

T
1177

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124197

124197

UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa abierta al tiempo

**Estudio de la producción de enzimas, virulencia y diferenciación
fúngica en la interacción del hongo entomopatógeno
Paecilomyces fumosoroseus/mosquita blanca**

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

M. en C. Maria Judith Castellanos Moguel

Co-Directoras:

Dra. Teresa Mier González
Dra. Concepción Toriello Nájera

Asesora:

Dra. Marfa del Rocío Reyes Montes

México D.F.
Marzo, 2006

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó



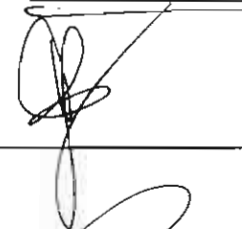
M. en C. María Judith Castellanos Moguel

MIEMBROS DEL JURADO

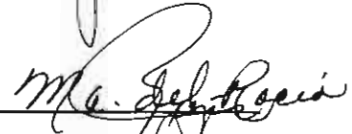
CODIRECTORAS: DRA. TERESA FRANCISCA MIER GONZÁLEZ



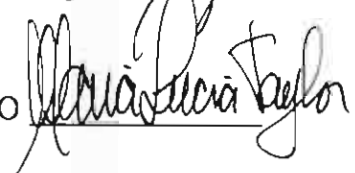
DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA



ASESORA: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES



SINODALES: DRA. LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO



DR. ARMANDO PÉREZ TORRES



AGRADECIMIENTOS

A:

Dra. Teresa Mier González.
Dra. Conchita Toriello Nájera.
Dra. María del Rocío Reyes Montes.
Dra. Lucia Taylor da Cunha e Mello.
Dr. Armando Perez Torres.
Dra. Conchita Agundis.
Dr. Edgar Centeno.
Dr. Rubén Román.
Dra. Salud Pérez.
Dra. Thalía Castro Barrera.
M. en C. Karina García Gutiérrez.
Biol. Armando Zepeda.
Biol. Margarita González Barajas.

A las siguientes instituciones:

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
Universidad Nacional Autónoma de México.
CONACYT, Megaproyecto grupal G31451B, beca otorgada.
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

A los siguientes laboratorios y su personal:

Laboratorio de Micología, UAM-X.
Laboratorio de Micología Básica, Facultad de Medicina, UNAM.
Laboratorio 6 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

A la familia Castellanos.

A todas las personas que apoyaron para la realización de esta tesis.

Resumen

Entre los factores de patogenicidad de los aislados fúngicos que atacan insectos, se encuentran la actividad de enzimas, como proteasas y quitinasas, producidas por propágulos fúngicos conocidos como blastosporas.

En el presente trabajo se comprobó experimentalmente la actividad de proteasas totales, una proteasa tipo subtilisina (Pr1) y una tipo tripsina (Pr2), la actividad de quitinasas en tres aislados (EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3) de *Paecilomyces fumosoroseus* de México. También se observó la transición conidio-blastospora *in vitro* en un medio de cultivo con varias fuentes de carbono y de nitrógeno (medio H), y en un medio sintético con quitina coloidal como única fuente de carbono y de nitrógeno. Otro parámetro observado fue la virulencia en mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) de los tres aislados, expresada a través del índice de crecimiento y desarrollo fúngico (ICDF).

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron los aislados EH-506/3 (alta virulencia y rápida colonización en la ninfa) y EH-520/3 (baja virulencia y lenta colonización de la ninfa) para infectar ninfas de mosquita blanca y dar seguimiento al desarrollo del hongo con microscopía electrónica de barrido (MEB). Finalmente, se realizó un estudio inmunocitoquímico por microscopía electrónica de transmisión (MET), durante las 6 primeras horas de la infección de la mosquita blanca con el aislado más virulento (EH-506/3).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el aislado EH-506/3 produjo más rápidamente, la mayor cantidad de proteasas totales, Pr1 (745.7 UPr1/ml a las 120

h), Pr2 (251.3 UPr2/ml a las 216 h), con respecto al aislado EH-520/3 que produjo 347.3 UPr1/ml a las 216 h y 208 UPr2/ml a las 240 h del cultivo. El aislado EH-503/3, presentó una actividad intermedia de proteasas, con 496.7 UPr1/ml a las 312 h, y 200 UPr2/ml a las 48 h. La actividad de quitinasas, en cambio, fue más alta para EH-520/3 (81 UQ/ml), comparada con EH-506/3 (76 UQ/ml) y EH-503/3 (61 UQ/ml). La máxima actividad de quitinasas se observó a las 312 h de cultivo en los tres casos.

Asimismo, EH-506/3 presentó una transformación dimórfica más rápida, con respecto a los otros dos aislados y se observó una rápida penetración al insecto, tanto mediante la determinación del ICDF (realizado con los tres aislados) como por MEB (realizado con EH-506/3 y EH-520/3), ya que a las 18 h, EH-506/3 ya había penetrado al hospedante, emergido nuevamente y producido conidios, mientras que EH-520/3 apenas estaba penetrando al insecto, hecho que coincide con las observaciones obtenidas al aplicar el ICDF. Las observaciones de MET con el aislado más virulento (EH-506/3) permitieron constatar que a las 6 h el hongo ya había penetrado, y que se estaban produciendo quitinasas, aunque en muy baja cantidad.

Los resultados experimentales mostraron evidencias de una aparente relación entre Pr1, velocidad del cambio dimórfico y la virulencia del hongo. Asimismo, este estudio permitió hacer una primera descripción de la aparición de Pr1 y Pr2 en *P. fumosoroseus* y la existencia de estructuras de infección como los apresorios en el binomio *P. fumosoroseus*/mosquita blanca estudiado.

Abstract

Among virulence factors of entomopathogenic fungi, protease and chitinase activities during blastospore production have been mentioned. This work describes experimentally the total protease activity, a subtilisin-like protease (Pr1) and a trypsin-like protease (Pr2) and the chitinase activity of three *Paecilomyces fumosoroseus* isolates (EH-506/3, EH-503/3 and EH-520/3) from Mexico.

Conidia-blastospore transition is also described, in a rich culture media with several carbon-nitrogen sources (H media) and in a basal media with chitin as sole carbon-nitrogen source.

Virulence, expressed as the growth and developmental fungal index (GDFI) was also measured in whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*).

Results of these experiments, pointed out isolates EH-506/6 (high virulence and fast nymph colonization) and EH-520/3 (low virulence and slow nymph colonization) to follow the GDFI by scanning electron microscopy (SEM). Finally, an immunocytochemical study by transmission electron microscopy (TEM) with the most virulent isolate (EH-506/3) was performed during the first 6 h of fungal infection.

Results shows EH-506/3 as the isolate with a rapid high total protease production, as well as Pr1 (745.7 UPr1/ml a 120 h) and Pr2 (251.3 UPr2/ml at 216 h), in contrast to EH-520/3 (347.3 UPr1/ml at 216 h and 208 UPr2/ml at 240 h) and EH-503/3 (496.7 UPr1/ml at 312 h and 200 UPr2 at 48 h). High chitinase activity was observed with EH-520/3 (81 UQ/ml), in contrast to EH-506/3 (76 UQ/ml) and EH-503/3 (61 UQ/ml). Higher activities were observed at 312 h in all cases. Also, conidium dimorphism was faster in EH-506/3 isolate, when compared to the other two isolates. EH-206/3

penetrated the insect within the first 18 h of incubation, observed by FGDI and SEM. At this time (18 h) spores were produced. EH-520/3 achieved penetration and conidiation until 48 h.

EH-506/3 TEM observations showed fungal penetration at 6 h of incubation. Low chitinase production was also observed.

Experimental results showed an apparent relation among Pr1 production, dimorphic change speed and virulence.

This study mentioned Pr1 and Pr2 in *P. fumosoroseus* for the first time and describes infection structures that resembled appresoria in shape in the studied relation *P.fumosoroseus*/whitefly.

Accepted for publication
15/05/2017

ÍNDICE

	Pág.
Introducción	1
Marco Teórico	3
La mosquita blanca como insecto plaga	3
Ciclo de vida de la mosquita blanca	4
Uso de hongos entomopatógenos para el control de insectos	6
Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos	10
Reconocimiento y adhesión	12
Fuerza mecánica y formación de apresorios	17
Participación de las quitinasas y proteasas fúngicas en el mecanismo de ataque a insectos	20
Toxinas	30
Dimorfismo fúngico	32
Justificación	35
Hipótesis	37
Objetivos	38
Objetivo general	38
Objetivos particulares	38
Metodología	40
Aislados fúngicos	40
Preparación y conteo de inóculo	40
Ensayos enzimáticos	41
Proteasas	41
Condiciones de cultivo	41
Determinación de la actividad de proteasas totales	41
Determinación de la actividad de proteasas tipo tripsina (Pr1) y tipo subtilisina (Pr2)	42
Quitinasas	43
Preparación y tinción del sustrato	43
Condiciones de cultivo	43
Determinación de la actividad de quitinasas	44
Actividad específica de proteasas y quitinasas	44
Dimorfismo fúngico	45
Cinética de la transición conidio-blastospora <i>in vitro</i>	45
Determinación de virulencia	46
Insectos	46
Determinación del índice de crecimiento y desarrollo fúngico	46
Pruebas de infección <i>in vivo</i> para microscopía electrónica	47
Inmuno-oro ultraestructural con anticuerpo biotilado	48
Técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB)	50
Análisis estadístico	51
Resultados	52
Estudios enzimáticos	52
Proteasas totales	52

	Pág.
Estandarización de condiciones para la determinación de la actividad de proteasas tipo subtilisina (Pr1) y tipo tripsina (Pr2)	55
Determinación de la actividad de Pr1 y Pr2	55
Producción de quitinasas en cultivo sumergido	60
Cinética de la transición conidio-blastospora	63
Producción de propágulos en medio H	63
Producción de propágulos en medio sintético adicionado con quitina coloidal	70
Pruebas de virulencia	78
Determinación del índice de crecimiento y desarrollo fúngico	78
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	85
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	95
Discusión	99
Conclusiones	119
Bibliografía	121
Artículo aceptado para su publicación	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág
1. Ciclo de vida de la mosquita blanca	5
2. Mecanismo general de patogenicidad de los microorganismos	8
3. Modelo teórico de penetración de los hongos entomopatógenos.	11
4. Actividad volumétrica de proteasas de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> determinada por el método de la azocaseína.	53
5. Actividad específica de proteasas (expresada como UP/□g de proteína total en el sobrenadante) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> .	54
6. Actividad volumétrica de proteasas tipo subtilisina Pr1 (determinada contra el sustrato Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> .	58
7. Actividad específica de proteasas tipo subtilisina Pr1 (determinada contra el sustrato Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na y expresada como UPr1/□g de proteína total en el sobrenadante del cultivo) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> .	58
8. Actividad volumétrica de proteasas tipo tripsina Pr2 (determinada contra el sustrato Bz-Phe-Val-Arg-pNa) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> .	59
9. Actividad específica de proteasas tipo tripsina Pr2 (determinada contra el sustrato Bz-Phe-Val-Arg-pNa y expresada como UPr1/□g de proteína total en el sobrenadante del cultivo) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> .	60
10. Actividad volumétrica de quitinasas determinada con azul brillante de remazol, de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> .	61
11. Actividad específica de quitinasas (determinada contra quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol y expresada como UQ/□g de proteína total en el sobrenadante del cultivo) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de <i>P. fumosoroseus</i> .	61
12. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-506/3 en medio H con caseína al 1%.	67
13. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-503/3 en medio H con caseína al 1%.	68
14. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-520/3 en medio H con caseína al 1%.	69
15. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-506/3 en medio sintético con quitina coloidal al 1%.	72
16. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-503/3 en medio sintético con quitina coloidal al 1%.	73
17. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-520/3 en medio sintético con quitina coloidal al 1%.	74

Figura	Pág.
18. Esquema general de la transición de conidio a blastospora de aislados de <i>P. fumosoroseus</i> de México.	77
19. Ninfa testigo en cuarto estadio	80
20. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> y conidios de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> a las 0 h de incubación.	81
21. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> a las 12 h de incubación con tres aislados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	81
22. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> a las 18 h de incubación con tres aislados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	82
23. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> a las 24 h de incubación con tres aislados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	82
24. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> a las 36 h de incubación con tres aislados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	83
25. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> a las 48 h de incubación con tres aislados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	83
26. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> a las 60 h de incubación con tres aislados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	84
27. Ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> a las 72 h de incubación con tres aislados de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	84
28. Aspecto de las ninfas a las 96 h de incubación con los tres aislados	85
29. Ninfa testigo de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> sin inocular	88
30. Conidios de EH-506/3 a 0 h de incubación sobre la zona del raquis	88
31. Conidios de EH-506/3 a 0 h de incubación	89
32. Conidios de EH-520/3 a 0 h de incubación	89
33. Conidios de EH-506/3 a las 6 h de incubación	89
34. Conidios de EH-520/3 a las 6 h de incubación.	90
35. Daño cuticular provocado por EH-520/3 a las 6 h de incubación.	90
36. Daño cuticular provocado por EH-506/3 a las 6 h de incubación.	91
37. Estructura de EH-520/3 que semeja un apresorio a las 12 h de incubación.	91
38. Hifa de EH-520/3 dirigiéndose hacia un hueco de la cutícula a las 12 h de incubación.	92
39. Matriz mucilagínosa que cubre a hifas de EH-520/3 a las 12 h de incubación	92
40. Crecimiento micelial de EH-506/3 a las 18 h de incubación.	93
41. Hifas de EH-506/3 a las 18 de incubación	93
42. Hifas de EH-506/3 penetrando directamente la cutícula a las 24 h de incubación	93
43. Crecimiento de EH-506/3 a través del orificio vasiforme a las 24 h de incubación.	94
44. Crecimiento de EH-520/3 a través del orificio vasiforme a las 24 h de incubación.	94
45. Crecimiento de EH-520/3 en la superficie de la ninfa a las 24 h de incubación.	94

Figura	Pág.
46. EH-506/3 creciendo en la superficie de la ninfa a 48 h de incubación.	95
47. Penetración de EH-506/3 a las 6 h de incubación	96
48. EH-506/3 penetrando a la ninfa a las 6 h.	96
49. Corte transversal de las estructuras fúngicas de EH-506/3 penetrando a ninfa de mosquita blanca.	97
50. Hifa de EH-506/3 penetrando la cutícula de <i>T. vaporariorum</i>	97
51. Aspecto de las hifas de EH-506/3 penetrando la mosquita blanca a las 6 h de incubación.	98

INTRODUCCIÓN

Entre las diferentes causas de la contaminación de los ecosistemas se encuentra el uso inadecuado de plaguicidas químicos, que originan severos daños sobre los humanos y el ambiente. Entre las plagas más difíciles de combatir están los insectos, que son considerados como tal cuando han rebasado su hábitat natural, se encuentran en una situación en la que prácticamente no tienen enemigos naturales, y si existen las condiciones ambientales adecuadas, su población se incrementa rápidamente. Uno de los principales problemas que presenta el control de insectos por medios químicos, es la adquisición de resistencia, por lo que su uso frecuente resulta ineficaz y con un fuerte impacto ambiental negativo. Por tal razón, hay una demanda continua de métodos alternativos para el control de plagas de insectos. Uno de estos métodos es la utilización de biorreguladores naturales de tales insectos, que regulan poblaciones, ofrecen la posibilidad de ser utilizados para un control selectivo, y dan tanto seguridad humana como ambiental. Entre los organismos susceptibles a ser utilizados para el control biológico, se encuentran los hongos microscópicos (Fernández-Tavizón, 1980; Ferron *et al.*, 1991; Wraight *et al.*, 2000).

Para poder utilizar de manera eficiente hongos microscópicos para el control de plagas agrícolas, es necesario conocer los factores de patogenicidad tales como la actividad de enzimas como proteasas y quitinasas, producidas por propágulos fúngicos como las blastosporas, de la misma manera, es necesario conocer la virulencia del hongo frente al insecto blanco.

El presente trabajo se planteó para comprobar experimentalmente características asociadas a la virulencia no descritas previamente para *P. fumosoroseus* de México, como son la actividad de proteasas totales, una proteasa tipo subtilisina (Pr1) y una tipo tripsina (Pr2), así como la actividad de quitinasas en tres aislados. También se observó la transición conidio-blastospora *in vitro* en medios de cultivo con varias fuentes de carbono y nitrógeno, como son la caseína y la quitina coloidal. Otro parámetro observado fue la virulencia en mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) de los tres aislados expresada a través del índice de crecimiento y desarrollo fúngico. Se siguió el desarrollo del hongo también por microscopía electrónica de barrido y de transmisión.

