias significativas (Tukey P≤0.05).

Cuadro 2.5 Parámetros cinéticos del crecimiento radial en placa y esporulación en medio AA^a de los diferentes aislamientos de *L. lecanii*

Aislamiento	Xmax (cm) ¹	Xo(cm) ²	μ_{\max} (h ⁻¹) ³	Esporulación x 10 ⁶ con/mL±DS ⁴
974	2.287 a	0.196 ^a	0.013 a	0.23±0.15 ab
2009	2.196 a	0.183 a	0.014 a	0.48± 0.46 a
ATCC26854	2.196 a	0.205 a	0.013 a	0.28±0.06 ab
EH-460	1.953 a	0.195 a	0.014 a	0.22±0.06 ab
V3	3.857 b	0.129 a	0.035 b	0.06±0.01 b

^aAA = Agar-extracto de arroz.

¹Xmax = biomasa maxima alcanzada.

²Xmo = biomasa inicial.

³ μ_{\max} = tasa de crecimiento en horas.

⁴ Promedio ± desviación estándar.

Media con la misma letra indica que no hay diferencias significativas (Tukey P≤0.05).

2.4.5 Esporulaci3n

La esporulaci3n fue significativamente diferente entre aislamientos en el medio ADS (Cuadro 4; $F_{4, 25}=9.55$; $P<0.0001$) y AA (Cuadro 2.5; $F_{4, 25}=2.72$; $P<0.05$). En el medio AA la esporulaci3n fue baja en todos los aislamientos, comparada con la esporulaci3n en el medio ADS (Cuadro 2.4; Cuadro 2.5). La correlaci3n entre esporulaci3n en medio ADS y el 3ndice de infecci3n fue negativa (Coeficiente de correlaci3n de Pearson= -0.333644 ; $P<0.03$).

2.5 Discusi3n

Los cinco aislamientos de *L. lecanii* fueron comparados y diferenciados en base a caracter3sticas morfol3gicas y fisiol3gicas, as3 como de virulencia sobre adultos 3pteros de *B. brassicae*. La variaci3n en la infecci3n se relaciona principalmente con la dosis aplicada sobre el pulg3n, destacando el aislamiento V3 que necesito la mitad de in3culo para matar al 71.35 % de los 3fidos inoculados. El aislamiento EH-460 proveniente de una roya mostro un porcentaje de infecci3n igual al del aislamiento ARSF 2009. Hall (1980) reporta infectividad de *L. lecanii* aislado de hongos fitopat3genos sobre *Macrosiphoniella sanborni*. Jackson *et al.* (1985), mencionan que existe mayor mortalidad de *M. sanborni* con aislamientos de *L. lecanii* provenientes de este 3fido, mientras que con los de otros hospederos la virulencia fue baja.

Generalmente se considera que el aislamiento m3s virulento es el que proviene de una especie relacionada (Goettel *et al.*, 1990), sin embargo, en este estudio es interesante resaltar que los aislamientos provenientes de 3fidos fueron menos virulentos a *B. brassicae*.

Existe una gran variaci3n en el largo de los *conidios* de aislamientos de *L. lecanii*. Cortez *et al.* (2003) los clasificaron en tres tipos de *conidios*: peque1os de 2.9-3.9 μm , conidio intermedio de 4.6-5.8 μm y conidio largo con 6.5-8.8 μm . Considerando el tama1o de los *conidio* de los aislamientos estudiados, cuatro caen en la categor3a de

conidios pequeños (3.34-3.52 μm largo) y sólo uno, el V3 con 7.29 μm de largo en la categoría de conidio largo.

Estudios previos relacionan el tamaño del conidio con la virulencia mostrando una alta correlación entre la infectividad y el largo del conidio (Aitre *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003). Por otra parte, Hall (1984) encontró una relación del tamaño del *conidio* con la virulencia de *L. lecanii* sobre áfidos y mosca blanca, los *conidios* largos tienen un alto potencial epizótico sobre pulgones y los *conidios* cortos sobre mosca blanca. En este estudio se encontró una correlación positiva entre el largo del conidio con la mortalidad del pulgón cenizo de la col. Los aislamientos de *L. lecanii* con conidio corto se diferenciaron del V3 por la dosis aplicada sobre los insectos. Entre más largo el conidio se requirió menor cantidad de inóculo para matar a *B. brassicae*.

Una germinación rápida constituye una oportunidad para que el hongo penetre rápidamente la cutícula del insecto y origine un daño irreversible sobre el insecto hospedero. En nuestro estudio los aislamientos con *conidios* pequeños requirieron mayor tiempo para la germinación, sin embargo, el aislamiento V3 de *conidios* largos, con menor tiempo de germinación provocó un porcentaje de mortalidad de *B. brassicae* parecido al de ATCC26854. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Jackson *et al.* (1985) quienes encontraron que conidios largos, además de germinar más rápido tienen un porcentaje de mortalidad más alto. Por otra parte, Hall (1984) menciona que una germinación rápida de los *conidios* de *L. lecanii* es esencial como prerrequisito para que se establezca una fuerte epizootia en una población.

El crecimiento radial y la tasa de crecimiento de *L. lecanii* no se vio afectado por la composición del medio de cultivo, sin embargo, la esporulación si fue afectada. El medio ADS tiene una relación C: N de 35:1 (Shah *et al.*, 2005) y el medio AA contiene muchos almidones con un bajo porcentaje de nitrógeno, por lo que los rendimientos de conidios en el segundo medio fueron bajos. Es importante conocer la relación C: N del medio de cultivo donde se desarrollan los aislamientos de *L. lecanii* ya que influye

tanto en el crecimiento radial como en el rendimiento de conidios (Jackson y Schisler, 1992; Kamp y Bidochka 2002; Sun y Liu, 2006; Gao *et al.*, 2007).

El crecimiento radial y la tasa de crecimiento de las colonias no tuvieron una aparente relación con un incremento en la esporulación, por ejemplo, V3 presento una tasa de crecimiento radial alta con una esporulación muy baja tanto en el medio ADS y AA. Resultados similares fueron reportados por Kamp y Bidochka (2002) y Shah *et al.*, (2005) quienes mencionan que no hay una aparente relación entre el crecimiento radial y la esporulación de *L. lecanii* y *M. anisopliae* (Metch) Sor.

La tasa de crecimiento es un indicativo de la capacidad del hongo para invadir los sustratos donde crece, pero, también puede ser indicativo de su capacidad para crecer sobre la cutícula de los insectos, como estrategia competitiva contra otros microorganismos durante el ciclo saprofítico acelerando la rápida infección del hospedero (Varela y Morales, 1996). Los aislamientos de *L. lecanii* con *conidio* pequeño presentaron una tasa de crecimiento similar, mientras que V3 de *conidio* largo presento una tasa de crecimiento más alta, lo que podría correlacionarse con la alta capacidad de invadir a los áfidos. Los parámetros estimados de la cinética de crecimiento X_{max} y μ_{max} en el medio ADS y AA tuvieron una correlación positiva con la infección observada en pulgones. Esto explicaría porque V3 tiene la capacidad de invadir y colonizar más rápido al pulgón cenizo de la col.

Los aislamientos utilizados en el presente estudio podrían usarse en el control microbiano del pulgón cenizo, sin embargo, variables como esporulación limitarían el uso de EH-460 y V3 al propagarlos masivamente. Al comparar la velocidad de germinación destacaría el V3 y sobre todo en la dosificación que es menor a los demás aislamientos. Por otra parte, el EH-460 aislado de una roya, al utilizarlo en el control microbiano de *B. brassicae* podría favorecer el control de enfermedades en brócoli así como lo sugiere Hall (1980).

2.6 Conclusión

En el presente estudio el tamaño del conidio de *L. lecanii* influyo en la dosis aplicada sobre el pulgón cenizo de la col, en la esporulación, la velocidad de germinación y en el crecimiento radial en medio de cultivo. La esporulación de *L. lecanii* es dependiente del aislamiento y la nutrición del medio de cultivo en que se desarrolla, sin embargo, no hay una aparente relación con el crecimiento radial y la tasa de crecimiento, un incremento en el crecimiento radial no resulta en un simultáneo incremento en el rendimiento de *conidios*. Por otra parte, los resultados indican que algunas de las características fisiológicas evaluadas no se relacionan con la virulencia, aunque, el tamaño del conidio, la dosis/cm² y la velocidad de crecimiento radial fueron las variables que mejor explican la infección de *L. lecanii* sobre *B. brassicae*

2.7 Literatura Citada

- Abbot, W.A. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Alatorre, R.R. y Guzmán, F.A. 2000. Uso de entomopatógenos para el control de insectos, caso *Brevicoryne brassicae*. In: Bautista, M.N., Suárez, V. y Morales, G.O. (eds) 2000. Temas selectos en Fitosanidad y Producción de Hortalizas. Ed. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 83-90 pp.
- Alatorre, R.R. 1994. Control biológico del pulgón verde (*Brevicoryne brassicae*) de la col y el brócoli. *Agroproductividad* 2:21-25.
- Alavo, T.B.C., Sermann, H. and Bochow, H. 2001. Virulence of strains of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* to aphids: Strain improvement. *Arch. Phytopatho. Pflanz.* 34:379-398.
- Altre, J.A., Vandenberg, J.D. and Cantone, F.A. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73:332-338.

- Barrios-Díaz B. R. Alatorre-Rosas, H. G. Calyecac- Cortero y N. Bautista-Martínez. 2004. Identificación y Fluctuación Poblacional de plagas de col en Acatzingo, Puebla. *Agrociencia* 38(2): 239-248.
- Belmán Rodríguez, J. A., Alatorre Rosas, R., Pérez Valdez, A., Viesca González, F. C. 1994. Patogenicidad de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) sobre el pulgón de la col *Brevicoryne brassicae* L., bajo condiciones de invernadero y campo en Chapingo, México. *Revista Chapingo. Serie Protección Vegetal* 1(1):89-95.
- Brady, B.L. 1979. *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. Description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute set-61 N° 610.
- Bujanos, G.D. y Marín, A.J. 1996. Plagas de los cultivos de crucíferas en El Bajío, México. *Publicación Especial Núm. 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Celaya. Guanajuato, México.* 34 p.
- Cortéz, M.H., Alatorre, R.R., Mora, A.G., Bravo, M.H., Ortiz, G.C.F. and Aceves, N.L.A. 2003. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *BioControl* 48:321-334.
- Drummond, J. y Heale, J.B. 1988. Genetic studies on the inheritance of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52:57-67.
- Ellis, P.P. and Singh, R. 1993. A review of the host plants of the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae). *IOBC/WPRS Bulletin* 16:192-201.
- Feng, K.C., Liu, B.L. and Tzeng, Y.M. 2002. Morphological characterization and aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:217-224.
- Feng, M.G., Johnson, J.B. y Kish, L.P. 1990. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Hypomycetes) for six species of cereal-infesting aphids (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 19:815-820.

- Foster, S.J. and Devonshire, A.L. 1996. The continuing threat of insecticide resistance. *Beet Review* 64:15-17.
- Gao, L., Sun, M.H., Liu, X.Z. and Che, Y.S. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the grow and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research* 111:87-92.
- Goettel, M.S., Poprawski, T.J., Vandenberg, J.D., Li, Z. and Roberts, D.W. 1990. Safety to no target invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W. (eds). *Safety of microbial insecticides*. Boca Raton, Florida. CRC press. pp 209-231.
- Hall, R.A. 1980. Laboratory infection of insects by *Verticillium lecanii* strains isolated from phytopathogenic fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 74(2):445-446.
- Hall, R.A. 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Entomophaga* 29(3):311-321.
- Inglis, D.G., Goettel, M.S., Butt, T.M. and Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetus fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C.W. and Magan, N. (Eds) 2001. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI International. Wallingford. pp. 23-69.
- Jackson, C.W., Heale, J.B. and Hall, R.A. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology* 106:39-48.
- Jackson, M.A. and Schisler, A.D. 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spore are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology* 58(7):2260-2265.
- Kamp, A.M. and Bidochka, M.J. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology* 35:74-77.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, and Parker, B. 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metharhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hem: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 82:139-147.

- López, A.B., Alatorre, R.R., Peña, M.R. y López, C.J. 1991. Dinámica poblacional de *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae) en brócoli en Chapingo, México. *Agrociencia serie Protección Vegetal* 2(3):7-19.
- Milner, R.J. 1997. Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga* 42:227-239.
- Promner, M.K.W. 1992. *Biological control of Brevicoryne brassicae with the parasitic fungus Verticillium lecanii* in the laboratory and in the field. *Journal of Plant Diseases and Protection* 99(2):209-217.
- SAS (SAS Institute Inc.) 1999. User's Guide. Statistics Version 8. Sixth edition. SAS Inc. Cary, North. Carolina. USA. 956 p.
- Shah, F.A., Wang, C.S. and Butt, T.M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 251:259-266.
- Steinkraus, D.S. 2006. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *Journal of Invertebrate Pathology* 92:125-131.
- Sugimoto, M., Koike, M., Hiyama, N. and Nagao, H. 2003. Genetic, morphological, and virulence characterization of the Entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82:176-187.
- Sun, MH. and Liu, XZ. 2006. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia* 161:295-305.
- Vandenberg, J.D. 1996. Standardized Bioassay and Screening of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* Against the Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 89(6): 1418-1423.
- Varela, A. and Morales, E. 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the Coffe Berry Borer *Hypothenemus hampei*. *Jornal of Invertebrate Pathology* 85:147-152.
- Vidal, C. Lacey, L.A. and Fargues, J. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a Description of a Bioassay Method. *Journal of Economic Entomology* 90(3):765-772.

- Vilmala, D.P.S., Chowdary, A. and Prasad, Y.G. 2000. Cost-effective multiplication of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson. *Mycopathologia* 151:35-39.
- Wilcox, D., B. Dove, D. McDavid and D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows ver. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.

CAPÍTULO III

EFFECTO DE LA HUMEDAD DEL SUSTRATO ARROZ-QUITINA DE CAMARÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ESPORAS Y ENZIMAS EN FERMENTACIÓN SÓLIDA DE *L. lecanii*.

3.1 Resumen

Se evaluó el efecto de la adición de diferentes cantidades de agua en el sustrato sólido, sobre la esporulación y producción de N-acetil-hexosaminidasa, endoquitinasas y proteasas de *Lecanicillium lecanii*. Bolsas de polipapel y matraces de 250 mL fueron empacados con una mezcla de arroz precocido con quitina de camarón al 0.5 %. Antes de esterilizar el sustrato se le agregó 0, 30, 50, 70, 90 y 100 mL de agua por cada 100 g de sustrato en bolsas de polipapel, en matraz se probaron únicamente las condiciones 0 y 7.25 mL de agua en 25 g de sustrato. La variación en el rendimiento de esporas y enzimas se relacionó principalmente con la cantidad de agua agregada al sustrato. La esporulación máxima en bolsas de polipapel obtenida a los 10 días de incubación fue de 7.02×10^8 conidios/g de sustrato agregando 100 mL de agua. En matraz correspondió a 4.04×10^8 conidios/g de sustrato sin agregar agua. El rendimiento de las N-acetil-hexosaminidasa en bolsas de polipapel fue de 411.70 ± 64.09 mU/ g de sustrato agregando 100 mL de agua al sustrato, mientras que en matraz fue de 464.0211 ± 26.42 mU/g de sustrato agregando 7.5 mL de agua. En matraz a medida que aumentaba la biomasa se incrementó la presencia de N-acetil-hexosaminidasas. En bolsas de polipapel se determinaron mayores actividades de endoquitinasas en la condición de 50 mL que en matraz con rendimientos de 7.00 ± 1.04 U/g de sustrato y 4 U/g de sustrato, respectivamente. Los rendimientos de las proteasas en bolsas de polipapel correspondieron a 4.93 ± 0.56 U/g de sustrato en donde no se agregó agua mientras que en matraces los rendimientos fueron de 2.31 ± 0.395 U/g de sustrato agregando 7.5 mL de agua. En general se encontraron bajos rendimientos de conidios y enzimas en la mezcla arroz-quitina al 0,5%, esto debido posiblemente a que el arroz contiene una gran cantidad de carbohidratos que reprimen la producción de quitinasas. Es decir, a pesar de que la quitina es un inductor

de las quitinasas, cuando se mezcla con carbohidratos, hay represión catabólica. El uso de conidias y enzimas producidas en fermentación sólida usando como sustrato la mezcla arroz con quitina de camarón tiene potencial en el control microbiano de insectos de cuerpo blando.

Palabras clave: arroz, humedad del sustrato, *Lecanicillium lecanii*, quitina de camarón, quitinasas

3.2 Introducción

Lecanicillium lecanii es un importante patógeno de afidos, mosca blanca, trips y escamas, que considerando su alta virulencia ha sido desarrollado como agente de control biológico o micoinsecticida (Hall, 1981; Deshpande, 1999). Las formulaciones de micoinsecticidas contienen esporas que al ser depositadas sobre la cutícula de los insectos, germinan, penetran e invaden el hemocele, cuyo resultado es la muerte del insecto hospedero. Este proceso, dependiendo de las condiciones ambientales y la concentración de esporas tarda entre 4 y 6 días (Hall, 1976). Para acelerar el proceso de infección de los hongos entomopatógenos en condiciones de campo, se ha propuesto utilizar a las enzimas degradadoras de la cutícula (EDC) sobre todo a las quitinasas, asperjándolas sobre la cutícula como un insecticida o bien integrándolos en la formulación de los micoinsecticidas (Samsinakova *et al.*, 1971; Deshpande, 1999; Patil *et al.*, 2000; Nahar *et al.*, 2004). Datos experimentales muestran que al combinar conidios con proteasas (Pr1) la cantidad de inóculo se reduce al igual que el tiempo de mortalidad del insecto (Zhang *et al.*, 2006).

El método más común para la producción masiva de las esporas es la fermentación sólida en granos de arroz, esto debido a los altos rendimientos de esporas que se obtienen (Mendoca, 1992; Dorta *et al.*, 1996). De igual manera las EDC se producen durante el proceso de fermentación en medio sólido y líquido utilizando como sustrato quitina (St. Leger *et al.*, 1986a; Barranco *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2004). Entre los factores que afectan la producción de enzimas y esporas en medio

sólido de diferentes hongos entomopatógenos, se mencionan a la humedad inicial y la actividad de agua (a_w) del sustrato (Pandey *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000). Matsumoto *et al.*, 2004 mencionan que el factor determinante para la producción de quitinasas para el caso de *L. lecanii* en medio sólido utilizando como sustrato quitina de camarón, se relaciona con la actividad de agua del sustrato.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la combinación arroz-quitina de camarón, considerando el contenido de humedad inicial del sustrato, en la producción de esporas, endoquitinasas, N-acetilhexosaminidasas y proteasas de *Lecanicillium lecanii* en bolsas de polipapel y matraz.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

3.3.1.1. Inóculo

L. lecanii (ATCC 26854) fue desarrollado en agar-harina de soya-sacarosa-quitina (15g: 35g: 10g: 10g/L) a 25 °C por 10 días. Los conidios se cosecharon de la superficie de las placas de cultivo usando una solución de Tween 80 al 0.1%. La suspensión resultante se ajusto a 1×10^7 conidios/mL.

Se utilizo un método bifásico para la propagación de *L. lecanii*. El cultivo sumergido se llevo a cabo en matraces de 250 mL con 75 mL de medio de cultivo líquido, los cuales contenían: 35 g de harina de soya, 10 g de sacarosa y 10 g de quitina cruda de camarón por litro, los matraces fueron inoculados con una concentración de 1×10^7 conidios/mL e incubados a 25° C por tres días en agitación a 120 rpm.

3.3.2. Cultivo en medio sólido

El hongo creció en fermentación sólida usando las siguientes condiciones: arroz precocido mezclado con quitina de camarón parcialmente desproteinizada al 0.5% como sustrato y 1×10^7 conidios/g de sustrato húmedo. La quitina de camarón fue obtenida de acuerdo al procedimiento de Cira *et al.* (2002) la cual contenía 14 % de proteína y 8 % de cenizas residuales (en base a peso seco). Bolsas de polipapel y matraces de 250 mL fueron empacados con 100 g y 25 g respectivamente de la mezcla arroz precocido con quitina de camarón al 0.5 % (AQ). Se agregaron por cada 100 g de sustrato empacado en bolsas de polipapel los siguientes volúmenes de agua 0, 30, 50, 70, 90 y 100 mL, y en matraces se utilizaron 0 y 7.5 mL por cada 25 g de sustrato. Los matraces y las bolsas de polipapel se cerraron y se esterilizaron en una autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se dejaron reposar por 24 horas, posteriormente se inocularon con una jeringa de uso veterinario. Se homogenizó la mezcla arroz-quitina de camarón con el inóculo y se incubaron a 25 °C por 10 días. La actividad de agua (a_w) de cada uno de los tratamientos en bolsas de polipapel fueron 0.986, 0.987, 0.988, 0.989 y 0.993, y en matraces fue de 0.990 y 0.992 respectivamente. Se colectaron 100 g de muestra por bolsa y 25 g por matraz mezclándose en agitación con 200 mL y 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos de potasio (50 mM a pH 7) durante 15 minutos hasta homogenizar completamente la suspensión. De las suspensiones se tomaron muestras de 10 mL para determinar la concentración de conidios/g de sustrato con una cámara de Neubauer. La suspensión restante fue centrifugada a 12 000g a 4° C durante 20 min. El sobrenadante fue considerado como el extracto crudo enzimático.