MARCO TEÓRICO

La mosquita blanca como insecto plaga

La mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) es una plaga polífaga de gran importancia en nuestro país, que ataca hortalizas, plantas ornamentales de invernadero y plantas silvestres, ocasionando grandes pérdidas económicas, pues se calcula que anualmente daña 700,000 hectáreas de cultivos.

Actualmente existen varios métodos de control para la mosquita blanca, los cuales incluyen el uso de insecticidas químicos de diversos tipos, como productos sistémicos, por ejemplo el dimetoato, fosfamidon y oxidemetonmetil (Sánchez-Potes, 1990), los cuales, a pesar de ser altamente tóxicos, tener alta persistencia en el ambiente, ser bioacumulables y estar prohibidos por organismos internacionales como la Agencia de Protección al Ambiente (EPA), continúan siendo utilizados en nuestro país por disminuir rápidamente las poblaciones de mosquita blanca y evitar así, el daño al cultivo (Greer, 2000; Mier *et al.*, 1999; Sugavanam y Tianjian, 1998; Toriello 2001). Otros químicos autorizados por la EPA para el control de la mosquita blanca, son los piretroides (derivados de plantas), carbamatos, jabones insecticidas, aceites y reguladores del crecimiento de los insectos (Greer, 2000).

Uno de los problemas que presenta el control de esta plaga por medios químicos, además del daño al hombre y al ambiente, es que el insecto adquiere rápidamente resistencia a los plaguicidas, por lo que existe una demanda continua de métodos para el control de dicho organismo.

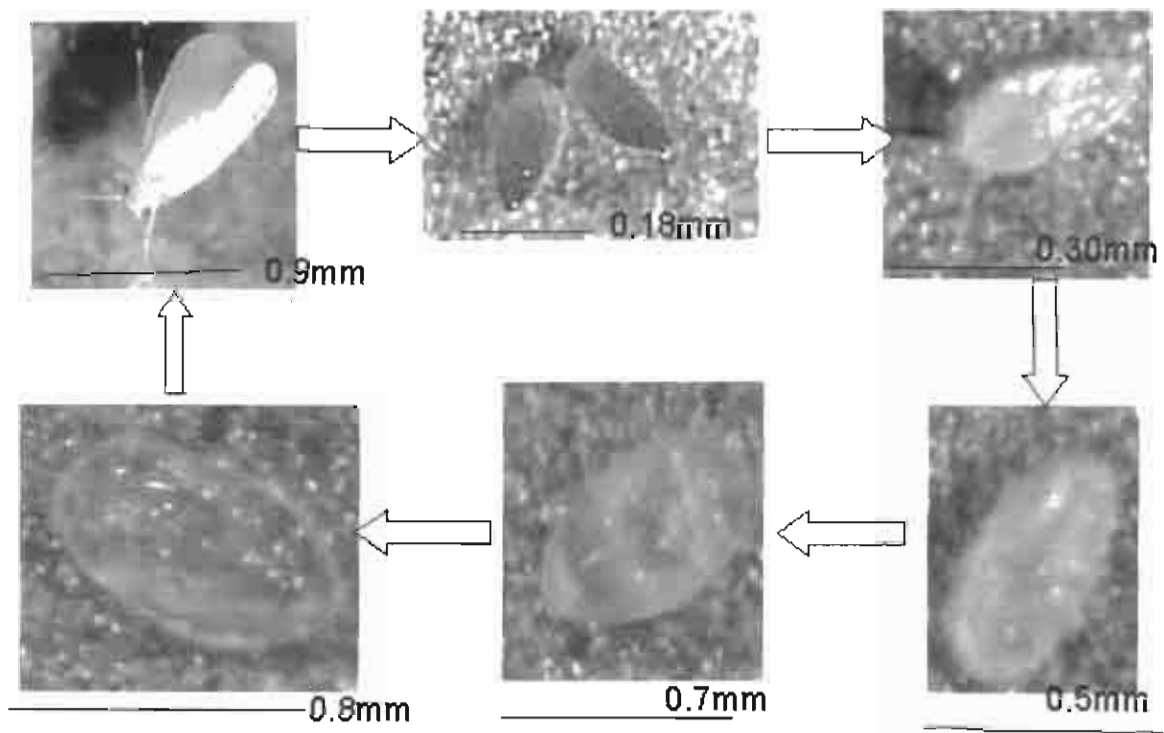
En la búsqueda de alternativas menos dañinas para el ambiente y el ser humano, se han utilizado el control biológico y los insecticidas microbianos con buenos resultados, ya que las plagas no desarrollan resistencia a estos métodos, como sucede con los insecticidas químicos (Butt *et al.*, 1998; Greer, 2000; Mesquita y Lacey, 2001; Sugavanam y Tianjian, 1998).

Ciclo de vida de la mosquita blanca

La mosquita blanca es un insecto chupador que se localiza en el envés de las hojas de la planta hospedante. La hembra oviposita los huevecillos en posición vertical. Cuando están recién ovipositados son de color verde pálido y van tomándose castaño oscuro (Figura 1); miden aproximadamente 0.186 mm de largo y 0.089 mm de ancho, y el tiempo de incubación varía de 5 a 11 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Pasado ese tiempo, el huevecillo eclosiona y aparecen las ninfas de primer estadio, las cuales son ovaes, aplanadas, móviles, con patas y antenas bien desarrolladas, y miden 0.308 mm x 0.155 mm. El primer estadio dura cinco días antes de mudar, al final de la muda, la ninfa introduce su estilete en la hoja y se queda fija succionando la savia de la planta (Byrne y Bellows, 1991).

El siguiente estadio, dos, dura de dos a cuatro días durante el cual la ninfa mide 0.486 x 0.307 mm; el estadio tres dura de 4-6 días y la ninfa mide 0.696 x 0.458 mm. En ambos estadios los insectos tienen forma de escama aplanada, son transparentes y las patas y antenas ya no son funcionales. El último estadio antes de pasar a adulto es el cuatro, en el que las ninfas miden 0.805 x 0.302 mm, y es el más corto, ya que dura de 6 a 10 h. Se divide en tres subestadios, que se distinguen por

su forma. En el primero, la ninfa es aplanada y de color blanco opaco o translúcido; en el segundo, la ninfa tiene una apariencia más engrosada, es opaca y está recubierta por una cera; el tercero es muy similar al anterior; excepto que los ojos rojos del adulto son claramente visibles y el cuerpo se incrementa tomando un color amarillo. Finalmente emergen los adultos, que miden en promedio 0.933 x 0.270 mm. Los machos tienen una longevidad de ocho semanas, mientras que las hembras once. Presentan de 11 a 12 generaciones al año, y en cautiverio, una hembra puede depositar hasta 300 huevecillos en toda su vida (Byrne y Bellows, 1991).



Fotos digitales: David Basilio y Noé Robles

Figura 1. Ciclo de vida de la mosquita blanca: a) adulto; b) huevecillos; c) ninfa uno; d) ninfa dos; e) ninfa tres, f) ninfa cuatro, subestadio uno. Barra: 0.3 mm.

Uso de hongos entomopatógenos para el control de insectos

Un método de control de la mosquita blanca y otras plagas insectiles, es la utilización de biorreguladores naturales como los hongos, ya que el mecanismo de regulación poblacional de plagas ofrece la posibilidad de ser utilizado para un control selectivo y seguro (Mier *et al.*, 1991). Miembros representativos de todos los grupos fúngicos mayores tienen los mecanismos requeridos para la infección y el desarrollo dentro de los invertebrados (Boucias y Pendland, 1991). Algunos de estos hongos tienen espectros restringidos de hospedantes, mientras que otras especies tienen un espectro amplio, con aislados individuales más específicos (Clarkson y Charnley, 1996). Uno de estos hongos es *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith, que ha sido reportado como un regulador efectivo para el control de la mosquita blanca (Mesquita *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1998).

Los patógenos fúngicos tienen mecanismos de infección que les permiten colonizar al hospedante y obtener así nutrimentos necesarios para su metabolismo y un ambiente donde el microorganismo puede obtener ciertos beneficios que promueven su sobrevivencia, reproducción y transporte. De la misma manera, el hongo tiene ciertos factores que le permiten neutralizar la respuesta inmune y competir con la microflora del hospedante, rechazar los tejidos que afectarían su eficacia como patógeno, así como resistir los inhibidores de enzimas presentes en la hemolinfa de los insectos (Figura 2) (Eguchi y Shomoto, 1985; Eguchi *et al.*, 1993; Kanost, 1999; Askary, *et al.*, 1999; Casadevall *et al.*, 2003). Otro factor que determina el éxito de una invasión fúngica es la virulencia, que es una característica microbiana expresada sólo en un hospedante susceptible y que de acuerdo con

Lipsitch *et al.* (1996) puede definirse como *la reducción del éxito reproductivo del hospedante*; ya que a menudo está asociada con la transmisión del hongo que produce la muerte de los organismos infectados (Khachatourians, 1992). Los determinantes de virulencia son relativamente fáciles de definir cuando se habla de patógenos obligados, ya que se expresan en el hospedante y contribuyen a la iniciación o progresión de la enfermedad en un sitio anatómico dado (Haynes, 2001). En la naturaleza, además de la virulencia, el éxito de un micopatógeno estará determinado por su capacidad de producir y repartir propágulos infecciosos a sistemas de hospedantes susceptibles. Se consideran como tales a individuos que han sido expuestos a una gran dosis del patógeno o para quienes los hongos son inmunológicamente nuevos (van Burik y Magee 2001).

Para que una epizootia pueda desencadenarse, debe existir una relación entre el hospedante, el patógeno y el ambiente, si estos tres factores están combinados adecuadamente, entonces aparecerá la enfermedad (Madigan *et al.*, 2000). Muchos hongos patógenos tienen un nicho en el ambiente, a menudo como saprobios en suelos o en la vegetación (Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Aparentemente adquieren y mantienen su capacidad de ser virulentos en animales independientemente del requerimiento de un hospedante. La patogenicidad de los hongos ha resultado de la evolución de un mecanismo que permite la transición de una fase saprobia a otra parásita y que los adapta a su desarrollo dentro del hospedante (Knogge, 1998).

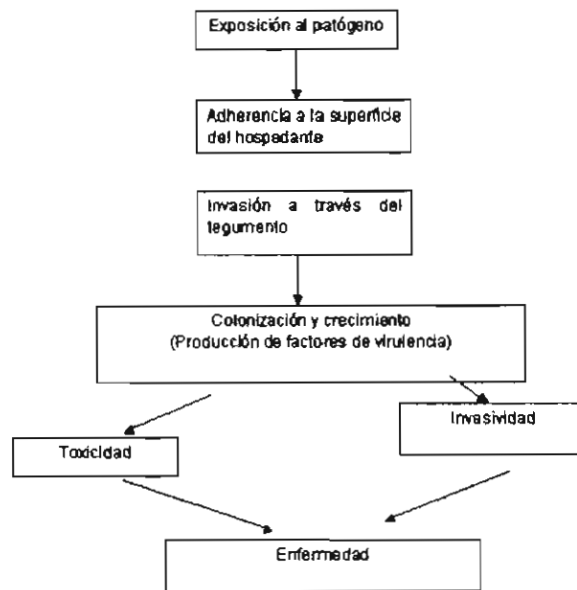


Figura 2. Mecanismo general de patogenicidad de los microorganismos (Modificado de Madigan *et al.*, 2000).

Según Casadevall *et al.* (2003), los mecanismos de un microorganismo para infectar al hospedante y la capacidad de usar dichos mecanismos para poder vivir en el suelo sin necesidad de infectar un animal, es la virulencia preformada, término usado para señalar el hecho de que esos microorganismos son recuperados del ambiente con la capacidad de causar enfermedades y es posible distinguir esta virulencia de aquella seleccionada a partir de la dependencia o una asociación muy cercana con el hospedante. La virulencia, puede considerarse como multifactorial (Latgé, 2001), y los entomopatógenos pueden conservar la capacidad de infectar a los insectos aún después de estar en cultivo *in vitro* durante varias generaciones (Brownbridge *et al.*, 2001; Vandenberg y Cantone, 2004).

Los determinantes de virulencia son relativamente fáciles de definir cuando se habla de patógenos obligados, ya que se encuentran en los genes expresados durante las reacciones del metabolismo primario; para codificar un determinante de virulencia, el gen de interés debe ser expresado en el hospedante y contribuir a la iniciación o progresión de la enfermedad en un sitio anatómico dado (Haynes, 2001).

Hay varias clases amplias de genes de virulencia, algunos podrían codificar para receptores que detectan directa o indirectamente, la presencia del hospedante. La activación de tales receptores podría iniciar una vía de transducción de señales que resulte en la inducción de genes de virulencia general. Otros genes pueden producir factores que inactivan las defensas del hospedante o para sintetizar toxinas que son requeridas para la enfermedad; también otros genes de virulencia pueden codificar para enzimas que permiten que el hongo pase la barrera del hospedante (St. Leger, 1995).

En el caso de los entomopatógenos, *Metarhizium anisopliae* es un agente de control bien caracterizado para un amplio espectro de plagas, incluyendo insectos y ácaros. Para identificar los genes involucrados en el proceso de infección, se han hecho análisis de representación diferencial, se identificaron 34 secuencias y 14 *Expressed sequence tag* (EST) con ortólogos conocidos, casi todas las secuencias identificadas mostraron una similitud significativa a otros genes fúngicos (Freimoser *et al.*, 2003), por lo que es probable que sean comunes a las otras especies de hongos patógenos de insectos (Dutra *et al.*, 2004).

Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos

El mecanismo básico de infección de los hongos entomopatógenos está caracterizado por la penetración directa del integumento. Ésta se inicia con la adherencia de la unidad infectiva, generalmente un conidio a la cutícula del insecto (Figura 3). El éxito de una infección fúngica radica en gran parte en esta primera fase. La función principal de la adherencia es el anclaje del propágulo al insecto, pero también puede ser requerida para el reconocimiento químico y topográfico (Sosa-Gómez *et al.*, 1997) para encontrar un microambiente adecuado para la penetración (Fernández *et al.*, 2001; Tucker y Talbot, 2001; Jeffs *et al.*, 1999). Posteriormente, el conidio germina y el proceso de penetración requiere de una combinación de fuerza mecánica y degradación enzimática de la cutícula. Dependiendo de la especie del hongo, se forma un tubo de germinación que penetra directamente, o bien se forman los apresorios, que pueden tener diferentes formas, y se han identificado como órganos específicos que preparan la superficie del hospedante para la invasión, usualmente se unen a éste al secretar una goma muy potente, y al desarrollar una clavija de penetración en su base, la fuerza es ejercida verticalmente y puede ser dirigida eficientemente a la cutícula (Bastmeyer *et al.*, 2002) (Figura 3).

Después de pasar la epicutícula, las estructuras penetrantes a menudo se expanden lateralmente en las capas externas de la procutícula, produciendo placas de penetración; éstas expansiones pueden causar fracturas que favorecen la penetración. El paso del hongo a través de la procutícula puede ser más o menos vertical, o involucrar una extensión lateral del micelio; posteriormente, las hifas alcanzan la epidermis. Una vez en el hemocele, el micelio se ramifica a través del

hospedante (Figura 3), probablemente formando blastosporas (Boucias y Pendland, 1991; Charnley y St. Leger, 1991; Askary *et al.*, 1999; Goettel e Inglis, 1997). La penetración, aunque de manera menos frecuente, puede ocurrir también por heridas, a través de los órganos de los sentidos o por el tracto digestivo (Boucias y Pendland, 1991; Charnley y St. Leger, 1991; Askary *et al.*, 1999; Goettel e Inglis, 1997). La muerte del hospedante a menudo se debe a una acción combinada de toxinas fúngicas, obstrucción física de la circulación sanguínea, disminución en el aporte de nutrimentos e invasión de órganos. Después de la muerte del hospedante, las hifas usualmente emergen del cadáver y bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad, producen conidios en el exterior del hospedante (Boucias y Pendland, 1991; Charnley y St. Leger, 1991; Askary *et al.*, 1999; Goettel e Inglis, 1997).