3.3.2.1 Medición de crecimiento y esporulación

El crecimiento de *L. lecanii* en fermentación sólida fue determinada en matraz mediante la cuantificación del contenido de proteína en el sobrenadante (extracto enzimático) y en el precipitado mediante el procedimiento calorimétrico de Lowry modificado por Peterson (1977).

Se tomaron 0.2 g del precipitado obtenido de la centrifugación de la suspensión del cultivo, y se mezclaron con ácido fosfórico al 0.15 M calentándose en baño maría por 7 minutos. El total de la proteína extraída del precipitado y del extracto enzimático fue considerada como la biomasa. Los valores fueron reportados como gramo de proteína extraída por gramo de sustrato inicial seco.

Por otra parte, la esporulación de *L. lecanii* en medio sólido fue determinada mediante el conteo de esporas en cámara de Neubauer. Por cada bolsa y matraz se determino el número de esporas por mililitro.

3.3.3 Actividad Enzimática

3.3.3.1 N-acetil-hexosaminidasas

La presencia de actividad de N-acetil-hexosaminidasa fue determinada en los extractos de la fermentación en medio sólido usando p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) como sustrato. A 200 μ L del extracto enzimático se le adicionaron 200 μ L de amortiguador de citratos fosfatos (0.2 M pH 5.6). La solución fue mezclada con 200 μ L de una solución de 1.0 mg/ml de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (pNAG), y se incubó a 37°C durante una hora con agitación (180 rpm). La reacción se paró agregando 1 mL de NaOH 0.02 M. La muestra se midió en un lector de ELISA (Elx 808IU, Biotek Instrument, INC) a 401 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones específicas (Tronsmo y Harman, 1993).

3.3.3.2. Endoquitinasas

La actividad de endoquitinasas fue medida por la reducción de la turbidez de una solución de quitina coloidal al 1 % (p/v) con amortiguador de fosfatos (50 mM) y azida de sodio (0.01 M) a pH 6.7. Una mezcla de 500 μ L del extracto crudo enzimático y 500

μL de la solución coloidal de quitina se incubó a 30°C por 24 horas con agitación (180 rpm). Posteriormente la mezcla fue diluida con 5 mL de agua y se determinó la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra). Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión coloidal de quitina en un 5 % (Tronsmo y Harman, 1993).

3.3.3.3. Proteasas

La actividad proteolítica se determinó con la medición del aumento de la absorbancia de una solución de caseína al 1% con amortiguador de fosfatos potasio (50 mM) a pH 7. Del extracto enzimático se tomaron 75 μL que se mezclaron con 500 μL de la solución de caseína, se incubó a 30°C por una hora. Posteriormente se adicionaron 2 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 5 %, se centrifugó a 12 000 rpm durante 7 minutos y al sobrenadante se le midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que aumenta 0.001 unidades de absorbancia/minuto la solución anterior con respecto a su testigo correspondiente (Kunitz, 1947).

3.3.4. Análisis Estadístico

En cada tratamiento se tuvieron tres repeticiones. La unidad experimental fue una bolsa o un matraz. Las variables de respuesta fueron el número de conidios, enzimas y proteína (determinada únicamente en matraz), las cuales se hicieron por triplicado. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza con el procedimiento PROC GLM (SAS, 1999). La fuente de variación fue: contenido de agua en el sustrato. Las medias de los tratamientos fueron separadas mediante la comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

3.4. Resultados

La esporulación en la mezcla arroz precocido con quitina de camarón como sustrato vario significativamente entre las diferentes condiciones de humedad ($F_{5, 8} = 5.45$; $P < 0.01$). Destacando la condición de 100 mL de agua por cada 100 g de sustrato (Cuadro 3.1).

Las N-acetil-hexosaminidasas producidas en la mezcla arroz con quitina de camarón al 0.5 % vario significativamente en las diferentes condiciones de humedad ($F_{5, 33} = 5.26$; $P < 0.0012$). En la condición de 100 mL por cada 100 g de sustrato fue donde se produjo la mayor cantidad de esta enzima (Cuadro 3.1).

La producción de endoquitinasas vario significativamente en las diferentes condiciones de humedad ($F_{5, 33} = 3.62$; $P < 0.01$). En la condición de 50 mL de agua por cada 100 g de sustrato fue donde se produjo la mayor cantidad (Cuadro 3.1).

Las proteasas producidas en las diferentes condiciones de humedad vario significativamente ($F_{5, 33} = 7.54$; $P < 0.0001$). La condición donde se obtuvieron la mayor cantidad de proteasas fue donde no se le agregó humedad adicional al sustrato (Cuadro 3.1).

En matraz la producción de esporas fue similar al agregar 0 y 7.5 mL de agua destilada a 25 g de mezcla arroz-quitina de camarón, la biomasa fue mayor en el tratamiento donde se le agregó 7.5 mL de agua a 25 g de sustrato, equivalente al tratamiento de 30 mL por cada 100 g de sustrato en bolsa de polipapel. Las N-acetil-hexosaminidasas aumentaron a medida que aumentó la biomasa, de igual manera se observó con las proteasas. Las endoquitinasas se produjeron por igual en las dos condiciones (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.1 Producción en medio sólido de enzimas y conidios de *Lecanicillium lecanii* en bolsas de polipapel utilizando diferentes proporciones de agua en el sustrato arroz-quitina (AQ).

Tratamiento	B-N-Hexosaminidasas mU/g±ES	Endoquitinasas U/g±ES	Proteasas U/g±ES	Esporulación x 10 ⁸ conidios/g ±ES
AQ/0	170.96±45.32 b	3.97±1.27 ab	4.93±0.56 a	4.38±0.445 ab
AQ/30	301.76±37.00 b	0.84±1.04 ab	1.04±0.46 b	3.80±0.363 b
AQ/50	273.70±37.00 b	7.00±1.04 a	0.74±0.46 b	5.78±0.363 ab
AQ/70	310.64±45.32 b	0.33±1.27 b	0.81±0.56 b	2.52±0.445 b
AQ/90	258.47±45.32 b	2.77±1.27 ab	0.94±0.56 b	5.24±0.445 ab
AQ/100	411.70±64.09 a	3.28±1.79 ab	1.48±0.79 b	7.02±0.629 a

¹Promedio ± error estándar

Media con la misma letra no hay diferencias significativas Tukey (P≤0.05).

Cuadro 3.2. Producción en medio sólido de enzimas y conidios de *Lecanicillium lecanii* en matraces de 250 mL utilizando dos proporciones de agua en el sustrato arroz-quitina (AQ).

Tratamiento	Proteína µg/g±ES ¹	B-N-Hexosaminidasas mU/g±ES	Endoquitinasas U/g±ES	Proteasas U/g±ES	Esporulación x 10 ⁸ conidios/g ±ES
AQ/0	350.52±126.76	272.9411±26.42	4.85±0.744	1.64±0.395	4.04±0.753
AQ/30	969.36±126.76	464.0211±26.42	4.34±0.744	2.31±0.395	3.27±0.753

¹Promedio ± error estándar

Media con la misma letra no hay diferencias significativa Tukey (P≤0.05).

3.5. Discusión

El tipo de sustrato, la humedad del sustrato y la actividad de agua (aw) son las principales condiciones que influyen tanto en la esporulación como en la producción de enzimas de *L. lecanii* en medio sólido (Grajek, 1994; Deshpande, 1999; Matsumoto *et*

al., 2004; Wenzel *et al.*, 2006). La esporulación de *L. lecanii* utilizando la mezcla de arroz precocido con quitina de camarón al 0.5 % se vio afectada por la cantidad de agua y a la actividad de agua (a_w), por otra parte, tanto la bolsa como en matraz son sistemas diferentes que afectan la producción de conidios. En bolsa la producción máxima fue de 7×10^8 conidios/ g de sustrato en el tratamiento AQ/100 y en matraz de 4.04×10^8 conidios/g de sustrato en el tratamiento AQ/0. El utilizar granos de arroz con quitina de camarón afectó el rendimiento de esporas. Cuando se utiliza la quitina como única fuente de carbohidratos, el aislamiento de *L. lecanii* (ATCC26854) presentó rendimientos mayores que los obtenidos en la presente investigación, 8×10^9 conidios/ g de sustrato a los 6 días de incubación (Barranco *et al.*, 2003).

Matsumoto *et al.*, (2004) reportan que la adición de quitina y la humedad del sustrato influyen positivamente en la producción de N-acetilhexosaminidasas. A mayor humedad encontraron un alto rendimiento de enzimas. Los datos de rendimiento de N-acetilhexosaminidasas del presente trabajo variaron, pero, al adicionar 100 mL por cada 100 g de sustrato se produjo una mayor cantidad de N-acetil-hexosaminidasas coincidiendo con lo reportado por otros autores sobre la producción de quitinasas. En el caso del experimento en matraz a medida que aumentaba la cantidad de agua agregada al sustrato la biomasa se incrementó al igual que las exoquitinasas. La mejor producción de las endoquitinasas en bolsas de polipapel se observó al agregar 50 mL de agua a 100 g de sustrato; en matraz no hubo diferencias. Los rendimientos de proteasas en bolsas de polipapel fueron más altos en las condiciones donde no se agregó agua, mientras que en matraz los rendimientos aumentaron a medida que se incrementaba la cantidad de agua en el sustrato.

Los rendimientos de las enzimas encontrados en el presente estudio fueron bajos comparados con los resultados reportados por Matsumoto *et al.* (2004) y Barranco *et al.* (2002). Los sistemas de fermentación utilizados por estos autores difieren con el descrito en este trabajo ya que utilizaron columnas de fermentación que fueron aireadas y quitina como única fuente de carbono. En el presente estudio se utilizó, el arroz mezclado con la quitina al 0.5%, el arroz contiene una gran cantidad de

carbohidratos que reprimen la producción de quitinasas. Es decir, a pesar de que la quitina es un inductor de las quitinasas cuando se mezcla con carbohidratos, i.e. glucosa, hay represión catabólica (St. Leger *et al.*, 1986 b). A pesar de que el arroz es usado en forma generalizada en la producción masiva de hongos entomopatógenos por los altos rendimientos de esporas aéreas obtenidas (Mendoca, 1992; Dorta *et al.* 1996), tiene la desventaja de que tiende a compactarse en el transcurso de la fermentación sólida ocasionando baja aireación y en consecuencia baja esporulación y menor producción de enzimas extracelulares.