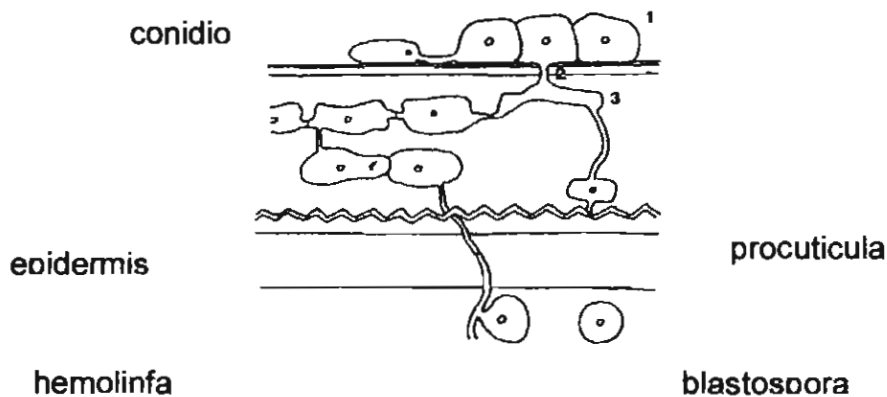


Figura 3. Modelo teórico de penetración de los hongos entomopatógenos. 1. apresorio. 2. clavija de penetración. 3. clavija de penetración. Modificado de Charnley y St. Leger (1991).

Los principales factores de virulencia conocidos de los hongos comprenden las proteínas de reconocimiento y adhesión, las características estructurales de los

conidios que le confieren resistencia a los mecanismos antifúngicos del hospedante, así como aquellas proteínas que pueden promover el crecimiento micelial (Latgé, 2001); la fuerza mecánica, toxinas, melaninas y dimorfismo (Boucias y Pendland, 1991). Estos mecanismos han sido estudiados exhaustivamente en patógenos de plantas y de mamíferos, sin embargo, en hongos entomopatógenos, algunos de éstos son poco conocidos o no se han reportado, sin embargo, es probable que existan mecanismos análogos, debido a la convergencia entre las estrategias fúngicas que les confieren capacidad infectiva para la colonización de hospedantes, aunque los genes y sus productos, que determinan resistencia o susceptibilidad de ambos lados de la relación hospedante-parásito no estén del todo entendidos (Casadevall *et al.*, 2003; St. Leger *et al.*, 1997).

Por otro lado, existen factores de virulencia como las enzimas, la producción de conidios y su rápida germinación que han sido estudiados en los patógenos de insectos con el objetivo de contar con agentes microbianos más efectivos para el control de plagas de importancia agrícola (Jackson *et al.*, 1985; Jackson *et al.*, 1997; Altre y Vandenberg, 2001; Vega *et al.*, 2003).

Reconocimiento y adhesión

La adherencia de las esporas a la superficie del hospedante es el primer paso que tiene que dar un patógeno para establecer la enfermedad, y sirve principalmente para anclar el propágulo al insecto. También puede ser requerida para el reconocimiento químico y topográfico (Sosa-Gómez *et al.*, 1997) para encontrar un microambiente adecuado para la penetración (Fernández *et al.*, 2001) del

hospedante que posibilite el desarrollo fúngico subsiguiente (Tucker y Talbot, 2001; Jeffs *et al.*, 1999). El fenómeno de la adhesión a los hospedantes, se ha estudiado ampliamente en hongos fitopatógenos, patógenos de mamíferos y de menor manera en algunos entomopatógenos, como *Entomophaga maimaga*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, *Metarhizium* y *Verticillium* (Jeffs *et al.*, 1999). La interacción conidio-hospedante podría involucrar un complejo de mecanismos de reconocimiento específicos (glicoproteínas, interacciones ligando-receptor, por ejemplo lectinas) y no específicos (electrostáticos o hidrofóbicos, fuerzas de Van de Waals) (Cotter y Kavanagh, 2000; Doyle, 2000). En los hongos patógenos de invertebrados terrestres, los componentes responsables de la interacción espóra-cutícula son considerados como preexistentes. Boucias *et al.* (1988), demostraron que preparaciones homogéneas de conidios de *Nomuraea rileyi*, *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* se unían de manera no específica a la cutícula de los insectos, siempre y cuando no estuviera expuesta la endocutícula. Aunque la adhesión a superficies de los organismos es común entre las especies fúngicas, hay una variación significativa en la composición aparente de los materiales con los que el hongo se fija al hospedante y en las pistas ambientales que inducen el desarrollo de la fijación de las esporas. Las adhesinas de los hongos fitopatógenos son típicamente glicoproteínas insolubles en agua, aunque se han detectado en el material de adhesión lípidos y polisacáridos que claramente contribuyen a la fijación. Sin embargo, es una composición muy heterogénea y no hay evidencia de un compuesto de adhesión o un mecanismo de fijación común a todos esos hongos (Knogge, 1998, Hajeck y Eastburn, 2003).

Los mecanismos de reconocimiento, probablemente se encuentran situados en la superficie de las esporas. Estudios en la pared celular de los hongos han revelado que muchas proteínas localizadas en ese sitio no tienen un papel estructural exclusivo. Algunas proteínas secretadas juegan un papel importante en determinar las propiedades de adhesión de los hongos, mientras que otras, incluyendo las hidrofobinas, que son proteínas pequeñas con ocho residuos de cisteína característicamente espaciados a lo largo de la secuencia de aminoácidos, pueden ser requeridas para el crecimiento fúngico a través de diversos ambientes y durante las transiciones del desarrollo (Tucker y Talbot, 2001). Kamp y Bidochka (2002) encontraron que cada aislado tiene un perfil proteico único para cada condición de cultivo. Jeffs *et al.* (1999) también reportaron diferentes proteínas (hidrofobinas) en diferentes especies fúngicas, dependiendo de la composición de los medios de cultivo de donde fueron obtenidas.

Otro factor determinante en la adherencia es el tipo de conidio; los entomopatógenos, tienen dos tipos, ya sea hidrofóbicos o hidrofílicos (Wolken *et al.*, 2003). Los conidios hidrofóbicos (secos) tienen una capa externa de microfibrillas muy cercanas (*rodlets*), esta capa parece ser única del estado conidial y no ha sido detectada en las células vegetativas. El tamaño relativo y el arreglo de dichas microfibrillas puede variar de acuerdo con la especie, aunque las condiciones de cultivo también pueden influenciar dicha capa. Tratamientos fuertes ya sean físicos o químicos son requeridos para suspender esos conidios; se cree que la resistencia de esos conidios puede ser mayor por la presencia de pigmentos, así como por la edad del conidio, ya que conidios de colonias jóvenes de *P. fumosoroseus* y *B. bassiana*

son fácilmente suspendidos en agua destilada por agitación con un vórtex. Es probable que los arreglos en las microfibrillas puedan resultar por el envejecimiento del conidio y simplemente reflejan un proceso de desecación o endurecimiento. Sin embargo se ha intentado degradar esta capa, pero es insoluble a detergentes, proteasas, quitinasas, urea y mercaptoetanol entre otros. La capa de microfibrillas está formada de residuos de glucosa, manano y N-acetilglucosamina (Boucias y Pendland, 1991). Boucias *et al.* (1988), demostraron que los componentes responsables de la interacción hidrofóbica para la adherencia del conidio están localizados a lo largo de la pared celular de los conidios que tienen microfibrillas. Por otro lado, Holland *et al.* (2002) observaron que en los conidios de *P. lilacinus*, la capa de microfibrillas es tolerante a la luz UV y otras fuentes de luz. Se ha demostrado con *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* y *Verticillium* que la capa de microfibrillas esta formada principalmente por hidrofobinas (Kamp y Bidochka, 2002), y se ha encontrado un gen (*ssgA*) que codifica para dichas proteínas en *M. anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1992). La hidrofobicidad de la superficie del conidio varía entre especies, e incluso cada aislado tienen un perfil proteico único, lo mismo que la proporción de proteínas y carbohidratos presentes en los conidios (Jeffer, 1999; Kamp y Bidochka 2002).

Los conidios hidrofílicos de *Hirsutella thompsonii*, *V. lecanii* y *Aschersonia aleyrodis* también poseen una capa mucosa que facilita la dispersión por la lluvia y la adhesión a los insectos hospedantes. Se ha propuesto que la capa mucosa asociada con los conidios hidrofílicos podría actuar como un antidesecante, proteger a los conidios contra los polifenoles tóxicos del hospedante, contener varias actividades

enzimáticas y actuar como material de fijación (Boucias y Pendland, 1991). En *V. lecanii* se observó ultraestructuralmente la presencia de una capa mucilaginosa, sobre la cutícula, que se extendió entre hifas y conidios adyacentes (Askary *et al.*, 1999). Probablemente dicha capa mucosa pueda tener un papel en la preparación de la superficie del hospedante para la penetración, ya que se ha demostrado que en especies de fitopatógenos como *Uromyces viviae-fabae*, dicha capa forma un tapete de adhesión junto con la superficie de la planta, en dicho tapete se encuentran presentes enzimas hidrolíticas, que además podrían afectar la adhesión a las células del hospedante y así podría ayudar al hongo a persistir en la superficie del hospedante y penetrar en tejidos más profundos, como sucede con *Candida albicans* (Hube, 1996). La presencia de tales proteínas en el material de adhesión proporciona un medio para asegurar que el material proveniente de la ruptura de la cutícula esté inmediatamente disponible como nutrimento para la parte más activa del hongo (Tucker y Talbot, 2001; Cole *et al.*, 1998). Se ha estudiado recientemente el nivel de control transcripcional requerido para la liberación de las adhesinas y se ha observado que es altamente variable, haciendo de la adhesión un proceso metabólico aparentemente pasivo o activo, dependiendo de la especie. Existen evidencias obtenidas con hongos fitopatógenos de que la adherencia muchas veces está estimulada primero por señalización física mas que química. Sin embargo, patógenos vegetales como *Nectria haematococca* y *Colletotrichum graminicola*, necesitan sintetizar proteínas, principalmente adhesinas para que las esporas puedan fijarse al hospedante, lo que involucra un gasto energético y respiración (Tucker y Talbot, 2001). La adhesión de la espora influencia los eventos de

desarrollo subsecuentes manteniendo la espora en la proximidad de la superficie del hospedante. La unión parece a menudo ser requerida para la transmisión de señales morfogénicas para la extensión del tubo germinal y el desarrollo de las estructuras de infección (Tucker y Talbot, 2001; Kennedy, 1990).

Fuerza mecánica y formación de apresorios

Una vez que se ha adherido el conidio al hospedante, y que ha reconocido las señales ambientales, se produce la germinación. Este proceso involucra un metabolismo rápido de las fuentes de carbono, ya sean endógenas o exógenas, sobre todo azúcares como glucosa y glucosamina, aunque los detonadores de la germinación, podrían variar de especie a especie e incluso entre cepas (James, 2001). Según Fargues *et al.* (1994), la germinación de los conidios tiene tres pasos: pregerminación, hinchamiento y emergencia de uno o varios tubos germinales, y estos, varían fuertemente dependiendo de las condiciones ambientales, ya que la diferenciación vegetativa de un tubo germinal podría consistir en el crecimiento micelial en forma de hifas, o la multiplicación celular por gemación, o llevar a la formación de conidios por conidiación microcíclica. En las hifas invasivas de los hongos patógenos expuestos a una alta resistencia mecánica, la regulación de la fuerza de la pared celular y el turgor podrían ayudar a ejercer la fuerza localizada y resultar en un crecimiento invasivo más eficiente. Para tal fin, los hongos tienen una vía de señalización para mantener la integridad de la pared celular. Otros factores involucrados en la formación de los apresorios son la humectabilidad y/o la dureza del sustrato. Esas características pueden ser de superficie, que son congruentes con

otros atributos del sustrato no aparentes y posiblemente más directamente involucrados en una base en la cual la célula fúngica pueda crecer y responder con el desarrollo de un apresorio. Por ejemplo, podría ser que la dureza de la superficie no fuese el único factor que actúe como una señal inductiva para la iniciación de los apresorios. Las superficies duras más estudiadas (vidrio, plásticos poliméricos, poliestireno, teflón, polipropileno, mylar, etc) (Apoga, *et al.*, 2004; Howard, *et al.*, 1991; Xavier-Santos *et al.*, 1999), tienen características inherentes adicionales, por ejemplo, están cubiertas de una capa de carga (iones), generalmente no son porosas, son firmes y no flexibles en escala microscópica (Apoga *et al.*, 2004).

Los factores asociados con la producción de apresorios *in vivo* han sido estudiados, incluyendo la hidrofobicidad, topografía y químicos en la superficie de los hospedantes, ya que se ha observado que se producen en sitios específicos como alrededor de las setas o en las membranas intersegmentales (Hajek *et al.*, 2002).

La producción de apresorios se ha inducido en varios hongos, entre ellos *E. maimaga* (Hajek *et al.*, 2002), *M. anisopliae* (Clarkson y Chamley, 1996) y *M. flavoviride* (Xavier-Santos *et al.*, 1999) (= *M. anisopliae* var. *acidum*, Driver), en superficies duras e hidrofóbicas. La diferenciación es estimulada por bajos niveles de compuestos nitrogenados complejos y en muchos aislados, esta sujeta a represión catabólica por compuestos de carbono. Sin embargo, la formación de los apresorios no es un prerrequisito universal para una infección exitosa y algunos hongos son capaces de penetrar la cutícula del hospedante sin diferenciación morfológica. En contraste con otros eventos, como la producción de blastosporas, la diferenciación

de los apresorios no siempre aparece, pero es una reacción específica al ambiente (Altre y Vandenberg, 2001).

Después de la formación del apresorio, se ha descrito la aparición de placas de penetración dentro de las 30 h siguientes a la inoculación de trips (*Frankliniella occidentalis*) con *M. anisopliae* (Vestegaard *et al.*, 1999). Muchos hongos patógenos de artrópodos secretan mucílago durante la formación del tubo germinal y la formación de los apresorios, este mucílago a menudo se puede teñir con rojo de rutenio, lo que indica la presencia de polisacáridos ácidos. El mucílago producido por tubos germinales y apresorios probablemente tiene funciones similares al del mucus preformado de los conidios hidrofílicos. El mucílago producido por los tubos germinales penetrantes o por las células de los apresorios es higroscópico y puede crear un ambiente favorable para las enzimas extracelulares liberadas por esas estructuras (Boucias y Pendland, 1991). Se ha reconocido que las integrinas, que son proteínas integradoras de la matriz extracelular y el citoesqueleto, desempeñan un papel en la adherencia de proteínas en células de mamíferos, y como la adhesión, crecimiento y diferenciación son estadios importantes en el desarrollo de los tubos germinales fúngicos durante la fase de pre-penetración, es plausible que un mecanismo similar para sentir el ambiente pueda operar en los hongos. La mayoría de las integrinas reconocen varias proteínas de la matriz extracelular, y se ha sugerido que en algunos hongos, los componentes proteicos de la matriz extracelular podrían estar involucrados en el reconocimiento de señales (Tucker y Talbot, 2001).

Participación de las quitinasas y proteasas fúngicas en el mecanismo de ataque a insectos

Los principales componentes de la cutícula de los insectos son las proteínas, quitina y lípidos (Andersen, 1979), por lo que los entomopatógenos deben producir al menos proteasas (Bidochka y Khachatourians, 1994; Samuels y Patterson, 1995), quitinasas (Liu *et al.*, 2003) y lipasas (Sosa-Gómez y Alves, 1983; Jackson *et al.*, 1985) para poder penetrar al hospedante. Las actividades altas de proteasas y quitinasas son características de las cepas infectivas y virulentas (Bertoldo-Vargas *et al.*, 2003; Barranco-Flórido *et al.*, 2002; Bidochka *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 1994). Variaciones de virulencia para *M. anisopliae* fueron explicadas al observar que puede haber diferencias entre la cantidad, tipo y carga de las enzimas, así como el grado de endurecimiento de la cutícula del hospedante, dependiendo de la cercanía en tiempo de la muda, lo que influye en la degradación cuticular del insecto por aislados de una misma especie, y así las propiedades de las enzimas que degradan la cutícula pueden no ser las óptimas en todos los hospedantes (Gillespie *et al.*, 1998).

La relación entre enzimas y virulencia también ha sido reportado en patógenos de nemátodos (Huang *et al.*, 2004), y en este modelo, las enzimas han sido involucradas en el proceso de infección como factor de virulencia.

Observaciones ultraestructurales sugieren que la degradación enzimática es una manera importante de perforar las barreras cuticulares (Askary *et al.*, 1999, Goettel *et al.*, 1989; St. Leger *et al.*, 1986a; St. Leger *et al.*, 1987b; St. Leger *et al.*, 1996a; St. Leger *et al.*, 1996b).