3.6 Conclusión

La cantidad de agua agregada al sustrato arroz-quitina de camarón influyo sobre los rendimientos de las N-acetil-hexosaminidasas y la esporulación principalmente, con respecto a las endoquitinasas y proteasas influyo muy poco la cantidad de agua. En general a medida que aumentaba la cantidad de agua aumentaban los rendimientos de conidios y de algunas enzimas así como la biomasa.

3.7 Literatura Citada

- Barranco, F. J.E., Alatorre, R.R., Gutiérrez, R.G., González, V. and Saucedo, C.G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:910-915.
- Barranco, F.E., Alatorre, R.R. y Saucedo, C.G. 2003. Caracterización parcial de las enzimas degradadoras de *Verticillium lecanii* en un sistema de fermentación sólida. En: Vázquez et al. (ed) 2003. Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Guadalajara Jalisco, México. pp. 344-346
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. and Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37:1359-1366.
- Deshpande, M.V. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology* 25(3):229-243.

- Dorta, B., Ertola, R.J. and Arcas, J. 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 19:434-439.
- Feng, K.C., Liu, B.L. and Tzeng, Y.M. 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid state fermentations. *Bioprocess Engineering* 23:25-29.
- Grajek, W. 1994. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in Solid-State Cultures. *Folia Microbiologica* 39(1): 29-32.
- Hall, R.A. 1976. *Verticillium lecanii* on the Aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28(3):389-391.
- Hall, R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges, H.D. (Ed.), *Microbial control of pest and plant diseases*. Academic Press, New York, pp. 483-498.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. 11. General properties. *Journal of General Physiology* 30:291-310.
- Matsumoto, Y., Saucedo, C.G., Revah, S. and Shirai, K. 2004. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry* 39:665-671.
- Mendoca, A.F. 1992. Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brazil. In: Lomer, C.J. and Prior, C. (Eds.) 1992. *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CAB International, UK. 394pp.
- Nahar, P., Ghormade, V. and Deshpande, M. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 85:80-88.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77(1):149-162.
- Patil, R.S., Ghormade, V. y Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 473-483.

- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83:346-356.
- Samsinakova, A., Misikova, S. and Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 18:322-330.
- SAS (SAS Institute Inc.) 1999. User's Guide. Statistics Version 8. Sixth edition. SAS Inc. Cary, North. Carolina. USA. 956 p.
- Smith, R.J. and Grula 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37:222-230.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. 1986a. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Synthesis in Culture on Cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 85-95.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. 1986b. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*. 132: 1509-1517.
- Tronsmo, A. and Harman, G.E. 1993. Detection and quantification of N-Acetyl-Glucosaminidase, Chitobiosidase and endochitinase in solutions and gels. *Analytical Biochemistry* 208:74-79.
- Wenzel, I.M., Monteiro, A.C. and Pereira, G.T. 2006. Conidial production of *Lecanicillium lecanii* on solid and liquid media obtained from grains. *Cientifica Jaboticabal* 34(1): 7-14.
- Zhang, Y., Jin, K., Luo, Z., Jiang, X. and Pei, Y. 2006. Synergistic effect of fermented solution produced by transgenic *Beuveria bassiana* increasing the insecticidal efficacy of wild-type strain results from subtilisin-like activity. *Acta Phytophylacica Sinica*. 33(3):246-250.

CAPÍTULO IV

PRODUCCIÓN DE CONIDIA Y ENZIMAS EXTRACELULARES DE *Lecanicillium lecanii* EN ARROZ-QUITINA DE CAMARÓN EN MEDIO SÓLIDO Y EFECTO SOBRE EI PULGÓN CENIZO DE LA COL

4.1 Resumen

El objetivo del presente estudio fue utilizar arroz mezclado con quitina cruda de camarón como sustrato e inductor de quitinasas y proteasas de *Lecanicillium lecanii* en fermentación en medio sólido, y evaluar el efecto de conidios y enzimas producidas sobre el pulgón cenizo de la col. Las proteasas, endoquitinasas y β -N-acetilhexosaminidasas fueron producidas en medio sólido utilizando como inóculo conidias, 9.79 U/g ss, 3.96 U/g ss y 0.795 U/g ss respectivamente. Por otra parte, la máxima esporulación utilizando este sustrato fue de 5.4×10^8 conidios/g ss. La virulencia de los conidios obtenidos de cultivos en arroz (A), arroz-quitina al 0.5% (AQ) y agar-dextrosa-sabouraud (ADS) más el extracto enzimático obtenido del cultivo AQ fue evaluado sobre adultos de *B. brassicae* aplicando una suspensión de conidios mezclados con el extracto enzimático a una concentración de 1×10^7 conidios/mL. El TL₅₀ para los tratamientos A, AQ y ADS fueron de 66.87, 95.29 y 74.70 horas respectivamente. La quitina de camarón es un inductor de enzimas extracelulares como proteasas y quitinasas, pero, al combinarla con arroz existe una represión catabólica debido al alto contenido de carbohidratos que tiene el arroz. A pesar de esta desventaja en el sustrato arroz-quitina de camarón al 0.5 % se produjeron proteasas, endoquitinasas, β -N-acetilhexosaminidasas y conidios, los cuales pueden coadyuvar en la patogenicidad de *L. lecanii*.

Palabras clave: arroz, *Brevicoryne brassicae*, control biológico, *Lecanicillium lecanii*, quitina de camarón, quitinasas, proteasas

4.2 Introducción

El hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* ha sido estudiado como alternativa para el control de áfidos (Hall, 1981) y en particular del pulgón cenizo de la col, *B. brassicae* en brócoli (Pfrommer, 1992; Palande y Pokharkar, 2005), dada su estrecha asociación y potencial como controlador biológico.

La aplicación comercial de *L. lecanii* como agente de control biológico requiere de la producción de grandes cantidades de conidios; en campo, por lo general se utilizan concentraciones altas para un buen control (Bartlett y Jaronski, 1988). El método más común para la producción masiva de micoinsecticidas es la fermentación sólida en granos de arroz como sustrato, debido a los altos rendimientos que se obtienen (Mendoca, 1992; Dorta *et al.*, 1996).

Las formulaciones de micoinsecticidas contienen conidias, unidades infectivas que al caer sobre la cutícula de los insectos, germinan, penetran e invaden el hemocele y ocasionan la muerte de los áfidos entre 4-6 días después de aplicado el inóculo (Hall, 1976). Para acelerar el proceso de infección de los hongos entomopatógenos, se ha propuesto utilizar a las enzimas degradadoras de la cutícula (EDC) asperjándolas sobre la cutícula de los insectos, ya sea en forma independiente o en combinación con los conidios (Samsinakova *et al.*, 1971; Deshpande, 1999; Patil *et al.*, 2000; Nahar *et al.*, 2004). Zhang *et al.* (2006) mencionan que al combinar conidios con las EDC como las proteasas (Pr1) la cantidad de inóculo se reduce al igual que el tiempo de mortalidad del insecto.

De igual manera que los conidios, las EDC se producen en medio sólido y líquido. La producción de EDC se incrementa cuando los hongos entomopatógenos crecen sobre quitina como única fuente de carbono (St. Leger *et al.*, 1986a; Barranco *et al.*, 2002). En fermentación en medio sólido se encuentran los mayores rendimientos de enzimas comparado con la fermentación en medio líquido (Matsumoto *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se caracterizó en fermentación en medio sólido el crecimiento y producción de enzimas extracelulares de *L. lecanii* utilizando una mezcla de arroz-quitina de camarón como sustrato. Además, se evaluó de manera preliminar el efecto de la combinación del extracto enzimático con conidios obtenidos de la fermentación sólida del hongo *L. lecanii* sobre el pulgón *Brevicoryne brassicae*.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.

4.3.1.1. Inóculo

L. lecanii ATCC 26854 (American Type Culture Collection, USA) fue desarrollado en agar-harina de soya-sacarosa-quitina (15g: 35g: 10g: 10g/L) a 25 °C por 10 días. Los conidios se cosecharon de la superficie de las placas de cultivo usando una solución de Tween 80 al 0.1%. La suspensión resultante se ajustó a 1×10^7 conidios/mL.

Se utilizó un método bifásico para la propagación de *L. lecanii*. El cultivo sumergido se llevó a cabo en matraces de 250 mL con 75 mL de medio de cultivo líquido, los cuales contenían: 35 g de harina de soya, 10 g de sacarosa y 10 g de quitina cruda de camarón por litro, éstos fueron inoculados con una concentración de 1×10^7 conidios/mL e incubados a 25° C por tres días en agitación a 120 rpm.

4.3.2. Cultivo en medio sólido

El inóculo obtenido en medio líquido se incrementó en fermentación sólida usando las siguientes condiciones: arroz precocido mezclado con quitina de camarón parcialmente desproteínizada al 0.5% como sustrato y 1×10^7 conidios/g de sustrato húmedo. La quitina de camarón fue obtenida de acuerdo al procedimiento de Cira *et al.* (2002) la cual contenía 14 % de proteína y 8 % de cenizas residuales (en base a peso seco). En matraces de 250 mL fueron empacados 25 g de la mezcla arroz precocido

con quitina de camarón al 0.5%. Los matraces se cerraron con un tapón de algodón y se esterilizaron en una autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se dejaron reposar por 24 horas, posteriormente se inocularon con una jeringa de uso veterinario. Se homogenizo la mezcla arroz-quitina de camarón con el inóculo y se incubaron a 25 °C por 15 días. El contenido de humedad inicial fue de 38 % con una actividad de agua (a_w) de 0.99. Se colectaron 25 g de muestra por cada matraz mezclándose en agitación con 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM a pH 7) durante 15 minutos hasta homogenizar completamente la suspensión. De la suspensión se tomaron muestras de 10 mL para determinar la concentración de conidios/g de sustrato con una cámara de Neubauer. Los 40 mL restantes de la suspensión fueron centrifugados a 12 000g a 4° C durante 20 min. El sobrenadante fue considerado como el extracto crudo enzimático.

4.3.2.1 Determinación de la biomasa

La biomasa de *L. lecanii* en fermentación sólida fue determinada mediante la cuantificación del contenido de proteína en el sobrenadante (extracto enzimático) y en los precipitados mediante el procedimiento calorimétrico de Lowry modificado por Peterson (1977).

Se tomaron 0.2 g del precipitado obtenido de la centrifugación de la suspensión del cultivo, y se mezclaron con ácido fosfórico al 0.15 M calentándose en baño maría por 7 minutos. El total de la proteína extraída del precipitado y del extracto enzimático fue considerada como la biomasa. Los valores fueron reportados como gramo de proteína extraída por gramo de sustrato inicial seco, con estos datos se estimo la tasa específica de crecimiento mediante el ajuste de los datos de biomasa a la ecuación Logística:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left[\left(\frac{X_{\max}}{X_0} \right) - 1 \right] e^{u_{\max} t}} \quad (1)$$

Donde X fue la biomasa determinada mediante la cuantificación del contenido de proteína en el sobrenadante del extracto enzimático y los precipitados en un tiempo

dado (t); X_0 fue la biomasa inicial, X_{max} fue la biomasa máxima y μ_{max} fue la tasa específica de crecimiento. Los valores de X_0 , X_{max} y μ_{max} fueron estimados usando una estimación no lineal (PROC NLIN) (SAS, 1999).

4.3.2.2. Esporulación

La esporulación de *L. lecanii* en medio sólido fue determinada mediante el conteo de esporas en cámara de Neubauer como se describió anteriormente. El programa estadístico SAS 9.1 (SAS Institute Inc., USA) fue usado para estimar la tasa específica de esporulación mediante el ajuste de los datos de los promedios de los conteos a la ecuación de Richards (2):

$$y = \frac{X_{max}}{[1 + e^{(X_0 - \mu t)}]^{(1/X_1)}} \quad (2)$$

Donde, y fue el número de conidios por gramo de sustrato en cada tiempo (t); X_0 fue el tiempo inicial de esporulación, X_{max} fue la máxima esporulación ($t \rightarrow \infty$) y μ fue la tasa específica de esporulación. Los valores X_0 , X_{max} y μ fueron estimados usando una estimación no lineal por medio del procedimiento PROC NLIN (SAS Institute Inc., USA).

4.3.3. Actividad Enzimática

4.3.3.1 N-acetil-hexosaminidasas

La presencia de actividad de N-acetil-hexosaminidasa fue determinada en los extractos de la fermentación en medio sólido usando p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) como sustrato. A 200 μ L del extracto enzimático se le adicionaron 200 μ L de amortiguador de citratos fosfatos (0.2 M pH 5.6). La solución fue mezclada con 200 μ L de una solución de 1.0 mg/mL de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (pNAG), y se incubó a 37°C durante una hora con agitación (180 rpm). La reacción se paró agregando 1 mL de NaOH 0.02 M. La muestra se midió en un lector de ELISA (Elx 808IU, Biotek Instrument, INC) a 401 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera

1 μ mol de p-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones especificadas (Tronsmo y Harman, 1993).

4.3.3.2. Endoquitinasas

La actividad de endoquitinasas fue medida por la reducción de la turbidez de una solución de quitina coloidal al 1 % (p/v) con amortiguador de fosfatos (50 mM) y azida de sodio (0.01 M) a pH 6.7. Una mezcla de 500 μ L del extracto crudo enzimático y 500 μ L de la solución coloidal de quitina se incubó a 30° C por 24 horas con agitación (180 rpm). Posteriormente la mezcla fue diluida con 5 mL de agua y se determino la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra). Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión coloidal de quitina en un 5 % (Tronsmo y Harman, 1993).

4.3.3.3. Proteasas

La actividad proteolítica se determino con la medición del aumento de la absorbancia de una solución de caseína al 1% con amortiguador de fosfatos (50 mM) a pH 7. Del extracto enzimático se tomaron 75 μ L que se mezclaron con 500 μ L de la solución de caseína, se incubó a 30° C por una hora. Posteriormente se adicionaron 2 mL de ácido tricloroacetico (ATC) al 5 %, se centrifugo a 12 000 rpm durante 7 minutos y al sobrenadante se le midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que aumenta 0.001 unidades de absorbancia/minuto la solución anterior con respecto a su testigo correspondiente (Kunitz, 1947).

4.3.4. Bioensayo

El inóculo empleado en el bioensayo se propago en fermentación sólida en arroz precocido y arroz precocido mezclado con quitina de camarón parcialmente

desproteínizada al 0.5% como sustrato y 1×10^7 conidios/g de sustrato húmedo y en placas de agar dextrosa sabouraud (ADS) como inóculo de referencia. En matraces de 250 mL fueron empacados 25 g de arroz precocido y la mezcla arroz precocido con quitina de camarón al 0.5%. Los matraces se cerraron con un tapón de algodón y se esterilizaron en una autoclave por 15 minutos a 121°C . Se dejaron reposar por 24 horas, posteriormente se inocularon con una jeringa de uso veterinario. Se homogenizó la mezcla arroz-quitina de camarón con el inóculo y se incubaron a 25°C por 15 días. El crecimiento en los cultivos de ADS fue por 10 días. El contenido de humedad inicial fue de 38 % para los dos sustratos y la actividad de agua (a_w) de 0.992 para el arroz precocido y la mezcla arroz-quitina de 0.990. Se colectaron 25 g de muestra por cada matraz mezclándose en agitación con 50 mL de una solución de Tween 80 al 0.01% durante 15 minutos hasta homogenizar completamente la suspensión. La suspensión fue centrifugada a $12\ 000\ g$ a 4°C durante 20 min. El sobrenadante fue considerado como el extracto crudo enzimático. Los conidios fueron cosechados de cultivos en medio sólido y en ADS agregando Tween 80 al 0.01%. Las suspensiones para la aspersión sobre los áfidos se prepararon utilizando 5 mL del extracto crudo enzimático de los cultivos en arroz precocido (A) y la mezcla arroz precocido con quitina de camarón (AQ) más los conidios de ambos cultivos. La suspensión de los conidios de los cultivos en ADS se preparó mezclándolas con 5 mL de Tween 80 al 0.01%. Las suspensiones se ajustaron a una concentración de 1×10^7 conidios/mL.

Adultos ápteros de *B. brassicae* obtenidos de una colonia establecida en condiciones controladas de laboratorio fueron transferidos a hojas pequeñas y turgentes de brócoli de 45 días de edad, el pecíolo de la hoja se cubrió con algodón humedecido y papel aluminio. Los dispositivos con los áfidos ya establecidos fueron tratados con cada uno de las suspensiones usando una torre de pulverización equipada con una boquilla de cono sólido (Cat. 1/4J-SS+SU1A-SS, Spraying Systems). Se aplicaron 5 mL por ambos lados de la hoja de la mezcla del extracto crudo enzimático con la concentración de 1×10^7 conidios/mL de cada uno de los tratamientos a 10 libras de presión y al testigo se le aplicó una solución de Tween 80 al 0.01 %.

hojas con 20 pulgones cada una fueron asperjadas con cada uno de los tratamientos. Todo el ensayo se llevo acabo una sola vez.

Después de asperjadas las hojas fueron colocadas en un vaso de plástico de 250 mL tapadas e incubadas en oscuridad a $25^{\circ} \text{C} \pm 2$ y 95 % de humedad. La mortalidad fue monitoreada diariamente por seis días. Los insectos muertos de cada vaso fueron incubados, sobre papel filtro humedecido en una caja petri sellada con parafilm, a 25°C en oscuridad por 24 horas y se examinaron para confirmar la presencia de *L. lecanii*.

4.3.5. Análisis Estadístico

Para la caracterización del crecimiento, esporulación y actividad enzimática se utilizaron para cada tratamiento dos repeticiones. La unidad experimental fue un matraz. Las variables de respuesta fueron el número de conidios, μg de proteína en el precipitado y extracto enzimático, y unidades enzimáticas de N-acetil-hexosaminidasas, endoquitinasas y proteasas por gramo de sustrato seco. Las determinaciones se hicieron por triplicado cada 24 horas durante 15 días. Se obtuvieron los promedios de los datos y el error estándar para cada una de las determinaciones en el programa SAS (SAS, 1999). El análisis regresión Logística fue usado para determinar la TL_{50} y los parámetros de mortalidad como mortalidad máxima (X_{max}), tiempo inicial de la mortalidad (X_0) y la tasa específica de mortalidad (μ) de los tratamientos aplicados sobre los áfidos (SAS, 1999). Por otra parte, se determino la respuesta relativa de los tratamientos aplicados sobre los pulgones dividiendo la TL_{50} del hongo desarrollado en un medio de cultivo estándar sobre la TL_{50} del hongo cultivado en otros medios de cultivo como el arroz y arroz con quitina de camarón.

4.4 Resultados

El hongo entomopatógeno *L. lecanii* creció en un medio que contenía una mezcla de arroz con quitina de camarón al 0.5%. Durante el crecimiento del hongo se produjeron proteasas, endoquitinasas y β -N-acetilhexosaminidasas. Las proteasas aparecieron desde las primeras 24 horas del crecimiento del hongo, aumentando progresivamente hasta alcanzar su máximo (9.79 ± 1.45 U/g de sustrato seco) a las 120 horas, posteriormente se redujo la actividad a lo largo del tiempo hasta permanecer constante (Figura 2). La disminución de la actividad de las proteasas coincidió con el aumento en la producción de β -N-acetilhexosaminidasas.

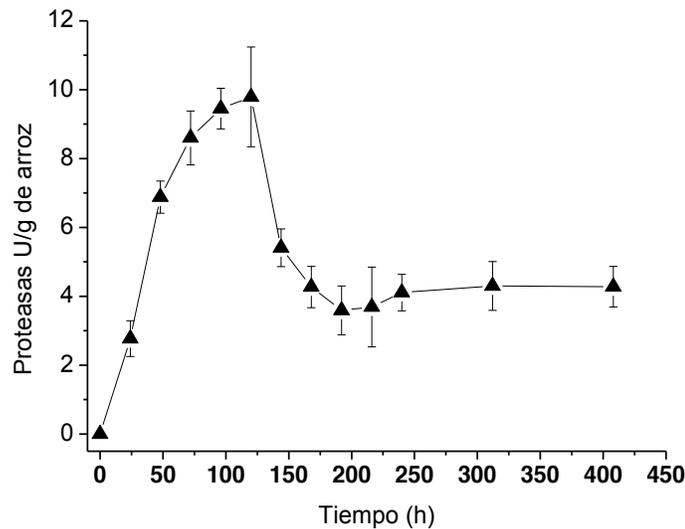


Figura 2. Producción de proteasas por *L. lecanii* ATCC26854 en medio sólido utilizando como sustrato arroz con quitina de camarón al 0.5% (\blacktriangle). Los datos son la media de seis determinaciones y las barras corresponden al error estándar.