En estudios previos con 18 aislados de *P. fumosoroseus* de México, se observaron cantidades variables de proteasa y quitinasa (Castellanos-Moguel *et al.*, 2001a) que sugieren una variabilidad intraespecífica muy marcada en este hongo. Asimismo, pudo observarse una relación entre la cantidad de proteasa o quitinasa y la virulencia (media como la concentración letal media CL₅₀) del aislado, siendo ésta última muy alta para los aislados EH-506/3 y EH-503/3 y media para el aislado EH-520/3 (Castellanos-Moguel *et al.*, 2001b). Estos datos señalan la importancia de conocer si la producción de proteasas y quitinasas *in vivo* esta asociada a la virulencia. A este respecto, existen estudios ultraestructurales en insectos diferentes a la mosquita blanca para *M. anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1996a), *V. lecanii* (Askari *et al.*, 1999) y *B. bassiana* (St. Leger *et al.*, 1996b), en los cuales se señala la aparición de proteasas y quitinasas alrededor de las hifas penetrantes y en la vecindad de las estructuras fúngicas. Para *P. fumosoroseus* solamente existen estudios ultraestructurales encaminados a evaluar la rapidez de la penetración de las hifas en larvas de lepidópteros.

Proteasas. Las enzimas consideradas como determinantes principales de la patogenicidad han sido las proteasas, ya que se han detectado durante el curso de la infección al insecto (Kucera, 1981), e inician la degradación cuticular de los insectos y permiten que el hongo colonice al hospedante (St. Leger *et al.*, 1996b); la especie mas estudiada es *M. anisopliae*, y se han caracterizado los componentes del sistema proteolítico de dicho hongo; este sistema está conformado por endoproteasas y exoproteasas. También se han hecho estudios de relación de enzimas y virulencia, y se han detectado aislados de *M. anisopliae* que son deficientes de proteasas y tienen

actividades letales reducidas con respecto a la cepa original, en bioensayos con *Tenebrio molitor* (Wang *et al.*, 2002).

Las endoproteasas son enzimas que rompen los enlaces en el medio de la cadena peptídica, y en los entomopatógenos se han caracterizado serían proteasa del tipo subtilisina (Pr1) y tripsina (Pr2) y están presentes en *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *V. lecanii* y es probable que se encuentren en otros entomopatógenos tales como *Beauveria* spp. o *Paecilomyces* spp. (St. Leger, 1995; St. Leger *et al.*, 1996a; St. Leger *et al.*, 1996b; Bidochka, *et al.*, 1999; Bidochka y Melzer, 2000; Silva-Pinto, *et al.*, 2002). Una proteasa de *V. chlamydosporium* VCP1, está cercanamente relacionada, funcional y serológicamente a Pr1 (Segers *et al.*, 1995). Aunque de acuerdo con St. Leger *et al.* (1997); el número y tipo de proteasas son hasta cierto punto dependientes de la cepa.

Las subtilisinas comprenden el mayor componente de las proteasas en los hongos entomopatógenos, nematófagos y patógenos de humanos y se encuentran en múltiples isoformas en un mismo aislado fúngico. El espectro de las isoformas de las subtilisinas podrían habilitar a un patógeno facultativo, por ejemplo *M. anisopliae*, para explotar un amplio espectro de sustratos y poder estar involucrado en el cambio de una fase saprobia a una patogénica, constituyendo así, un factor de virulencia preformada (Casadevall *et al.*, 2003; Bidochka y Melzer, 2000), como las proteasas aspárticas secretadas de *C. albicans*, las cuales están reguladas diferencialmente y distintos miembros de una familia de proteasas, son expresados bajo una variedad de condiciones de crecimiento en laboratorio y durante infecciones experimentales *in vivo* e *in vitro* (Hube y Naglik, 2001). Las subtilisinas de *M. anisopliae* están

intrincadamente relacionadas a las capacidades de las cepas para penetrar, colonizar y macerar los tejidos de los insectos hospedantes, y los hongos están bajo presión evolutiva para responder a los hospedantes que podrían presentar cambios para tener una barrera contra la infección (Bagga *et al.*, 2004).

La proteasa Pr1 es una hidrolasa muy alcalina y posee una especificidad primaria muy amplia por los aminoácidos con un grupo lateral hidrofóbico en el segundo átomo de carbono (fenilalanina, metionina y alanina), pero también posee una especificidad secundaria por los péptidos hidrofóbicos. Es una buena proteasa general con actividad contra un espectro de proteínas (caseína, elastina, albúmina sérica bovina, colágeno) y frente a la cutícula de los insectos (Braga *et al.*, 1994). Peptidasas análogas han sido encontradas en filtrados de cultivo de *B. bassiana*, *V. lecanii*, *N. rileyi* y *A. aleyrodis* (Charnley y St Leger, 1991). Pr1 es una enzima inducible, y está sujeta a nivel transcripcional a un mecanismo de represión-inducción por carbono y nitrógeno. Se ha identificado un gen, *crr1*, que muestra una homología de secuencia significativa al gen represor de catabolitos de carbono (*crea*) de *Aspergillus nidulans* (Screen *et al.*, 1997).

La proteasa Pr1 ocurre como múltiples isoenzimas (Joshi *et al.*, 1997) y se han identificado a la fecha once genes que codifican para isoformas de Pr1 (Pr1A- Pr1J, Pr1G-K) (Freimoser *et al.*, 2003). Éstos fueron detectados en una base de datos de EST, indicando que todos son expresados y presumiblemente funcionales. La presencia de un número excepcionalmente grande de isoenzimas de subtilisina está presumiblemente relacionado a la patogenicidad de *M. anisopliae*. Las únicas funciones conocidas de las subtilisinas secretadas están relacionadas con la

obtención de nutrimentos a partir de la cutícula y la apertura de las barreras del hospedante. La cantidad de enzimas producidas se incrementa enormemente durante la penetración del insecto. La presión selectiva para la capacidad de producir grandes cantidades de subtilisinas en poco tiempo puede ser suficiente para explicar el mantenimiento de los múltiples genes de subtilisina en el genoma de *M. anisopliae*. Las múltiples Pr1, podrían, sin embargo, haberse separado para realizar diferentes funciones, presumiblemente, diversas subtilisinas podrían jugar diferentes papeles en la patogénesis, incrementando la adaptabilidad y el espectro de hospedantes o tener diferentes funciones en la sobrevivencia fuera del hospedante (Bagga *et al.*, 2004).

La proteasa Pr2 es una tripsina de *M. anisopliae* que se presenta como múltiples isoenzimas (Cole *et al.*, 1993), con gran actividad contra proteínas cuticulares solubilizadas y caseína (St. Leger *et al.*, 1987), pero poca actividad contra proteínas cuticulares unidas covalentemente (insolubles), debido probablemente a que no se adsorbe completamente a dichas proteínas. Se ha demostrado que las isoformas son parcialmente homólogas, lo que indica que son productos de diferentes genes, y los primeros cuatro aminoácidos terminales son idénticos a los de las tripsinas animales. Esto es consistente con lo asumido de que las enzimas de la familia de las tripsinas, quimiotripsinas y serín proteasas tiene un antecesor común con una especificidad tripsina por los residuos de arginina y lisina y que las enzimas de *M. anisopliae* y probablemente de otros entomopatógenos, como *V. lecanii*, *N. rileyi* y *A. aleoerodis* han retenido esta condición (St. Leger, 1995). Enzimas como Pr2 podrían estar involucradas en los mecanismos de control celular, catalizando

procesos proteolíticos específicos de activación e inactivación, y está aparentemente regulada por el nitrógeno presente en el medio de cultivo (Paterson *et al*, 1993). En este contexto, la inhibición de Pr2 de *M. anisopliae* por tiosil-lisina-clorocetona reprime selectivamente la formación de tubos germinales o estructuras de infección, implicando un papel de Pr2 en el control de la diferenciación (Chamley y St. Leger, 1991).

La regulación de Pr1 y Pr2 no son idénticas, aunque ambas son producidas rápidamente (<2 h) en cultivo por desrepresión de carbono y nitrógeno. En medio mínimo, la albúmina sérica bovina, que es una proteína soluble reprime la producción de Pr1, mientras que permite la síntesis aumentada de Pr2, además mientras que el nivel extracelular de Pr1 en medio mínimo excede el de Pr2, la reversa es dada por las actividades endocelulares. Un papel endocelular para Pr2, por ejemplo es la catálisis de la activación de procesos proteolíticos específicos. Probablemente esté menos sujeta que Pr1 a la represión por catabolitos. Los niveles extracelulares de Pr1 y Pr2 aumentaron en cultivos suplementados con cutícula de insecto y otros polímeros insolubles que fueron insuficientes para producir represión catabólica. La adición de metabolitos mas fácilmente utilizables como la glucosa o la alanina, reprimió la producción de proteasas extracelulares, lo que confirma su producción constitutiva pero reprimible (Chamley y St. Leger, 1991). Según Shimizu *et al.* (1993), el mecanismo de regulación de proteasas de *B. bassiana* es desencadenado por los mismos componentes cuticulares, ya que las proteasas se producen en menor cantidad, cuando al hidrolizar la cutícula del insecto dejan al descubierto la quitina de las mismas; probablemente las diferentes actividades enzimáticas (altas y bajas)

reflejan la actividad conjunta de diferentes proteasas, algunas de las cuales pueden estar apareciendo y desapareciendo conforme el hongo va degradando el sustrato (St. Leger *et al.*, 1987; Chul-Kang *et al.*, 1998).

Así, la síntesis de Pr1 en las estructuras de infección (apresorios) producidos en superficies artificiales o durante el crecimiento en la cutícula del insecto es anulado por la adición de nutrimentos fácilmente utilizables (Chamley y St. Leger, 1991). Se ha demostrado que Pr1 es la mayor proteína secretada cuando *M. anisopliae* produce apresorios contra el poliestireno o *in situ* durante la penetración de la cutícula de del hospedante (*Manduca sexta*). La síntesis durante la maduración de los apresorios y la producción de las clavijas de penetración excede por mucho la síntesis de otras proteínas (Chamley y St. Leger, 1991). Tal síntesis rápida de proteasas es sólo posible en los tejidos del hospedante donde la concertación de compuestos fácilmente metabolizables es baja, este es el caso con las cutículas de los insectos como los componentes grandemente insolubles hasta que son liberados por las enzimas degradadoras de cutícula, sin embargo, la represión podría operar si la liberación de los productos de degradación de la cutícula excede los requerimientos fúngicos. Esto fue confirmado por la adición de alanina al inóculo, lo que resultó en un crecimiento extensivo en la cutícula del insecto pero reprimió la penetración y la síntesis de Pr1 (Chamley y St. Leger, 1991). Así, el proceso patogénico que involucra morfogénesis relacionada a la infección y producción de enzimas ocurre sólo cuando es necesario para el patógeno establecer una relación nutricional con el hospedante (Chamley y St. Leger, 1991). Se ha aislado el gen *nrr1* (Screen *et al.*, 1997) que regula la respuesta al nitrógeno en *M. anisopliae*, ya que la

producción de Pr1 esta sujeta a la desrepresión por carbono y nitrógeno, y la producción de Pr1A está inducida específicamente por un componente cuticular no identificado (Screen *et al.*, 1997).

Quitinasas. Las otras enzimas consideradas como determinantes de patogenicidad son las quitinasas, debido a que la cutícula del insecto está compuesta de fibrillas de quitina cubiertas por proteína (Anderson, 1979). Al igual que con las proteasas, los hongos tienen un sistema quitinolítico que les permite entrar al hospedante. Las quitinasas pueden ser clasificadas en dos categorías mayores. La primera comprende a las endoquitinasas, que cuales cortan la quitina al azar en sitios internos, generando multímeros de N-acetilglucosamina (NAG) de bajo peso molecular tales como la quitotetraosa, quitotriosa y el dímero diacetilquitobiosa. La otra categoría son las exoquitinasas, que pueden ser divididas en dos subcategorías: las quitobiosidasas, que catalizan la liberación progresiva de diacetilquitobiosa comenzando en el extremo no reductor de la microfibrilla de quitina y las 1-4- β -N-acetilglucosaminidasas que cortan los productos oligoméricos de las endoquitinasas y quitobiosidasas generando monómeros de NAG (Cohen-Kupiec y Chet, 1998; Baratto *et al.*, 2003).

Se ha detectado actividad de quitinasa y exoquitinasa en bajos niveles en conidios y conidios germinantes en *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi* (Smith y Gula, 1983; Coudron *et al.*, 1984). La hidrólisis de la quitina cristalina dió sólo un producto de reacción de bajo peso molecular dentro de las primeras 24 h contra N-acetil-glucosaminidasa. La ausencia de oligómeros intermediarios entre los productos

de degradación de la quitina probablemente significa que la NAG es liberada directamente de la quitina insoluble. Ya sea debido a que la quitinasa tenga un componente que actúa de manera externa sobre la molécula de quitina; o bien la reacción procede de un mecanismo en cadena descrito para algunas otras endopolisacaridasas. Esto involucra la unión al azar de la enzima seguido por la liberación de monómeros o dímeros de los lados expuestos de la cadena, tal que una sola macromolécula es degradada completamente antes de que una nueva sea atacada. Tal mecanismo, especialmente si involucra la digestión simultánea de varias cadenas, podría resultar en la degradación rápida de las fibrillas de quitina y en adición producir monómeros par la nutrición y la inducción de síntesis posterior de enzimas (Charnley y St. Leger, 1991).

Kawachi *et al.* (2001), encontraron dos quitinasas en cultivos de *Isaria japonica* con quitina coloidal, que compartían homologías con las encontradas para *M. anisopliae* en un 66%, asimismo, a partir de cultivos de *P. lilacinus*, Khan *et al.* (2003) y Khan *et al.* (2004), encontraron seis quitinasas con actividad nematicida.

Se han caracterizado al menos seis quitinasas diferentes de *M. anisopliae*, pero sólo cuatro genes han sido identificados: *chit1* (Resi-Bogo *et al.*, 1998), *chi2*, *chi3* y *chi11*. Las seis quitinasas encontradas tienen un 66% de identidad con una quitinasa de *Trichoderma harzianum*. Una de dichas quitinasas (CHIT42) también tiene similitud con una de *A. nidulans*, sin embargo, este último no es un entomopatógeno y en este organismo la quitinasa es parte del sistema enzimático que actúa en el crecimiento celular, tal que es posible que CHIT42 de *M. anisopliae* actúe en el proceso de nutrición y crecimiento celular (Baratto *et al.*, 2003).

Otra enzima importante es la N-acetilglucosaminidasa, cuya actividad ha sido parcialmente purificada de filtrados de cultivo de *M. anisopliae* con quitina. La enzima mostró actividad substancial contra p-nitrofenolacetilglucosamina, así como contra quitobiosa, quitotriosa y quitotreosa, el mayor producto en cada caso fue N-acetilglucosamina, mostrando que la enzima es una N-acetilglucosaminidasa real mas bien que una quitobiasa. La enzima tuvo poca actividad contra quitina coloidal o cristalina, su tamaño es similar al de otras enzimas de otros organismos (Charnley y St. Leger, 1991).

También se encontró una enzima tipo quitosanasasa producida por *B. bassiana*, que además provoca melanización en *Galleria mellonella* (Fuguet *et al.*, 2004).

La síntesis de quitinasa en *M. anisopliae* y *B. bassiana* es regulada por productos de la degradación de la quitina a través de un mecanismo de represión-inducción. El sistema está mejor entendido en *M. anisopliae*. Alta actividad de quitinasa se encontró sólo en cultivos suplementados con quitina, pero no con otros productos tales como pectina, xilano y celulosa. Se demostró que el inductor más efectivo de la quitinasa fue la NAG, aunque la glucosamina también permitió la producción. Esto posiblemente se debe a una adaptación ya que la quitina de fuentes naturales (incluyendo la cutícula de los insectos) parece estar parcialmente desacetilada. En *M. anisopliae*, la quitobiosa podría funcionar como un inductor mayor de la quitinasa, de manera análoga a la celobiosa para la celulasa. La N-acetilglucosaminidasa podría degradar la quitina a NAG, sin embargo, el mayor producto de la actividad de quitinasa es NAG. Interesantemente, la NAGasa fue

producida constitutivamente y fue muy poco afectada por la represión catabólica (Charnley y St. Leger, 1991).

Otras enzimas. Se han reportado quimi tripsinas, metaloproteasas, aspartilproteasas, aminopeptidasas, X-prodipeptidil aminopeptidasas y carboxipeptidasas para *M. anisopliae* (Freimoser *et al.*, 2003).

Toxinas

Otro de los mecanismos que se ha reportado en la infección de los insectos, es la producción de toxinas, aunque su papel en el desarrollo de las micosis *in vivo* ha sido discutido (Ferron *et al.*, 1991). Existen evidencias de cepas de *M. anisopliae* que al perder el gen que codifica para Pr1A y Pr1B por mutación, pierden también la capacidad de producir destruxinas (Wang *et al.*, 2003). Las toxinas, de manera general, se definen como productos de los microorganismos, de bajo peso molecular y activos a bajas concentraciones. Los hongos secretan un amplio arreglo de compuestos con actividad biológica contra otros organismos, principalmente productos de un metabolismo secundario, los cuales se originan como derivados de varios intermediarios en el metabolismo primario, como el de aminoácidos, síntesis de poliquétidos, polisacáridos y peptidopolisacáridos entre otros (Vey *et al.*, 2001).

Las especies más estudiadas de hongos entomopatógenos en cuanto a producción de toxinas son *M. anisopliae*, *B. bassiana* y en menor grado *P. fumosoroseus*, *V. lecanii* e *Hirsutella* spp. Esos hongos secretan un arreglo de metabolitos secundarios (Tabla 1), algunos de los cuales están restringidos a géneros específicos, mientras que otros son más ubicuos (Vey *et al.*, 2001).

Tabla 1. Metabolitos selectos de algunos hongos importantes como agentes de control biológico (Modificado de Vey et al., 2001).

Agente	Objetivo principal	Metabolitos producidos in vivo y/o in vitro
<i>Metarhizium anisopliae</i>	insectos	Destruxinas (>27 tipos), swainsonona, citocalasina C
<i>Beauveria bassiana</i>	insectos	Bassianina, beauvericina, bassianolido, beauverolido, tenelina
<i>Beauveria brongniartii</i>	insectos	Oosporeina
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	insectos	Beauvericina, beauverolidos, pindina-2,6-ácido dicarboxílico
<i>Verticillium lecanii</i>	insectos	Ácido dipicolínico, ácido hidroxicarboxílico, ciclosporina
<i>Tolypocladium spp.</i>	insectos	Ciclosporina, efraeptinas (cinco tipos)
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Insectos y ácaros	Hirsutelina A, hirsutelina B, phomalactona
<i>Fusarium spp.</i>	Hongos, insectos, hierbas	Triotecanos, beauvericina, naftazarinas (ej. fusarubina y anhidrofusarubina), ácido fusárico

Beauvericina, bassianolida y beauverolida. La beauvericina es un hexadepsipéptido, previamente aislado del hongo entomopatógeno *Beauveria spp.* y *Paecilomyces spp.* y los hongos patógenos de plantas *Fusarium spp* y *Polyporus fumosoroseus* (Vey et al., 2001).

La beauvericina es estructural y funcionalmente similar a las eniantinas A, B y C, antibióticos dañinos para las membranas. Difiere de esos compuestos con respecto a los ácidos N-metilamino. La beauvericina forma complejos con el sodio y el potasio llevando a una permeabilidad incrementada de las membranas naturales y artificiales. La beauvericina muestra actividad antibiótica contra varias bacterias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micobacterium phlei*, *Sarcinea luta*,

Staphylococcus aureus y *Streptococcus faecalis*, además, la beauvericina tiene propiedades insecticidas moderadas (Vey *et al.*, 2001).

La bassianolida, induce síntomas atóxicos en larvas del gusano de seda alimentados con dietas artificiales que contienen pequeñas cantidades de este compuesto, pero es letal a altas dosis. La bassianolida, como la beauvericina es un antibiótico ionofórico pero difiere en su reacción a diferentes cationes (Vey *et al.*, 2001).

Las especies de *Beauveria* y *P. fumosoroseus* también producen beauverolidas, que son péptidos estructuralmente relacionados a la beauvericina y a la bassianolida (Vey *et al.*, 2001; Jegorov *et al.*, 1994). La basianina y la tenelina (dos toxinas no peptídicas) también han sido aisladas de especies de *Beauveria* (Vey *et al.*, 2001).

Dimorfismo fúngico

Otra estrategia de infección en los hongos entomopatógenos es el dimorfismo, que es la capacidad de producir células levaduriformes aisladas (tipo blastosporas) o formas filamentosas (hifas y pseudohifas) (Charnley y St. Leger, 1991). Se ha sugerido que ambas, las células levaduriformes y filamentosas participan en la patogénesis (Mitchell, 1998), ya que una vez que el hongo penetra la cutícula del hospedante, la multiplicación fúngica tiene lugar a través de cuerpos hifales o blastosporas (Altre y Vandenberg, 2001). Esta fase levaduriforme se ha observado en *B. bassiana* cuando infecta ácaros y lepidópteros (Alves *et al.*, 2002), y se ha obtenido en diversos hongos, incluyendo a *P. fumosoroseus* en condiciones de

cultivo sumergido (Jackson *et al.*, 1997). Las blastosporas, han sido descritas por varios autores (Samsinakova, 1966; Bidochka *et al.*, 1987; Rombach, 1989; Jackson *et al.*, 1997; Zhi-Gang *et al.*, 1999) y han sido definidas como esporas asexuales, generadas por división esquizoítica, ya sea en el septo de las hifas, o por fragmentación mecánica de las mismas, también pueden ser producidas por las hifas mediante la producción de una estructura semejante a una levadura (Rombach, 1989). Dichas estructuras son similares a aquellas encontradas cuando los hongos crecen en la hemolinfa de los insectos (Jackson, 1997).

Dichos propágulos se han estudiado para fines de obtención masiva de unidades infectivas, ya que los procesos de cultivo sumergido tienen ventajas sobre la producción de conidios en fermentación en estado sólido, tales como la reducción del tiempo de la producción de propágulos y una tasa de germinación rápida en la cutícula del insecto (Vidal *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1999; Altre y Vandenberg, 2001). Poco se sabe acerca de los factores que regulan el desarrollo de los hongos entomopatógenos en la hemolinfa del insecto, ni de la morfología que adquieren al interior del hospedante. Sin embargo, la pérdida de virulencia en *N. rileyi* ha sido correlacionada con la ausencia de una fase levaduriforme (Alves *et al.*, 2002). Este último fenómeno se ha demostrado con *P. farinosus* cuando infecta al gusano cogollero, ya que las blastosporas de los aislados menos virulentos no proliferan tan rápidamente como aquellas del aislado más virulento; además, las blastosporas producidas *in vivo*, aparentemente evaden el reconocimiento por parte de los hemocitos (Altre y Vandenberg, 2001).

La variabilidad fenotípica entre el estado micelial y el estado levaduriforme en los hongos patógenos se ha correlacionado con la virulencia. Hasta hace poco se han revelado los mecanismos genéticos y moleculares que intervienen en ello. En *Paracoccidioides brasiliensis*, un patógeno de mamíferos, la variabilidad fenotípica y el cambio de forma representa modificaciones programadas y controladas, más que cambios producidos al azar (San-Blas, *et al.*, 2000). Una posible explicación para el cambio de forma, desde el punto de vista energético, es que las blastosporas podrían estar acumulando reservas endógenas, mientras crezcan en un medio que le da todos los nutrientes para desencadenar la germinación. Esos propágulos al no ser dependientes del ambiente nutrimental externo para una rápida germinación, conferirían a los aislados cierta virulencia aumentada debido probablemente a que las reservas energéticas acumuladas podrían ser utilizadas una vez que el hongo se encuentra en el hospedador (Vega *et al.*, 1999). En otro patógeno humano, *Histoplasma capsulatum* se ha clonado el gen *yps3* de la fase levaduriforme (Keath *et al.*, 1989), forma parasitaria del hongo en humanos. Dicho gen se expresó en aislados virulentos y no se expresó en aislados avirulentos. Además se han identificado vías de señalización dependientes del AMP cíclico para controlar el cambio morfológico durante la infección. Un incremento en la concentración de AMP cíclico tiene efectos diferenciales en *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* (Borges-Walmsley, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Una alternativa para el uso de plaguicidas químicos contra la mosquita blanca, que es una de las principales plagas insectiles en México, son los hongos entomopatógenos reguladores poblacionales naturales; entre los que se encuentra *Paecilomyces fumosoroseus*. Para mejorar la aplicación de este agente microbiano y aumentar su utilización masiva en el contexto de un manejo integrado de plagas, es necesario conocer la biología básica de dicho hongo entomopatógeno. Entre los puntos relevantes, están los mecanismos de infección ya que en etapas posteriores, esto permitiría coleccionar y seleccionar aislados que mostraran características fundamentales para el control de la plaga. Además, es importante describir la relación hospedante/parásito *in vivo*. La presente investigación se planteó para estudiar *in vitro* algunos de los factores de patogenicidad, concretamente, las enzimas que intervienen en la degradación de la cutícula del insecto. Otro aspecto estudiado fue la transición de conidio a diferentes propágulos del hongo, para posteriormente observar la relación hospedante parásito *in vivo* con la prueba de índice de crecimiento y desarrollo fúngico en tres aislados de *P. fumosoroseus* (EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3, de alta, mediana y baja virulencia expresada como CL₅₀ respectivamente). La observación de la penetración y formación de estructuras fúngicas en la superficie del insecto con dos aislados (EH-506/3 y EH-520/3) y el análisis ultraestructural con inmunocitoquímica para quitinasas con el aislado más virulento (EH-506/3), permitió hacer una aproximación al modelo teórico propuesto

para la penetración de los hongos entomopatógenos, tomando como base el binomio *P. fumosoroseus*/mosquita blanca.

HIPÓTESIS

Los aislados de *P. fumosoroseus* capaces de producir rápidamente *in vitro* las proteasas y quitinasas indispensables para la penetración del insecto, así como de completar la transición de conidio a blastospora, son más virulentos en el modelo de infección *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Demostrar la rapidez y eficiencia tanto en la producción de proteasas y quitinasas en sustratos sintéticos específicos e *in vivo*, y su relación con la transición de conidios a diversos propágulos, como blastosporas y la virulencia, medida por el índice de crecimiento y desarrollo fúngico, de aislados de *P. fumosoroseus*.

Objetivos particulares

- Llevar a cabo estudios cinéticos en cultivo sumergido de los aislados seleccionados en medios que induzcan la producción de proteasas
- Determinar la actividad enzimática de las proteasas de *P. fumosoroseus* contra los sustratos específicos (péptidos) de proteasas tipo tripsina y tipo subtilisina.
- Determinar la actividad enzimática de las quitinasas de *P. fumosoroseus* contra quitina coloidal.
- Realizar estudios cinéticos de la transición conidio-blastosporas *in vitro* de los aislados.
- Infectar ninfas de mosquita blanca con cada uno de los aislados y detener a diferentes tiempos para seguir el desarrollo de la penetración fúngica mediante la aplicación del índice de crecimiento y desarrollo fúngico (ICDF).

- Detener la infección a diferentes tiempos, y preparar las muestras para microscopía de barrido (MEB) y electrónica de transmisión (MET).
- Observar la adhesión de los conidios del hongo y formación de estructuras, en la superficie de la cutícula del insecto por MEB.
- Realizar el análisis ultraestructural convencional y con inmuno-oro de *P. fumosoroseus* en su hospedante, la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae).
- Observar la presencia de blastosporas por MET en el hemocele del insecto, a los diferentes tiempos de infección.
- Detectar la presencia de quitinasas en las estructuras penetrantes con inmuno-oro.

METODOLOGÍA

AISLADOS FÚNGICOS

Se utilizaron tres cultivos monospóricos de *P. fumosoroseus* (Cavallazi *et al.*, 2000) provenientes del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (SAGARPA), Tecomán Colima. Los cultivos monospóricos EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3, obtenidos de los aislados originales PFCAM, MBP y MBP1 respectivamente, fueron seleccionados por su grado de virulencia (expresada como la CL_{50}) a partir de un estudio previo (Castellanos-Moguel *et al.*, 2001b). EH-506/3, además de ser altamente virulento tiene una actividad proteolítica alta; EH-503/3, es muy virulento con actividad quitinolítica alta y EH-520/3, es poco virulento con actividad de proteasas y quitinasas intermedia. Todos los aislados se mantuvieron en agar de glucosa Sabouraud (Bioxón, México).

Preparación y conteo de inóculo

Los conidios para los estudios de cinética enzimática, transición conidio-blastospora, índice de crecimiento y desarrollo fúngico (IDCF) y análisis ultraestructural se extrajeron con Tween 80 al 0.05%, a partir de colonias de siete a once días de incubación a 28°C. La concentración final de conidios fue ajustada a 1×10^6 /ml y el conteo se hizo con una cámara de Neubauer.

ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Proteasas

Condiciones de cultivo

Para producir proteasas en cultivo sumergido se utilizó el medio H (en g/l: sacarosa 10; glucosa 5; peptona 0.5; extracto de levadura 15) adicionado de caseína (Sigma) al 1%. Se utilizaron matraces de 250 ml con 70 ml de medio de cultivo, los cuales fueron sembrados con una suspensión de conidios de 1×10^6 /ml. Los matraces se incubaron en agitación orbital a 28 °C. A las 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 168, 216, 240, 264 y 312 h después de la siembra, se tomó una alícuota de 5 ml de cada matraz y se centrifugó, colectando y congelando el sobrenadante para su ensayo enzimático posterior.

Determinación de la actividad de proteasas totales

La actividad de las proteasas se determinó con el método de la azocaseína, sustrato cromogénico que al ser hidrolizado libera un colorante naranja que absorbe fuertemente a una longitud de onda de 440 nm. Este método permite detectar la actividad de la mayoría de las proteasas presentes en el sobrenadante del cultivo (Sarath *et al.*, 1989). Para este ensayo, se disolvió la azocaseína al 2% en regulador de fosfatos 0.2 M, pH 7. Se colocaron en un tubo de microcentrifuga 250 μ l de sustrato y 150 μ l de enzima, los cuales se incubaron a 25°C por una hora. Posteriormente, se detuvo la reacción con 1.2 ml de ácido tricloroacético al 10% y se dejó reposar por 15 min, después se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min, y a 1.2

ml del sobrenadante obtenido se le agregaron 1.4 ml de hidróxido de sodio 1.0 M. Después se leyó la absorbencia a 440 nm. La actividad está expresada en unidades, siendo una unidad la cantidad de enzima que origina un cambio en la absorbencia de 0.010 a 440 nm (Sarath *et al.*, 1989).

Determinación de la actividad proteasas tipo tripsina (Pr1) y tipo subtilisina (Pr2)

Se probó la especificidad de las proteasas producidas por los aislados estudiados contra los sustratos comerciales Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na y Bz-Phe-Val-Arg-pNa (Sigma), los cuales son hidrolizados por Pr1 (subtilisina) y Pr2 (tripsina) respectivamente. Los ensayos consistieron en colocar en un tubo de ensayo 50 μ l de extracto enzimático crudo y 900 μ l de regulador Tris 0.1M, pH 8 (PBS, México). Dicha mezcla se dejó equilibrar por 10 min en un baño metabólico a 23°C y posteriormente se colocó en una celda de espectrofotómetro (Beckman, DU-600), agregándole 50 μ l de sustrato 1 mM. La actividad se expresó en unidades, siendo una unidad la cantidad de enzima que origina un cambio de 0.001 en la absorbencia a 410 nm durante un minuto (Gillespie *et al.*, 1998).

Para el montaje de la técnica, se trabajó primeramente con un aislado, EH-506/3, con las condiciones de reacción establecidas para las enzimas tipo subtilisina (Pr1) y tipo tripsina (Pr2) de *M. anisopliae* (Gillespie *et al.*, 1998). Se disolvió el sustrato sintético para Pr1 (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na) en amortiguador Tris-HCl o en Tris, y la mezcla de reacción de la enzima se equilibró a 23°C, y se incubó a

diferentes tiempos: de 1 a 5 min directamente en la celda del espectrofotómetro (Gillespie *et al.*, 1998).