Al igual que las proteasas, las endoquitinasas aparecieron desde las primeras 24 horas de cultivo del hongo, mostrando un aumento de los niveles de actividad hasta las 96 horas (3.96 ± 0.66 U/g de sustrato seco), posteriormente se redujo considerablemente la actividad (Figura 3).

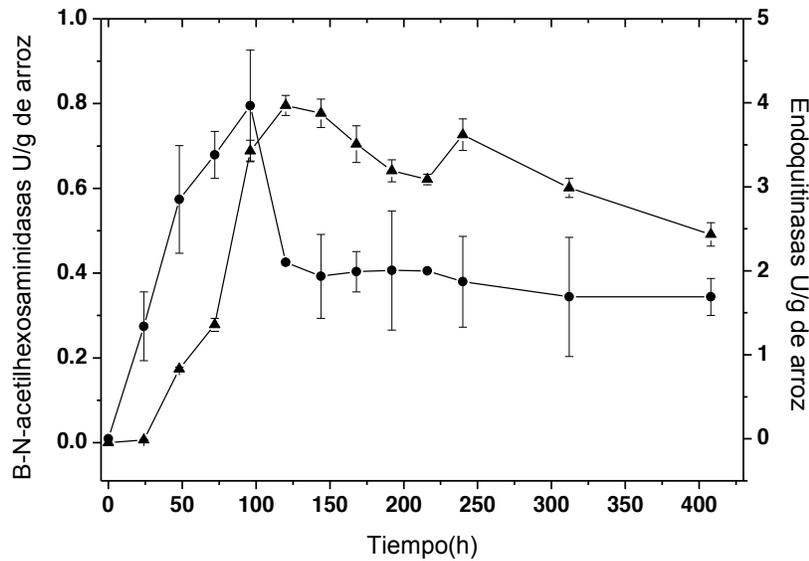


Figura 3. Producción de β -N-acetilhexosaminidasas (▲) y endoquitinasas (●) por *Lecanicillium lecanii* en medio sólido utilizando como sustrato arroz - quitina de camarón al 0.5%. Los datos son la media de seis determinaciones y la barras corresponden al error estándar.

La actividad de β -N-acetilhexosaminidasas se detecto desde las 48 horas del crecimiento del hongo, aumentando los niveles de actividad hasta las 120 horas (0.795 ± 0.033 U/g de sustrato seco), posteriormente la actividad se redujo (Figura 3).

En el sistema de cultivo de *L. lecanii* y utilizando como inóculo conidios, el hongo produjo biomasa desde las 24 horas de iniciado el cultivo, aumentando la biomasa progresivamente hasta alcanzar un máximo de 0.00121 g/g de sustrato seco según el modelo de crecimiento Logístico (Figura 4). Después de las 48 horas de crecimiento inicio la esporulación, aumentando la concentración de conidios en el transcurso del tiempo de incubación hasta llegar a la esporulación máxima de 5.4×10^8 conidios/g de sustrato seco según el ajuste del modelo de Richards (Figura 5). La producción de biomasa y la esporulación dependieron del tiempo de incubación. Por lo que, se diferenciaron tres fases de desarrollo; una fase lag que duro hasta las 48 horas, tiempo necesario para la germinación de las esporas; una fase exponencial donde se observó crecimiento vegetativo abundante desde las 48 horas e inicio de la esporulación; y la fase estacionaria que tomo alrededor de 216 horas (Figura 3 y 4).

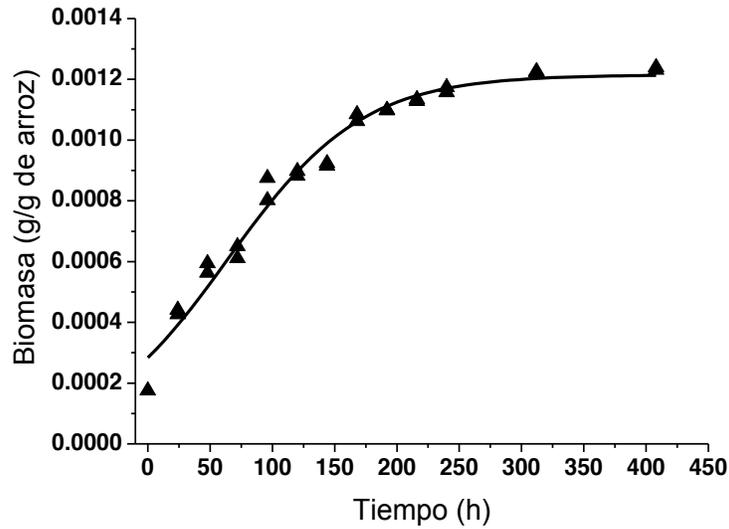


Figura 4. Producción de biomasa de *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854 en medio sólido utilizando como sustrato arroz - quitina de camarón al 0.5% (▲). Los datos experimentales son la media de tres determinaciones. La línea corresponde al ajuste de los datos al modelo de crecimiento logístico.

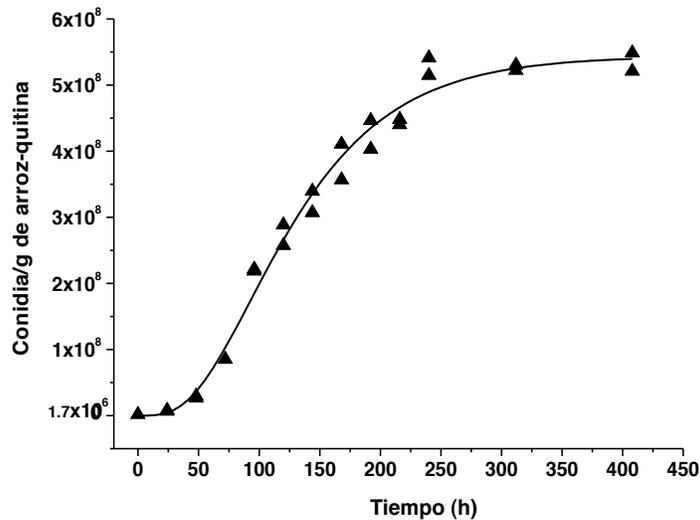


Figura 5. Esporulación de *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854 en medio sólido utilizando como sustrato arroz - quitina de camarón al 0.5% (▲). Los datos experimentales son la media de cuatro determinaciones. La línea corresponde al ajuste de los datos al modelo de Richards.

La biomasa estimada mediante la determinación de la proteína en el extracto enzimático y los precipitados obtenidos del sobrenadante, se incrementó a medida que el hongo crecía (formación de micelio) y esporulaba (Figura 4 y 5). La velocidad de crecimiento estimado por medio de la biomasa fue de 0.0186 unidades por día según el

modelo de crecimiento logístico. Además, la tasa específica de esporulación de *L. lecanii* fue de 0.411 unidades por día según el modelo de Richards. El rápido incremento de la actividad de las enzimas una vez iniciado los cultivos se debió a la velocidad de crecimiento del hongo de acuerdo con la tasa específica de crecimiento antes mencionada, de esta manera el hongo entro en un fase de producción tanto de esporas como de enzimas.

Bioensayo

La infección de los adultos ápteros de *B. brassicae* vario significativamente entre tratamientos y a través del tiempo ($P < 0.0001$) de acuerdo al ajuste de datos a la curva del modelo de regresión logística (Figura 6).

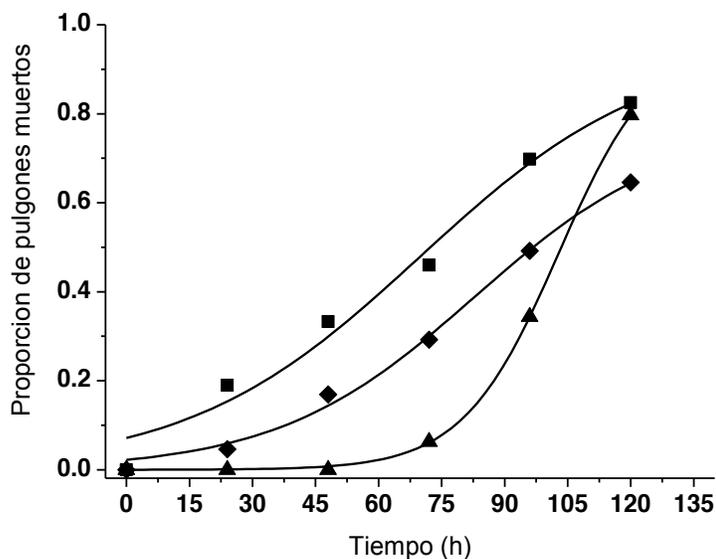


Figura 6. Proporción de afidos infectados a diferentes tiempos con el ajuste de los datos a la curva del modelo de regresión Logística: (▲) extracto enzimático obtenido de la fermentación en arroz - quitina de camarón al 0.5% y mezclado con conidios de *L. lecanii* producidas en este mismo sustrato; (■) extracto de la fermentación de arroz y mezclado con los conidios producidos en arroz; y (♦) conidios producidos en ADS mezcladas con una solución de Tween 80 al 0.01%.

En los tratamientos con conidios de arroz (A) y ADS se observó alta mortalidad de *B. brassicae* desde las primeras horas (X_0) de la aplicación (Cuadro 4.1); mientras en AQ la mortalidad se inicio a las 88 horas. A pesar de que la TL50 en los tratamientos

A y ADS presentaron valores más bajos que en AQ, en este último la tasa de mortalidad (μ) fue mayor (Cuadro 4.1). El extracto enzimático de la fermentación en arroz precocido - quitina de camarón al 0.5 % de 15 días de cultivo contenía 396.25 ± 22.47 mU de β -N-acetilhexosaminidasas / mL, 1.36 ± 0.177 U de Endoquitinasas/ mL y 3.45 U de Proteasas/mL. Por lo que el efecto del extracto sobre el insecto y los conidios se atribuye al contenido de las enzimas antes mencionadas.

Cuadro 4.1 Estimación de los parámetros de mortalidad, la TL_{50} y la respuesta relativa de la dosis aplicada (RRD) sobre los adultos ápteros de *B. brassicae* tratados con la suspensión conidios-extracto enzimático.

Tratamiento	Xmax ¹	Xo ² (HORAS)	μ^3	R ²	TL ₅₀ (HORAS)	RRD ⁴
Arroz (A)	0.9577	12	0.036	0.98	66.87	1.1170
Arroz con quitina al 0.5 % (AQ)	0.9529	88	0.087	0.99	95.29	0.7839
ADS	0.7707	63	0.042	0.99	74.70	1

¹Xmax = mortalidad máxima

²Xo = tiempo del inicio de la mortalidad

³ μ = tasa específica de mortalidad

⁴RRD = Respuesta relativa a la dosis aplicada (TL_{50} (ADS)/ TL_{50} (Tratamientos)).

Por otra parte, la respuesta relativa de la dosis aplicada utilizando conidios de A (1.11) fue alta en comparación con los conidios de ADS (1) que es el medio de cultivo de uso generalizado para la propagación de hongos entomopatógenos. Al mezclar conidios y enzimas de cultivos de AQ (0.783) la respuesta relativa de la dosis fue inferior a la de ADS, pero, comparando la tasa específica de mortalidad el tratamiento AQ supero tanto a ADS como A. Es decir mezclando el extracto enzimático con los conidios de cultivos en AQ el proceso de infección tarda en manifestarse, pero, una vez que se inicia es muy rápida la mortalidad.

4.5 Discusión

En trabajos previos, el hongo entomopatígeno *L. lecanii* ATCC 26854 fue seleccionado por presentar tanto cualitativa como cuantitativamente actividades altas de quitinasas y proteasas en fermentación líquida, fermentación sólida y cultivo superficial en agar-quitina coloidal (Matsumoto *et al.*, 2001; Barranco *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2006). Durante el crecimiento y esporulación de *L. lecanii* sobre arroz, se producen enzimas extracelulares que facilitan que algunos de los componentes del arroz sean degradados y asimilados. Sin embargo, enzimas extracelulares como las quitinasas sólo se producen donde se encuentra un inductor tal como la quitina de camarón (Matsumoto *et al.*, 2004).

Las quitinasas son enzimas constitutivas y durante el crecimiento de los hongos son detectadas en bajos niveles. La adición de quitina a los medios de cultivo induce su producción (St. Leger *et al.*, 1986a; Bidochka y Khachatourians, 1988). En el sustrato AQ se produjeron β -N-acetilhexosaminidasas a pesar de contener la mitad de la quitina reportada en la mayoría de los trabajos con quitinasas. Se considera que los bajos rendimientos en AQ se debieron a que el arroz contiene una gran cantidad de carbohidratos que reprimen la producción de quitinasas cuando se encuentra un inductor (St. Leger *et al.*, 1986b). La producción de β -N-acetilhexosaminidasas en medio sólido inicio en la fase exponencial de crecimiento de *L. lecanii*, lo que coincide con lo reportado para otros microorganismos como *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus fumigatus*, *Lecanicillium lecanii*, *Verticillium fungicola* (Nuero, 1995; Tronsmo *et al.*, 1996; Fenice *et al.*, 1998; Quijano *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2004).

Utilizando micelio y conidias de *L. lecanii* como inóculo la producción máxima de β -N-acetilhexosaminidasas se observó a las 144 horas con rendimientos de 1673 U y 1016 U/g de sustrato seco respectivamente (Matsumoto *et al.*, 2004), mientras que utilizando conidios como inóculo en arroz-quitina se observó a las 120 horas la máxima

producción de β -N-acetilhexosaminidasas con rendimientos de 0.795 ± 0.033 U/g de sustrato seco.

Se ha reportado la producción de endoquitinasas utilizando quitina de camarón cruda al 1 % como única fuente de carbono antes de las 120 horas, coincidiendo con los bajos niveles observados de β -N-acetilhexosaminidasas (St. Leger *et al.*, 1993; Shirai, 2006). Por otra parte, utilizando quitina coloidal al 1% como inductor la actividad de las endoquitinasas alcanza su máximo a las 78 horas con un rendimiento de 4.69 U/g de sustrato seco (Binod *et al.*, 2007). En la presente investigación utilizando 0.5 % de quitina de camarón cruda, las endoquitinasas se manifestaron desde las primeras horas hasta alcanzar su máxima producción a las 96 horas con rendimientos de 3.96 ± 0.66 U/g de sustrato seco.

Al utilizar quitina de camarón en fermentación sólida se determinó la producción de proteasas desde las primeras horas, hasta alcanzar a las 120 horas la mayor producción de estas enzimas (Shirai, 2006). Después de las 120 horas se observó una reducción en la producción de proteasas coincidiendo con los altos rendimientos de β -N-acetilhexosaminidasas. Bidochka y Khachatourinas (1988) encontraron una represión catabólica en la producción de proteasas al aumentar la actividad de β -N-acetilhexosaminidasas, estas enzimas liberaron en grandes cantidad las N-acetilglucosamina (NAG). Las concentraciones altas de NAG parecen tener una represión catabólica en la producción de proteasas.

En el presente estudio, en la fase lag y parte de la exponencial del crecimiento de *L. lecanii* se detectaron proteasas y endoquitinasas. En la fase exponencial se presentaron la β -N-acetilhexosaminidasas. St. Leger *et al.* (1986a) encontraron en fermentación en medio líquido la presencia de esterasas y enzimas proteolíticas (endoproteasas, aminopetidases y carboxipentidasas) en las primeras 24 horas de cultivo, seguidas por las exoquitinasas (N-acetilhexosaminidasas); las endoquitinasas y lipasas fueron producidas entre los 3-5 días de cultivo. En fermentación en medio sólido, dependiendo el sustrato y el sistema de cultivo donde se desarrolle *L. lecanii*

pueden presentarse modificaciones en la secuencia de aparición de las enzimas, por ejemplo las proteasas y endoquitinasas son las primeras en aparecer, en seguida se presentan las N-acetilhexosaminidasas (Shirai, 2006). Los resultados mostrados en esta investigación concuerdan con los obtenidos por St. Leger *et al.* (1986a) y Shirai (2006).

Durante el crecimiento de *L. lecanii* en arroz con quitina de camarón al 0.5 % se produjo biomasa desde las primeras horas del cultivo por lo que el hongo esporulo. Utilizando arroz como sustrato para el desarrollo y esporulación de *L. lecanii* se han reportado títulos de 1.5×10^9 conidios/ g de arroz precocido (Feng *et al.*, 2000) y al utilizar el 1 % de quitina de chapulín como única fuente de carbono se reportan títulos de 8×10^9 conidios/g de sustrato (Barranco *et al.*, 2003). En nuestros experimentos la concentración de conidios en la mezcla de arroz precocido - quitina de camarón al 0.5 % (AQ) fue de 5.431×10^8 conidios/g de sustrato. Grajek (1994) menciona que las diferencias en cuanto al crecimiento y esporulación en medio solidó de *L. lecanii* se debe principalmente a las características del aislamiento, a las condiciones de cultivo y a la actividad de agua (*aw*) inicial del sustrato.

La esporulación y la producción de enzimas en matraz presentaron bajos rendimientos en comparación con los sistemas de columnas empacadas con bagazo de caña y el 1 % de quitina de camarón o chapulín como fuente de carbono que reportan Matsumoto *et al.* (2004) y Barranco *et al.* (2002). Las diferencias pudieron deberse al calor metabólico generado durante el metabolismo del hongo, a la compactación del arroz lo que limitó la aireación y por último la represión catabólica (Losane *et al.*, 1985; St. Leger *et al.*, 1986b).

La presencia de enzimas en el extracto enzimático como β -N-acetilhexosaminidasas, endoquitinasas, proteasas y metabolitos secundarios coadyuvan en la degradación parcial de la superficie del integumento, en la inducción de la germinación de los conidios (Smith y Gula, 1981, Samssinakova *et al.*, 1971 y Fan *et al.*, 2007) o en la toxicidad de los metabolitos producidos durante el proceso de

fermentación (Soman *et al.*, 2001). En el presente trabajo los conidios de *L. lecanii* fueron capaces de infectar a los adultos de *B. brassicae* a pesar de poseer un integumento ceroso, que constituye una barrera para la penetración de la cutícula por los hongos entomopatógenos (Alavo *et al.* 2001). Cuando el hongo germina e inicia la penetración de la cutícula secreta proteasas, quitinasas y lipasas, a este proceso se ha documentado que las proteasas y quitinasas (endoquitinasas y exoquitinasas) tienen un efecto sinérgico en la degradación de la cutícula (St. Leger *et al.*, 1996). Al mezclar el extracto enzimático con los conidios obtenidos en el medio AQ se esperaba una reducción en el tiempo de mortalidad de los áfidos, sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos la mortalidad fue más tardía que los tratamientos con conidios producidas en arroz y ADS. De acuerdo a nuestros resultados la combinación de enzimas con los conidios producidos en AQ retardó el proceso de patogénesis, sin embargo se desconoce cual fue el mecanismo de acción, en próximos trabajos se deberá poner atención a los cambios en el integumento al aplicar el extracto enzimático así como su efecto sobre los conidios.

4.6 Conclusión

Durante el crecimiento y esporulación de *Lecanicillium lecanii* en fermentación sólida utilizando como sustrato arroz precocido con 0.5 % de quitina de camarón se produjeron proteasas y endoquitinasas desde las primeras horas de cultivo, posteriormente, se presentaron las β -N-acetilhexosaminidasas. Se encontró una represión catabólica al desarrollarse *L. lecanii* en la mezcla de arroz con quitina de camarón al 0.5 % lo que se manifestó en una baja producción de enzimas y conidios. En general, los rendimientos de las enzimas y conidios por gramo de sustrato fueron bajos comparados con otros sistemas de cultivo. Se discute el uso de las enzimas degradadoras de la cutícula de insectos y se corrobora su efecto sobre los áfidos en mezcla de conidios - extracto enzimático. Sin embargo falta medir el daño sobre la cutícula que ejerce el extracto enzimático y si tiene algún efecto sobre los conidios.