Quitinasas

Preparación y tinción del sustrato

Para inducir la producción de quitinasas, se utilizó quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol (Gómez-Ramírez, 2000). Dicho sustrato se preparó a partir de quitina comercial en hojuelas (Sigma, México), la cual se molió en un molino Wiley con una luz de malla de 40. Por cada 10 gramos de quitina se agregaron 100 ml de H₃PO₄ al 85% (Baker, México) y se mezclaron agitando manualmente, para mantenerla posteriormente en refrigeración por 24 h. Después se le agregó agua en exceso para hacerla coloidal, y se filtró a través de gasa para eliminar la acidez. Para teñirla, se colocaron en un vaso de precipitado 7 g de quitina coloidal y 0.23 g de azul brillante de remazol (Sigma) previamente disuelto en agua; la mezcla se calentó a ebullición durante una hora, luego se filtró y lavó con agua fría y caliente hasta que ya no salió color. Se escurrió y se fijó con 0.075 g de dicromato de sodio (Sigma) y 0.075 g de tartrato de sodio y potasio (Baker) por cada 5 g de quitina coloidal. La mezcla se dejó hervir por 10 min y se lavó nuevamente. Se esterilizó en autoclave a 121°C y se refrigeró hasta su uso (Gómez-Ramírez, 2000).

Condiciones de cultivo

Las quitinasas se produjeron en medio sintético (en g/l: cloruro de sodio 0.25 fosfato monobásico de potasio, 0.375; carbonato de sodio, 0.375; sulfato de

magnesio 0.275) (Chávez-Camarillo y Cruz-Camarillo, 1984), adicionado con quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol (Gómez-Ramírez, 2000); utilizando las mismas condiciones de cultivo que para la producción de proteasas. A las 0, 24, 72, 120, 168, 216, 264 y 312 h se tomó una alícuota de cinco ml de cada matraz y se centrifugó, para leer el sobrenadante a 595 nm (Gómez-Ramírez *et al*, 2004) y obtener la actividad enzimática.

Determinación de la actividad de quitinasas

La actividad de quitinasas se determinó al leer la absorbencia de los cultivos de *P. fumosoroseus* en medio sintético adicionado con 2% de quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol. Este sustrato, al ser cromogénico, libera el colorante unido a la quitina durante la hidrólisis de la misma, y la actividad se expresa en unidades, siendo una unidad la cantidad de enzima que origina un cambio en la absorbencia de 0.01 a 595 nm (Gómez-Ramírez, 2000).

Actividad específica de proteasas y quitinasas

Para calcular la actividad específica de todas las enzimas ensayadas en los sobrenadantes de todos los medios de cultivo utilizados, se determinó la cantidad de proteína soluble en los mismos, utilizando el método de Bradford (1976), el cual se basa en la unión de un colorante a las proteínas. Dicho complejo tiene su máxima absorbencia a 595 nm, y las lecturas son proporcionales a la concentración de proteína, los datos obtenidos se interpolaron en una curva tipo de albúmina sérica

bovina. Para este ensayo se mezcló 1 ml de sobrenadante con 1 ml de reactivo de Bradford y se leyó la absorbencia a 595 nm.

DIMORFISMO FÚNGICO

Cinética de la transición conidio-blastospora *in vitro*

Para la observación de la transición conidio-blastospora se utilizaron los mismos medios y en las mismas condiciones de cultivo usadas para la producción de enzimas, esto es, matraces de 250 ml con 70 ml de medio H adicionado con caseína al 1% o bien, medio sintético adicionado con quitina coloidal sin teñir al 2%, los cuales fueron sembrados con una suspensión de conidios de 1×10^6 /ml, y mantenidos a 28°C con agitación orbital a 150 rpm. A las 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 168, 216, 240 y 312 h después de la siembra se tomaron alícuotas de 3 ml de cada matraz y se observaron al microscopio, midiendo el largo y ancho de por lo menos 30 estructuras, con un microscopio Olympus BX-40 con un objetivo graduado a 40x. También se realizó un registro gráfico de los propágulos con una cámara Olympus PM-C35 y una unidad de control de exposición Olympus PM20. La transición fúngica se registró de acuerdo con el esquema de clasificación de Bidochka *et al.* (1987), con ligeras modificaciones. Este esquema comprende seis estados de desarrollo (ED): conidios no hinchados (I), conidios hinchados (II), tubo germinal emergiendo (III), alargamiento del tubo germinal y formación del primer septo (IV), alargamiento (crecimiento) polar y bipolar del micelio resultante e iniciación de una blastospora (V) y desprendimiento de la blastospora (VI). Se calculó la relación largo/ancho de todos los propágulos medidos.

DETERMINACIÓN DE VIRULENCIA

Insectos

Para la determinación del índice de crecimiento y desarrollo fúngico (ICDF) y la microscopía electrónica de barrido y de transmisión, se utilizaron ninfas de mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), obtenidas de folíolos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) o bien hojas de aretillo (*Fuchsia spp.*) infestados con dicho insecto. Para las pruebas de microscopía electrónica se seleccionaron ninfas de estadio dos y tres, mientras que para el índice de crecimiento y desarrollo fúngico, se trabajó con ninfas de cuarto estadio (García-Juárez *et al.*, 1999), en todos los casos, los insectos tenían un aspecto turgente y transparente, indicador de que estaban sanos. Para todos los ensayos *in vivo*, se cortaron discos en los folíolos que contenía las ninfas, y se desinfectaron sumergiéndolos en las siguientes soluciones: alcohol al 70% (2 seg), agua destilada (40 seg), hipoclorito de sodio al 2.5% (20 seg) y tres lavados con agua destilada de 40 seg cada uno, para luego dejar secar en un papel filtro estéril (Vidal *et al.*, 1996).

Determinación del índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico

Una vez desinfectadas, se seleccionaron 25 ninfas en cuarto estadio, las cuales fueron depositadas en cajas de Petri de 3.5 cm de diámetro que contenían agar-agua (23g/l). Una suspensión conidial de 1×10^6 conidios/ml de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 fue utilizada para la infección, la cual consistió en depositar 3 μ l de dicha suspensión en cada ninfa. Las cajas se incubaron a 28°C y

con un fotoperiodo de 16:8 (luz-oscuridad). Posteriormente se hicieron observaciones a las 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h, que fueron los mismos tiempos que la cinética de transición de conidio-blastospora, y se tomaron fotografías para seguir el desarrollo de los conidios. El desarrollo fúngico en el insecto fue evaluado con base en una escala de 0 a 3.0, y comparado con ninfas testigo, las cuales fueron cubiertas solamente con tween 80 al 0.05% estéril. El ICDF correspondió a la siguiente escala: 0.0= ninfa rodeada de conidios no germinados; 0.5= germinación de conidios con uno o dos tubos germinales en el área cercana a la ninfa; 1.0= crecimiento de tubos germinales y presencia de hifas; 1.5= crecimiento inicial de hongo orientado al insecto y primer contacto de las hifas con la ninfa; 2.0= crecimiento micelial dentro y en la superficie y área alrededor de la ninfa; 2.5= inicio de la esporulación, conidios que cubren la superficie de la ninfa, 3.0= esporulación completa, ninfa cubierta con micelio y conidios del hongo (García-Juárez *et al.*, 1999).

Pruebas de infección *in vivo* para microscopía electrónica

Una vez seleccionadas y limpias, las ninfas se infectaron con la suspensión de conidios de EH-506/3 (aislado mas virulento) o de EH-520/3 (aislado menos virulento), permitiendo que la parte del foliolo que contenía las ninfas (envés), tuviera contacto con los conidios durante 1 min, para después secar al aire. El disco se colocó en cajas de Petri estériles con medio KNOP (en g/l: nitrato de potasio, 0.125g; nitrato de calcio, 0.500; sulfato de magnesio, 0.125; fosfato de potasio, 0.125 y agar 23) para evitar el marchitamiento de los discos recortados de los foliolos, o bien se utilizó también una variante metodológica muy semejante a la descrita para el ICDF,

ya que a las ninfas previamente desinfectadas, se pasaron a cajas de Petri de 3.5 cm de diámetro que contenían agar-agua (60 g/l) y se les infectó con 3 μ l de una suspensión de 1×10^6 conidios/ml. Las cajas se incubaron a 26 \pm 2°C a una humedad relativa de 60% y un fotoperiodo de 16:8 h. Inmediatamente y después de la infección se tomaron muestras a 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 96, 120 y 168 h. Las ninfas infectadas se fijaron y procesaron para el estudio ultraestructural.

Inmuno-oro ultraestructural con anticuerpo biotinilado

Para observar la producción *in situ* de quitinasas en el proceso de infección del hongo en la mosquita blanca, se utilizó una metodología inmunocitoquímica con MET.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal contra aglutinina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés), la cual es una lectina con alta afinidad hacia trisacáridos de N-acetil-D-glucosamina (componente de la quitina) (Boyer, 2000). Dicha lectina, comparte un epítipo con la heveína, la cual es una quitinasa de tipo dos, producida por *Hevea brasiliensis*. Las quitinasas de tipo dos, han sido identificadas en muchos microorganismos (Cohen-Kupiec, y Chet, 1998).

En este ensayo, las quitinasas, al actuar sobre la cutícula de los insectos, liberaron oligómeros de quitina, entre ellos, trisacáridos de N-acetil-D-glucosamina, a los cuales se unió la WGA, y posteriormente el anticuerpo biotinilado. A ese anticuerpo se unió estreptavidina-oro y fue lo que permitió observar en la MET, las marcas de oro coloidal.

El anticuerpo monoclonal fue proporcionado por el Dr. Edgar Zenteno y la Dra. Conchita Agundis del Laboratorio 6 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Para la técnica de biotinylación del anticuerpo, primero se precipitaron gammaglobulinas del suero sanguíneo murino con una solución saturada de sulfato de amonio. Dicho procedimiento se repitió tres veces y posteriormente se dializó extensivamente contra solución salina al 0.9 %. Se centrifugó y se determinó la cantidad de proteína utilizando el método de Bradford (1976). Se ajustó la concentración de anticuerpos a una solución de 1 a 3 mg/ml en amortiguador de borato de sodio 1 M, pH 8.8. A esta solución se adicionó la biotina (N-hidroxisuccinimida-biotina, Sigma), en una concentración de 25 µg por cada mg de anticuerpo. Se mezcló y se dejó incubar por cuatro h a temperatura ambiente. Posteriormente, a la solución se le agregaron 20 µl de cloruro de amonio 1 M por cada 250 µg de biotina. Se incubó 10 min a temperatura ambiente, y luego se dializó extensivamente contra amortiguador de borato de sodio pH 8.8 1 M (Harlow y Lane, 1988). Para corroborar la biotinylación del anticuerpo, se hizo un ensayo de DOT-ELISA con avidina-peroxidasa. Este método se basa en el cambio de color producto de una reacción de óxido-reducción, cuando se une la avidina con el anticuerpo.

Técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB)

Para la fijación se utilizó glutaraldehído al 2.5 % en regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 por 48 h a 4° C. Luego se pasó a glutaraldehído al 3 % en el mismo regulador, 3 h a 4° C.

La posfijación se realizó con tetróxido de osmio al 1 % en regulador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, 3 h a 4° C (para las muestras destinadas a MET convencional y MEB). Entre fijación y posfijación se hicieron lavados con el mismo regulador, tres veces de cinco min cada uno. Se procedió a la deshidratación con diferentes concentraciones de etanol, y la desecación por punto crítico en cámara de CO₂. Se montaron en cilindros de aluminio con pasta de plata y se cubrieron con carbón y oro ionizados (MEB).

Se realizaron cortes finos montados en rejillas de níquel (o de oro), se rehidrataron por flotación en PBS, 15 min a temperatura ambiente. Se bloqueó con PBS-ASB al 1%-Tritón X-100 0.1%, 1 h a temperatura ambiente en cama húmeda y se escurrió (no lavar). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo anti aglutinina de germen de trigo biotinilado en PBS 30 min a 23-24°C en cámara húmeda y se lavó con el mismo regulador de dilución 3 veces 5 minutos cada una. Luego se incubó en estreptavidina-oro y se lavó con PBS estéril a chorro con pipeta pasteur (40 ml por rejilla). Se realizó otro lavado con agua desionizada estéril a chorro; para posteriormente, se dejó secar, contrastar con uranilo y plomo y observar.

La inclusión de las muestras se hizo en araldita para MET convencional y en EPON 812 para estreptavidina-oro. Los cortes semifinos (1 micra) se realizaron con

cuchilla de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina acuosa al 1 %. Los cortes finos (100 nm) se hicieron con cuchilla de diamante y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato acuoso de manera habitual. Para observación de MEB se utilizó un microscopio DSM 950 y de MET un microscopio EM/10.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA $\alpha=0.5$), para las actividades de proteasa, el número de propágulos y el ICDF, seguido por una comparación múltiple de medias de Tukey (Dowdy y Wearden, 1983). Todos los análisis fueron hechos usando el programa SPSS, versión 10, 2003.

RESULTADOS

ESTUDIOS ENZIMÁTICOS

Proteasas totales

La producción, tanto de proteasas como de propágulos se realizó en medio H adicionado con caseína al 1%. La actividad proteolítica total, se detectó por el método de la azocaseína (Sarath *et al.*, 1989). Con esta determinación, se constató que existía algún tipo de proteasa en el sobrenadante del cultivo de *P. fumosoroseus*. Todos los aislados probados mostraron actividad, la cual se mantuvo baja durante las primeras 96 h del cultivo en los tres casos, a partir de este momento para EH-506/3, a las 120 para EH-503/3 y a las 168 h para EH-520/3 comenzó a elevarse. La máxima actividad, fue alcanzada por cada aislado a diferentes tiempos (Figura 4): EH-506/3 presentó 91 UP/ml a las 216 h y 99 UP/ml a las 312 h de incubación. EH-503/3 mostró una actividad de 67.2 UP/ml a las 240 h, pero ésta se elevó y alcanzó las 105.8 UP/ml a las 312 h de incubación. EH-520/3 exhibió una actividad de 49 UP/ml a las 216 h. Se observaron diferencias significativas de actividad ($P < 0.5$) en todos los tiempos (tabla 2) entre los tres aislados.

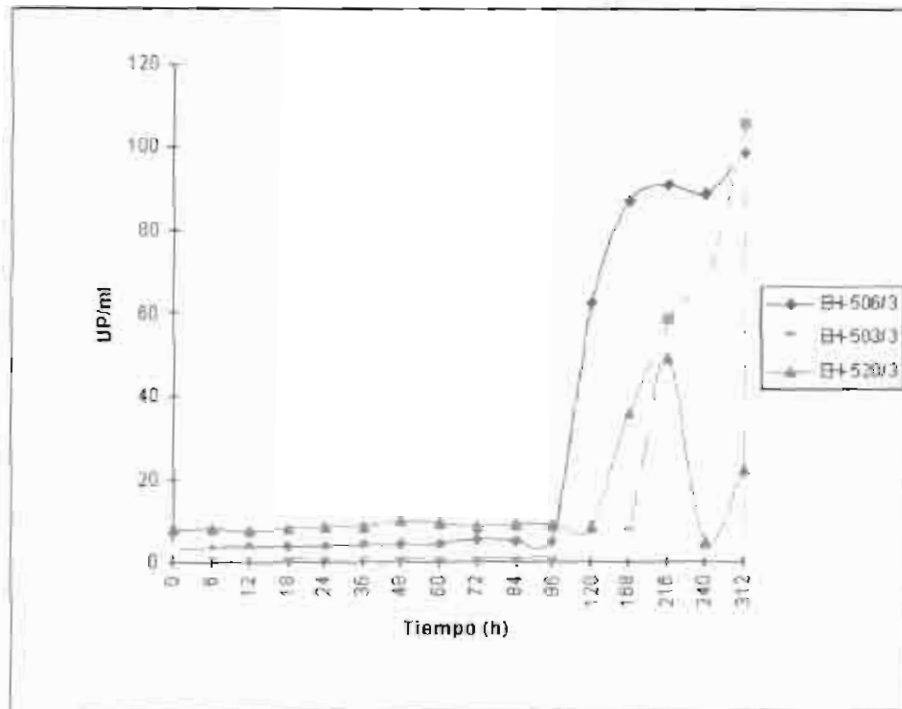


Figura 4 Actividad volumétrica de proteasas de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus* determinada por el método de la azocaseína.

En cuanto a la actividad específica (Figura 5), que es la actividad enzimática con respecto a la cantidad de proteína total presente en el sobrenadante del cultivo, se observó una tendencia semejante a la descrita anteriormente. Sin embargo, el máximo de actividad se observó a las 216 h para EH-506/3 y para EH-520/3, y hasta las 312 h para EH-503/3. En este caso, también pudo observarse una actividad baja durante las primeras 96 h de incubación. Se registraron ligeros aumentos de actividad a las 72 h para EH-506/3 y a las 60 h para EH-520/3.