4.7 Literatura Citada

- Alavo, T.B.C., Sermann, H. and Bochow, H. 2001. Virulence of strains of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* to aphids: Strain improvement. Arch. Phytopatho. Pflanz. 34:379-398.
- Barranco, F. J.E., Alatorre, R.R., Gutiérrez, R.G., González, V. and Saucedo, C.G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enzyme and Microbial Technology. 30:910-915.
- Barranco, F.E., Alatorre, R.R. y Saucedo, C.G. 2003. Caracterización parcial de las enzimas degradadoras de *Verticillium lecanii* en un sistema de fermentación sólida. En: Vázquez et al. (ed) 2003. Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Guadalajara Jalisco, México. pp. 344-346.
- Bartlett, M.C. and Jaronski, S.T. 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: Burge, M.N. (ed.) 1988. Fungi in Biological Control Systems. Manchester University Press, Manchester UK. pp 61-85.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1988. N-Acetyl-D-Glucosamine mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology 54(11):2699-2704.
- Binod, P., Sandhya, C., Suma, P., Szakacs, G. and Pandey, A. 2007. Fungal biosynthesis of endoquitinase and chitobioase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. Bioresource Technology 98:2742-2748.
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. and Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry 37:1359-1366.
- Deshpande, M.V. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. Critical Reviews in Microbiology 25(3):229-243.
- Dorta, B., Ertola, R.J. and Arcas, J. 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. Enzyme and Microbial Technology 19:434-439.
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., Bidochka, M.J. and Pei, Y. 2007. Increased Insect Virulence in *Beauveria bassiana* strains

- overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1):295-302.
- Feng, K.C., Liu, B.L. and Tzeng, Y.M. 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid state fermentations. *Bioprocess Engineering* 23:25-29.
- Fenice, M., Selbmann, L., Di Giambattista, R. and Federici, F. 1998. Chitinolytic activity at low temperature of an Antarctic strain (A3) of *Verticillium lecanii*. *Research in Microbiology*. 149(4):289-300(12).
- Grajek, W. 1994. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. *Folia Microbiologica* 39(1):29-32.
- Hall, R.A. 1976. *Verticillium lecanii* on the Aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28(3):389-391.
- Hall, R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scales. In: Burges, H.D. (ed) *Microbial Control of Pest and Plant Disease*. Academic Press, New York. pp483-498.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. 11. General properties. *Journal of General Physiology*. 30:291-310.
- López, A.B., Alatorre, R.R., Peña, M.R. y López, C.J. 1991. Dinámica poblacional de *Brevicoryne brassicae* (Homoptera:Aphididae) en brócoli en Chapingo, México. *Agrociencia serie Protección Vegetal* 2(3):7-19.
- Losane, B.K., Ghidyal, N.P., Budiatman, S. and Ramakrishna, S.V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbiology Technology* 7:258-265.
- Matsumoto, Y., Saucedo, C.G., Revah, S. and Shirai, K. 2001. Chitinases production in solid state fermentation and submerged fermentation by *Verticillium lecanii* with silage shrimp as substrate. In: Muzzarelli, R.A.A. (ed.) 2001. *Chitin Enzymology*. Atec Edizioni, Italia. pp 381-389.
- Matsumoto, Y., Saucedo, C.G., Revah, S. and Shirai, K. 2004. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry* 39:665-671.

- Mendoca, A.F. 1992. Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brazil. In: Lomer, C.J. and Prior, C. (Eds.) 1992. Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International, UK. 394pp.
- Nahar, P., Ghormade, V. and Deshpande, M. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. Journal of Invertebrate Pathology 85:80-88.
- Nuero, O.M. 1995. Production of chitinase by *Fusarium* species. Current Microbiology. 30(5):287-289.
- Palande, P.R. and Pokharkar, D.S. 2005. Evaluation of *Verticillium lecanii* against *Brevicoryne brassicae* on cole crops. Annals of Plant Protection Science 13(1):213-214.
- Patil, R.S., Ghormade, V. y Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and Microbial Technology 26: 473-483.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. Analytical Biochemistry 83:346-356.
- Pfromner, M.K.W. 1992. Biological control of *Brevicoryne brassicae* with the parasitic fungus *Verticillium lecanii* in the laboratory and in the field. Journal of Plant Diseases and Protection 99(2):209-217.
- Quijano, G.G., Ramirez, C.L., Paniagua, N., Larralde, C.C.P. and Shirai, K. 2004. Evaluation of pH of culture on the chitinolytic and proteolytic activities of *Verticillium fungicola* using shrimp waste silage. In: Boucher, I., Jamieson, K. and Retnakaran, A. (ed.) 2004. Advances in Chitin Science. Montreal. 8:222-225.
- Ramírez, C.L., Marín, C. Ma.C., Huerta, S., Revah, S. and Shirai, K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry* 41:1106–1110.
- Roussos, S. y Perraud-Gaime, I. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. En: Galindo, E. (ed.) 1996. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. pp. 341-348.

- Samsinakova, A., Misikova, S. and Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 18:322-330.
- SAS (SAS Institute Inc.) 1999. User's Guide. Statistics Version 8. Sixth edition. SAS Inc. Cary, North. Carolina. USA. 956 p.
- Shirai, M.K. 2006. Fungal chitinases. In: Guevara-González, R. and Torres-Pacheco, I. (Eds) 2006. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Kerala: Research Signpost. P 289-304.
- Soman, A.G., Gloer, J.B., Angawi, R.F. and Dowd, P.F. 2001. Vertilecanins: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*. 64(2):189-192.
- Smith, R.J. and Gula, E.A. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37:222-230.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. 1986a. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Synthesis in Culture on Cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 85-95.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. 1986b. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*. 132: 1509-1517.
- St. Leger, R.J., Staples, R. C., and Roberts, W.D. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:81-84.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, J.M., Rizzo, W.N. and Roberts, W.D. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 62(39): 907-912.

- Tronsmo, A. and Harman, G.E. 1993. Detection and quantification of N-Acetyl-Glucosaminidase, Chitobiosidase and endochitinase in solutions and gels. *Analytical Biochemistry* 208:74-79.
- Tronsmo, A., Hjeljord, L., Klemsdal, S.S., Varum, K.M., Nordtveit, H.R., and Harman, G.E. 1996. Chitinolytic enzymes from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. In: Muzzarelli R.A.A. (ed) 1996. *Chitin Enzymology*. Atec Edizioni, Italia. 2:234-244.
- Zhang, Y., Jin, K., Luo, Z., Jiang, X. and Pei, Y. 2006. Synergistic effect of fermented solution produced by transgenic *Beuveria bassiana* increasing the insecticidal efficacy of wild-type strain results from subtilisin-like activity. *Acta Phytophylacica Sinica*. 33(3):246-250.

5. CONCLUSION GENERAL

En el presente trabajo se estudió la producción de quitinasas y proteasas por *L. lecanii* en fermentación en estado sólido utilizando como sustrato e inductor una mezcla de arroz con quitina de camarón al 0.5% y el efecto de estas enzimas sobre el pulgón cenizo de la col. Los estudios realizados se dividieron en tres partes: primero se caracterizaron cinco aislamientos para entender la interacción afido-hongo, luego se seleccionó a la cepa de *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854 por presentar altos porcentajes de infección de los afidos, además, existen antecedentes de que este hongo produce enzimas tanto en medio sólido como en medio líquido. Posteriormente se evaluó el efecto de la humedad del sustrato sobre la producción de las proteasas, quitinasas y conidios en bolsas de polipapel y matraces de 250 mL y por último se caracterizó la cinética de producción de enzimas y conidios en matraces de 250 mL, los conidios y las enzimas obtenidas en sustrato sólido se evaluaron sobre *Brevicoryne brassicae*. Los resultados obtenidos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

La caracterización fisiológica y morfológica de cinco aislamientos de *L. lecanii* permitió entender la virulencia sobre el pulgón cenizo de la col. El tamaño del conidio, la biomasa máxima alcanzada y la tasa específica de crecimiento en placa tienen una alta correlación con el índice de infectividad. El tamaño del conidio fue relevante también en la cantidad de inóculo requerido para infectar a *Brevicoryne brassicae*. Conidios cortos requirieron más inóculo, mientras que conidios largos requirieron menos inóculo para infectar a los insectos.

A medida que se adicionaba agua al sustrato arroz-quitina de camarón al 0.5 % en bolsas de polipapel y matraz de 250 mL las actividades enzimáticas de proteasas, endoquitinasas, N-acetil-hexosaminidasas y la concentración de conidios aumentaban. Por consiguiente la biomasa también se incrementó con la adición de agua al sustrato. Pero, en bolsas de polipapel entre mayor cantidad de agua se agregaba al sustrato, mayor era la probabilidad de contaminación por bacterias.

Utilizando como sustrato e inductor arroz precocido mezclado con quitina cruda de camarón y empleando como inóculo conidios se produjeron actividades altas de proteasas a las 120 horas de cultivo, las endoquitinasas a las 96 horas y β -N-acetilhexosaminidasas a las 120 horas con rendimientos de 9.79 U/g ss, 3.96 U/g ss y 0.795 U/g ss respectivamente. Además, la producción máxima de conidios fue 5.4×10^8 conidios/g ss. Al aplicar el extracto enzimático y los conidios de *L. lecanii* cultivado en el sustrato arroz-quitina de camarón sobre *Brevicoryne brassicae* la TL₅₀ (95.29 horas) fue mayor en comparación con los conidios cultivados en arroz y ADS.

De manera general, la utilización del sustrato arroz-quitina de camarón funcionó como inductor en la producción de proteasas, quitinasas y esporas de la cepa *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854, pero, los rendimientos de las enzimas fueron bajos en comparación con otros sistemas de producción de quitinasas, debido probablemente a la represión catabólica ocasionada por la alta concentración de carbohidratos presentes en el grano de arroz.

6. RECOMENDACIONES

En este trabajo se estudió la productividad de proteasas, quitinasas y conidios utilizando el sustrato arroz precocido-quitina de camarón al 0.5 % por *L. lecanii* ATCC 26854. El sistema utilizado tuvo muchos problemas principalmente con respecto a la oxigenación debido a la compactación del arroz y una represión catabólica por la presencia de concentraciones altas de carbohidratos. Sería conveniente evaluar un soporte como el bagazo de caña, más arroz con quitina de camarón al 1 % y determinar si la actividad enzimática aumenta, además, de demostrar si existe una represión catabólica al utilizar arroz y quitina de camarón.

Por otro lado, es recomendable retomar los trabajos de Barranco *et al.* (2001) Matsumoto *et al.* (2004) y evaluar las enzimas producidas en ese sistema sobre áfidos. Además, caracterizar las enzimas producidas en esos sistemas para saber sus propiedades biológicas y químicas para su posterior uso en la formulación de micoinsecticidas.

La evaluación del efecto de las enzimas sobre la cutícula de los áfidos debe corroborarse por ensayos *in vitro*, colocando el pulgón en el extracto enzimático y observar si hay algún cambio en la estructura del integumento. Una vez detallado el efecto sobre la cutícula del insecto se sugiere hacer bioensayos para determinar si hay algún sinergismo entre aplicar conidios con el extracto enzimático o el extracto enzimático sólo. Por otro lado, es conveniente investigar el efecto que tiene el extracto crudo enzimático sobre la adherencia y viabilidad de los conidios.