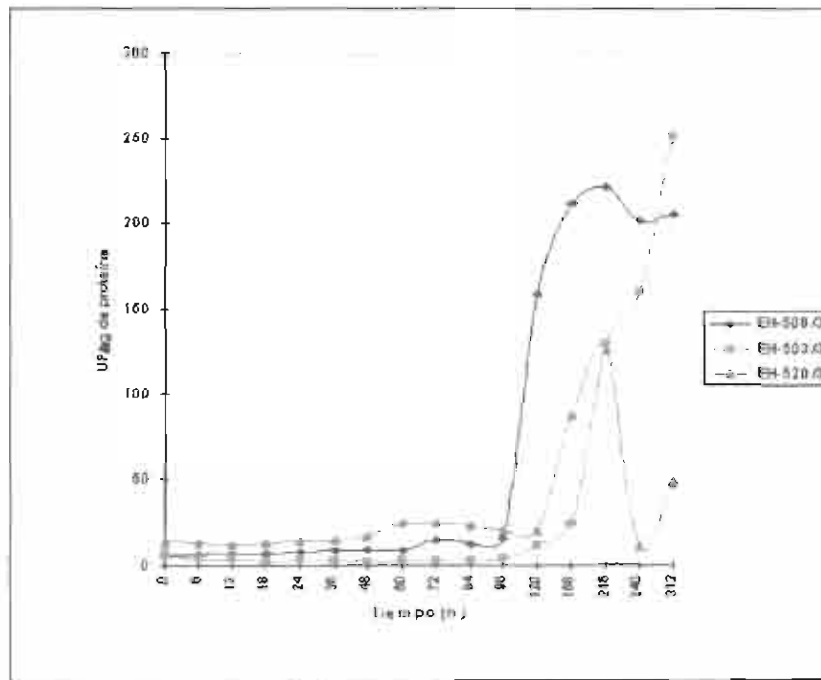


Figura 5. Actividad específica de proteasas (expresada como UP/ μ g de proteína total en el sobrenadante) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus*.

Tabla 2. Comparación de la actividad de proteasas totales de tres aislados de *P. fumosoroseus*

Tiempo	Unidades de proteasa (UP/ml)		
	EH-506/3	EH-503/3	EH-520/3
0	3.6 ^a	3.3 ^a	8.0 ^b
6	3.6 ^b	2.1 ^a	8.0 ^c
12	3.8 ^b	2.0 ^a	7.9 ^c
18	3.7 ^b	1.5 ^a	8.0 ^c
24	4.0 ^b	1.8 ^a	8.7 ^c
36	4.4 ^b	2.0 ^b	8.6 ^c
48	4.3 ^b	1.3 ^a	10.0 ^c
60	4.4 ^b	1.9 ^a	9.5 ^c
72	5.6 ^b	1.2 ^a	8.7 ^c
84	5.1 ^b	1.3 ^a	9.0 ^c
96	5.1 ^b	1.5 ^a	9.0 ^c
120	62.4 ^c	2.7 ^a	8.7 ^b
168	87.0 ^c	6.7 ^a	36.0 ^b
216	91.0 ^c	58.7 ^b	49.0 ^a
240	89.0 ^c	67.2 ^b	4.6 ^a
312	99.0 ^b	105.8 ^c	22.4 ^a

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes entre sí. En el análisis de valor crítico de comparación de rangos múltiples de Tukey, los promedios que comparten la misma letra en la misma línea, no son diferentes significativamente.

Estandarización de condiciones para la determinación de la actividad de proteasas tipo subtilisina (Pr1) y tipo tripsina (Pr2)

De acuerdo con los resultados obtenidos (tabla 3), se decidió utilizar amortiguador Tris 0.1 M, pH 8, y establecer el tiempo de incubación en 1 min.

Tabla 3. Comparación de la actividad de Pr1 obtenida con diferentes condiciones para la mezcla de reacción.

Tiempo (h)	UPr1/ml dependiendo del tiempo de reacción (min)									
	Tris					Tris HCl				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0	66	65	65	64	64	34	35	37	38	39
6	72	93	91	91	91	63	77	94	109	123
12	63	63	63	63	62	77	78	78	78	78
18	83	83	83	83	82	100	105	105	105	106
24	181	142	143	142	142	138	138	138	139	138
36	143	128	128	129	130	97	45	134	134	134
48	83	68	68	66	69	42	42	45	45	46
60	57	57	58	58	58	40	47	43	43	44
72	53	54	54	54	54	46	46	48	49	50
84	68	67	67	67	68	46	38	143	48	49
96	78	84	80	84	81	51	49	50	51	51
120	746	565	570	578	584	417	464	474	490	494
168	371	454	506	526	558	301	324	337	233	367
216	620	627	648	671	671	488	503	527	527	528
240	560	506	554	610	630	435	562	557	583	583
312	585	500	511	517	517	329	395	435	446	448

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes entre sí.

Determinación de la actividad de Pr1 y Pr2

Una vez establecidas las condiciones de reacción, se trabajó con los tres aislados, los cuales presentaron actividad tipo subtilisina (Pr1) y tipo tripsina (Pr2) (Figuras 6 y 7), bajo las condiciones experimentales mencionadas previamente. Algunos de los puntos mostraron diferencia significativa, entre los tres aislados, esos valores están señalados en la tabla 4.

Tabla 4. Actividad de proteasas Pr1 y Pr2 de aislados de *P. fumosoroseus*

Tiempo (h)	Actividad de Pr1 (UPr1/ml)			Actividad de Pr2 (UPr2/ml)		
	EH-506/3	EH-503/3	EH-520/3	EH-506/3	EH-503/3	EH-520/3
0	66.04 ^a	94.03 ^b	120.56 ^c	49.3 ^a	138.4 ^b	103.03 ^c
6	72.36 ^a	138.6 ^b	123.9 ^b	80.3 ^a	155.52 ^c	124.7 ^b
12	63.5 ^a	178.16 ^c	90.88 ^b	76.13 ^a	133.9 ^c	103.5 ^b
18	83.5 ^a	170.11 ^b	110.19 ^a	91.03 ^a	198.2 ^b	103.1 ^a
24	179.82 ^c	156.34 ^b	109.11 ^a	86.3 ^a	178.7 ^b	108.4 ^a
36	142.9 ^a	148.9 ^a	192.14 ^b	65.8 ^a	210.1 ^c	85.1 ^b
48	83.1 ^a	165.39 ^b	92.01 ^a	20.8 ^a	200.4 ^c	82.2 ^b
60	57.4 ^a	156.64 ^b	90.68 ^a	43.9 ^a	164.8 ^b	70.1 ^c
72	53.92 ^a	84.64 ^b	108.76 ^c	16.97 ^a	89.4 ^b	94.24 ^b
84	68.6 ^a	72.4 ^{a,b}	97.66 ^b	24.5 ^a	86.3 ^b	83.4 ^b
96	78.34 ^a	94.1 ^b	93.1 ^b	251.7 ^a	97.5 ^c	85.1 ^b
120	745.7 ^b	90.11 ^a	111.23 ^a	23.4 ^a	109.4 ^c	95.4 ^b
168	371.6 ^c	105.8 ^a	281.5 ^b	65.7 ^a	113.9 ^b	122.7 ^b
216	620.42 ^b	391.1 ^a	347.4 ^a	251.3 ^c	155.7 ^b	92.3 ^a
240	559.6 ^c	455.5 ^b	201.6 ^a	61.5 ^a	139.6 ^b	208 ^c
312	585.7 ^c	496.7 ^b	108.7 ^a	57.5 ^a	161.1 ^b	153.3 ^b

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes entre sí. En el análisis de valor crítico de comparación de rangos múltiples de Tukey, los promedios que comparten la misma letra en la misma línea no son diferentes significativamente.

Desde las 0 horas del experimento, todos los aislados mostraron actividad tanto de Pr1 como de Pr2 (Tabla 3), la cual fue de 49.3 UPr2/ml a 150.6 UPr1/ml. Se observaron diferencias significativas ($F_{2,24}=127.8$, $P<0.05$), para Pr1 y ($F_{2,24}=184.9$, $P<0.05$) para Pr2 entre los tres aislados estudiados.

En el caso de Pr1, a las 0, 12, 24, 72, 168, 240 y 312 h, se observó diferencia significativa entre los tres aislados. A las 6, 96, 120 y 216 h, la actividad de Pr1 de EH-506/3 fue estadísticamente diferente de los otros dos aislados. A las 18, 48 y 60 h, EH-506/3 y EH-520/3 no presentaron actividad de Pr1 estadísticamente diferente entre ellos, mientras que EH-503/3 en esos mismos tiempos de muestreo, formó un grupo aparte. A las 36 y 84 h, la actividad de EH-506/3 y EH-503/3 no fue

estadísticamente diferente entre sí, mientras que EH-520/3 formó un grupo aparte en ese tiempo de muestreo (Tabla 4).

La actividad de Pr2 de las 0 a las 12 h, mostró diferencia significativa entre los tres aislados, esto se volvió a observar de las 36 a las 60 h, a las 96, 120 216 y 240 h. A las 72, 84, 168 y 312 h, la actividad de Pr2 de EH-506/3 fue estadísticamente diferente de los otros dos aislados. A las 18 y 24 h, EH-506/3 y EH-520/3 no presentaron actividad de Pr2 estadísticamente diferente entre ellos, mientras que EH-503/3 en esos mismos tiempos de muestreo, formó un grupo aparte (Tabla 4).

Para los tres aislados, la actividad de Pr1 varió entre los 66 y las 192 UPr1/ml hasta las 96 h de incubación (Figura 6). En el aislado EH-506/3, la actividad de Pr1 comenzó a elevarse y alcanzó un máximo (745.7 UPr1/ml) a las 120 h, para después descender y elevarse nuevamente para alcanzar un segundo máximo de actividad (620.4 UPr1/ml) a las 216 h. La actividad de Pr1 en EH-503/3, comenzó a elevarse después de las 168 h y alcanzó un máximo (496.7 UPr1/ml) a las 312 h. La actividad más baja de Pr1 fue la detectada en el aislado EH-520/3 (347.3 UPr1/ml) a las 216 h (Figura 6).

La actividad específica, en general, mostró la misma tendencia que las actividades volumétricas antes descritas (Figura 7).

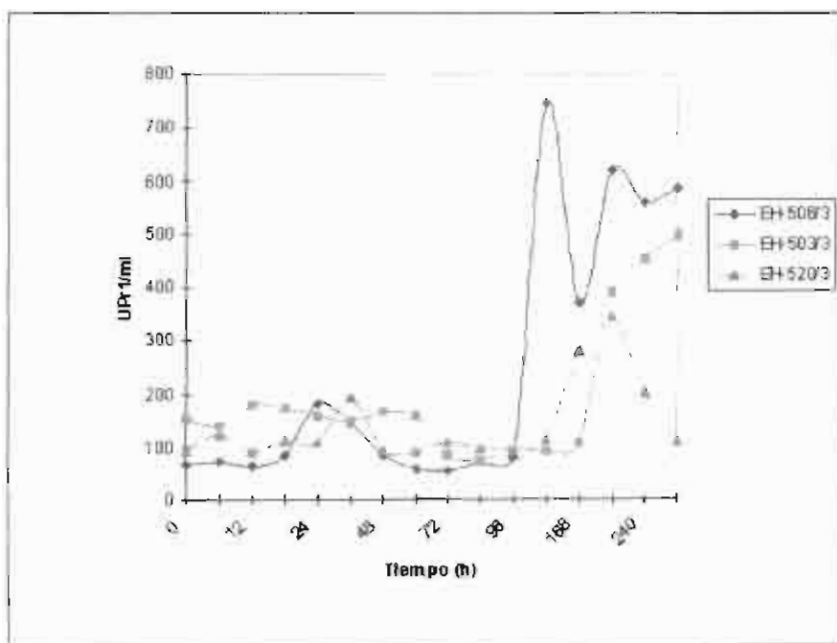


Figura 6. Actividad volumétrica de proteasas tipo subtilisina Pr1 (determinada contra el sustrato Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus*.

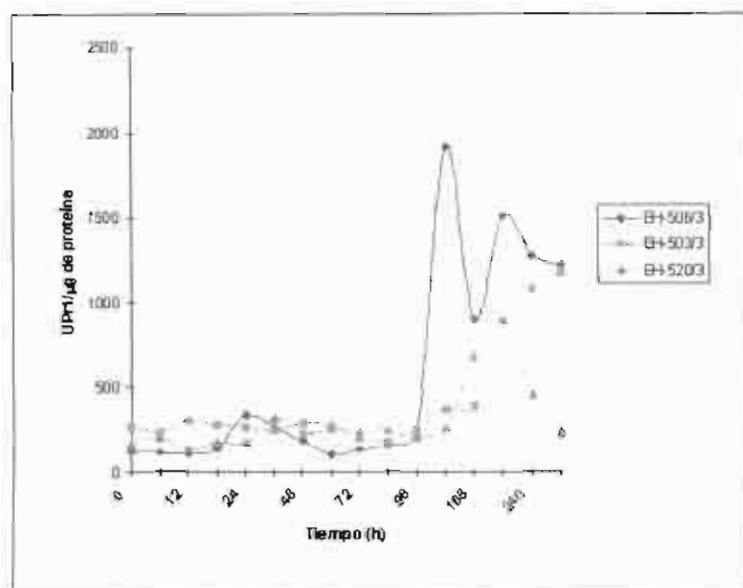


Figura 7. Actividad específica de proteasas tipo subtilisina Pr1 (determinada contra el sustrato Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Na y expresada como UPr1/μg de proteína total en el sobrenadante del cultivo) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus*.

En los tres aislados, la actividad de Pr2 fue mucho más baja que la de Pr1, y relativamente constante con respecto a ésta permaneciendo así, y relativamente constante durante todos los experimentos (Figura 8).

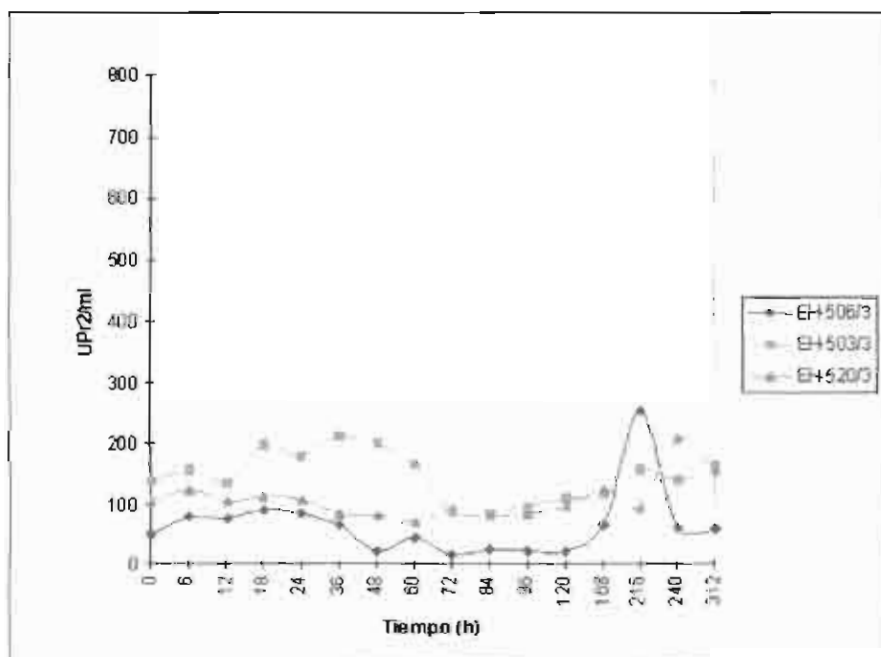


Figura 8. Actividad volumétrica de proteasas tipo tripsina Pr2 (determinada contra el sustrato Bz-Phe-Val-Arg-pNa) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus*.

La tendencia antes descrita para Pr2, también se observó con la actividad específica (Figura 9).

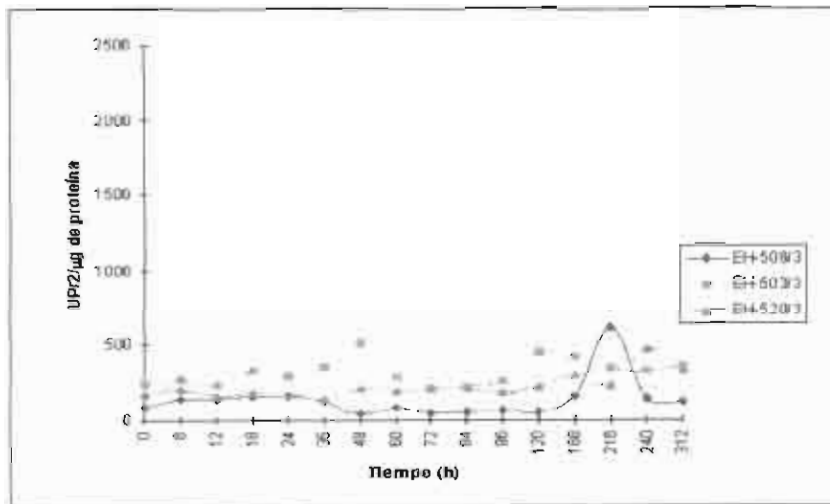


Figura 9. Actividad específica de proteasas tipo tripsina Pr2 (determinada contra el sustrato Bz-Phe-Val-Arg-pNa y expresada como UPr1/μg de proteína total en el sobrenadante del cultivo) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus*.

Producción de quitinasas en cultivo sumergido

La producción de quitinasas se realizó en medio sintético adicionado con quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol, y cada 48 horas se tomó una alícuota del cultivo, se centrifugó y al sobrenadante se le leyó la absorbencia para determinar la actividad de quitinasas. El máximo se alcanzó a las 312 horas (Figura 10), para los tres aislados con 76 UQ/ml para EH-506/3, 61 UQ/ml para EH-503/3 y 81 UQ/ml para EH-520/3. La actividad específica de las quitinasas, presentó tendencias diferentes para los tres aislados, señalando a EH-506/3 como el mayor productor de quitinasas/μg de proteína, con un máximo a las 312 h, mientras que la de EH-503/3 presentó su máximo a las 264 h y EH-520/3 a las 168 h (Figura 11).

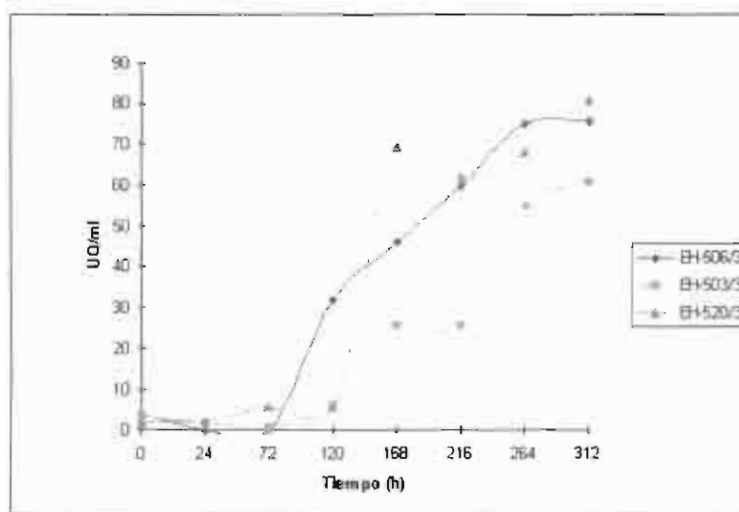


Figura 10. Actividad volumétrica de quitinasas determinada con azul brillante de remazol, de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus*.

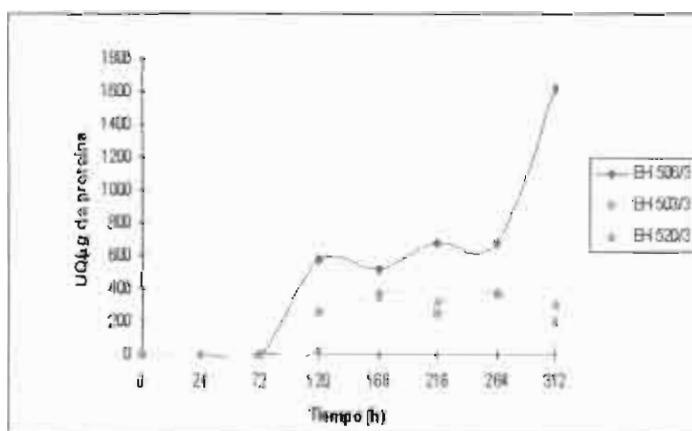


Figura 11. Actividad específica de quitinasas (determinada contra quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol y expresada como UQ/μg de proteína total en el sobrenadante del cultivo) de los aislados EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 de *P. fumosoroseus*.

Algunos puntos de la curva mostraron diferencia significativa entre los tres aislados, esos valores están señalados en la tabla 5. A las 0 h, se observaron diferencias significativas ($F_{2,24}=11.970$, $P<0.05$) entre los tres aislados estudiados. Dichas diferencias permanecieron hasta las 168 h de incubación, posteriormente, no se detectó diferencia entre la actividad de los tres aislados (Tabla 5). A pesar de que a las 312 h, se observa un aparente aumento de actividad de EH-520/3 con respecto a los otros dos aislados, dicha elevación no fue estadísticamente diferente.

Tabla 5. Actividad de quitinasas de aislados de *P. fumosoroseus*

Tiempo (h)	Actividad de quitinasas (UQ/ml)		
	EH-506/3	EH-503/3	EH-520/3
0	4.0 ^c	3.5 ^b	1.8 ^a
24	0 ^a	1.8 ^b	2.1 ^c
72	0 ^a	0.8 ^b	5.8 ^c
120	32.0 ^c	6.3 ^b	5.7 ^a
168	46 ^b	26 ^a	69.4 ^c
216	60 ^a	26 ^a	62 ^a
264	75 ^a	55 ^a	68 ^a
312	76 ^a	61 ^a	81 ^a

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes entre sí. En el análisis de valor crítico de comparación de rangos múltiples de Tukey, los promedios que comparten la misma letra en la misma línea no son diferentes significativamente.

CINÉTICA DE LA TRANSICIÓN CONIDIO-BLASTOSPORA

Para la cinética de la transición conidio-blastospora y producción de propágulos, se utilizaron los mismos medios que para la producción de enzimas y se hicieron mediciones de por los menos 10 conidios por matraz al tiempo 0 del experimento y posteriormente cada 6 h durante las primeras 24 h. A partir de las 24 h, los muestreos se realizaron cada 12 h, hasta que alcanzaron las 96 h. El experimento se extendió hasta las 312 h, que fue el tiempo que duraron los muestreos para las enzimas.

Producción de propágulos en medio H

Los tres aislados estudiados exhibieron una transición de conidio (ED:I) a diferentes propágulos en diferentes tiempos. Las figuras 12-14 muestran las distintas estructuras encontradas en los cultivos de *P. fumosoroseus*. En los tres casos, el conidio se hinchó (ED: II) y comenzó a producir uno o más tubos germinales (ED: III). Durante los primeros tiempos de muestreo, se observó un desarrollo diferencial de los tres aislados utilizados: a las 6 h, EH-506/3 ya había producido tubos germinales (ED: III), mientras que EH-503/3, comenzó a germinar entre las 6 y las 12 h, mientras que EH-520/3 lo hizo hasta las 12 h (Tabla 6). A las 36 h, los tres aislados produjeron blastosporas primarias (ED: V); originadas de los septos y puntas de las hifas; blastosporas gemando (ED: V) y cuerpos hifales (ED: VI). Después de 48-96 h, fueron observadas estructuras ovales y estrechas, semejantes a hifas cortas, estas producían blastosporas (ED: V) o conidios sumergidos. A partir de las 96 h, se

observaron pelotillas de micelio (*pellets*) y a las 196 h, cuerpos hifales mayores y más abundantes fueron encontrados. A las 240 h, las blastosporas mostraron vacuolas bien definidas y produjeron tubos germinales; después de ese momento, los propágulos fueron menos evidentes y lo que predominó en el cultivo fueron las pelotillas de micelio.

En el caso de EH-506/3 (Figura 12), a las 6 h, los tubos germinales ya eran relativamente largos, cuando se compararon con los otros dos aislados. A las 12 h, dichos tubos germinales continuaron creciendo, pero también se observaron blastosporas típicas, como la señalada en la figura 12. A las 18 h, se observó que había mayor cantidad de cuerpos hifales, los cuales continuaron apareciendo hasta las 48 h. La relación largo-ancho, mostró que los tubos germinales alcanzaron un tamaño máximo, y posteriormente dicha relación disminuyó, lo que también señaló la presencia de cuerpos hifales. A las 60 h y 84 h, de nuevo comenzaron a observarse tubos germinales, pero esta vez se originaron a partir de las blastosporas y cuerpos hifales. Dicho crecimiento continuó hasta que se formaron pelotillas de micelio.

A las 6 h, el aislado EH-50/3/3, presentaba conidios germinando (Figura 13), dichos tubos germinales alcanzaron un máximo entre las 12 y 18 h del cultivo, como lo indican los valores de relación largo-ancho enlistados en la tabla 6. A partir de las 24 h, comenzaron a observarse una gran cantidad de cuerpos hifales, a partir de los cuales se originaron blastosporas o conidios sumergidos. A partir de éstas estructuras, comenzaron a originarse nuevos micelios, observados a partir de las 72 h. A partir de ese momento, comenzaron a formarse pelotillas de micelio, las cuales permanecieron hasta las 312 h del cultivo.

En el caso de EH-520/3, se observó una transición un poco más lenta, ya que a las 6 h, se observaron conidios hinchados (Figura 14) y hasta las 12 h, se observaron blastosporas. También se observó la aparición de hifas grandes, a partir de las 24 h. A las 36 h, se observaron blastosporas originadas a partir de los septos de dichas hifas. A partir de las 84 h se observó una gran concentración de cuerpos hifales y de pelotillas de micelio, las cuales se observaron hasta las 312 h de cultivo.

Diferencias significativas en la concentración de propágulos fueron observadas entre EH-506/3 y los otros dos aislados, EH-503/3 y EH-520/3. Las mayores concentraciones de propágulos ocurrieron a diferentes tiempos para cada aislado. A las 96 h, 1.0×10^7 propágulos/ml para EH-506/3; a las 60 h, 7.7×10^7 propágulos/ml para EH-503/3 y 6.4×10^7 propágulos/ml para EH-520/3.

Tabla 6. Relación largo-ancho de los propágulos (cuerpos hifales, células levaduriformes, hifas cortas y conidios sumergidos) de *P. fumosoroseus* en medio H con caseína.

Tiempo	Aislado	Largo/ancho	Estado de desarrollo (tipo de morfología)
0h	EH-506/3	2.0 ^a	Conidios (I)
	EH-503/3	2.0 ^a	Conidios (I)
	EH-520/3	2.0 ^a	Conidios (I)
6h	EH-506/3	2.1 (± 0.5) ^{a,b}	Conidios germinando (III)
	EH-503/3	2.3 (± 0.4) ^b	Conidios germinando (III)
	EH-520/3	1.9 (± 0.4) ^a	Conidios hinchados (II)
12 h	EH-506/3	8.5 (± 2.57) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	16 (± 3.11) ^c	Conidios germinando (III)
	EH-520/3	5 (± 5.16) ^a	Conidios germinando (III)
18 h	EH-506/3	5.1 (± 2.16) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	4.5 (± 2.11) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	6.9 (± 6.5) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
24 h	EH-506/3	4.4 (± 1.5) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	4.6 (± 1.7) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	10.4 (± 7.4) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
36 h	EH-506/3	4.4 (± 1.5) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	4.6 (± 1.7) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	10.4 (± 7.4) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
48 h	EH-506/3	5.4 (± 2.3) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	3.2 (± 1.2) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	5.1 (± 2.5) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
60 h	EH-506/3	5.5 (± 2.4) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	4.1 (± 1.4) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI), conidios sumergidos
	EH-520/3	4.6 (± 1) ^{a,b}	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI), conidios sumergidos
72 h	EH-506/3	4.8 (± 1.2) ^{a,b}	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	4.3 (± 0.9) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI), conidios sumergidos
	EH-520/3	5.5 (± 1.3) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI), conidios sumergidos
96 h	EH-506/3	4.5 (± 0.9) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	4.03 (± 0.81) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI), conidios sumergidos
	EH-520/3	4.0 (± 1.1) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI), conidios sumergidos

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes entre sí. En el análisis de valor crítico de comparación de rangos múltiples de Tukey, los promedios que comparten la misma letra no son diferentes significativamente.

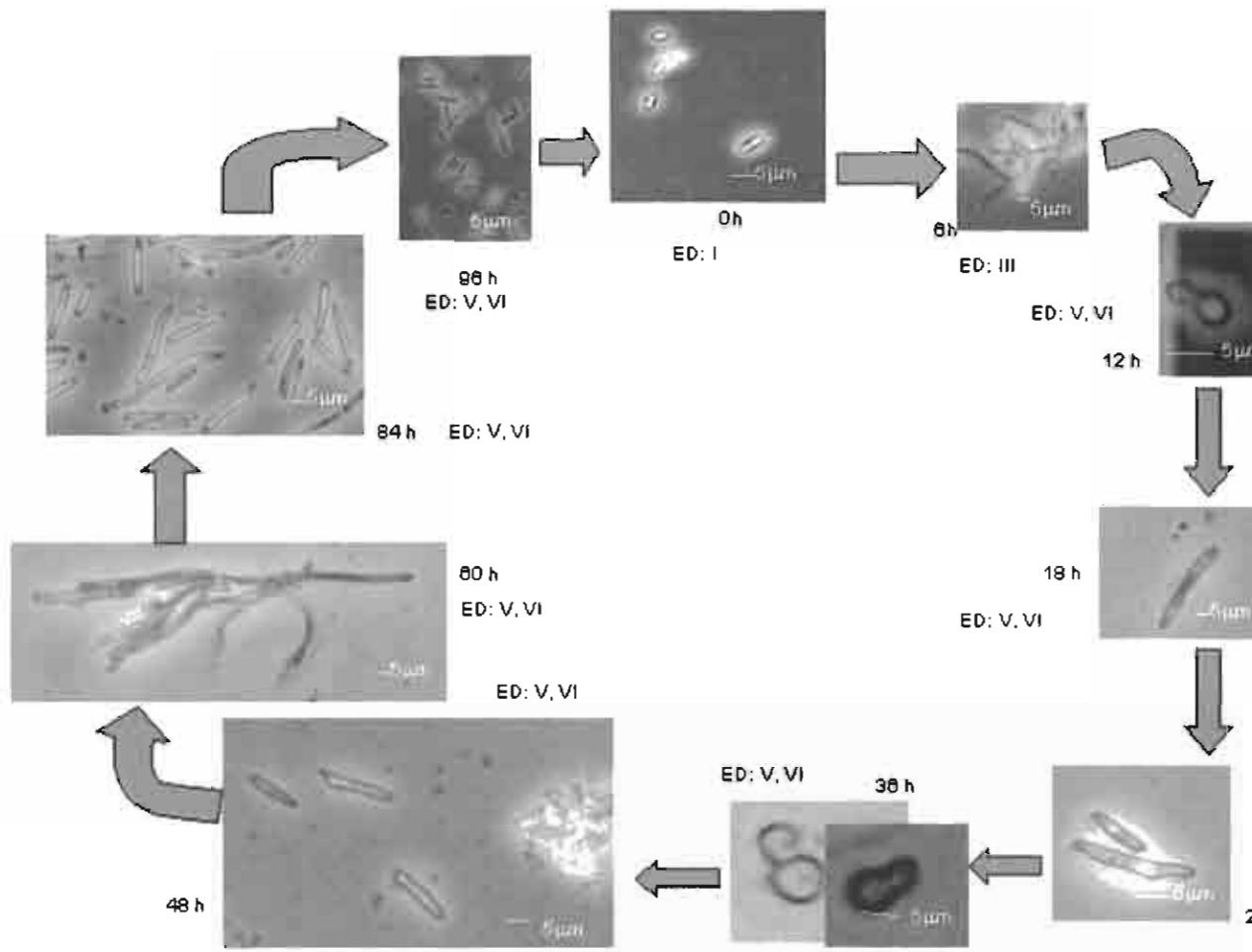


Figura 12. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-506/3 en medio H con caseína al 1%. Obs hifales (18h) y las blastosporas típicas (6h). ED: estadio de desarrollo. I: conidios, III: conidios germinando, V: blastosporas.

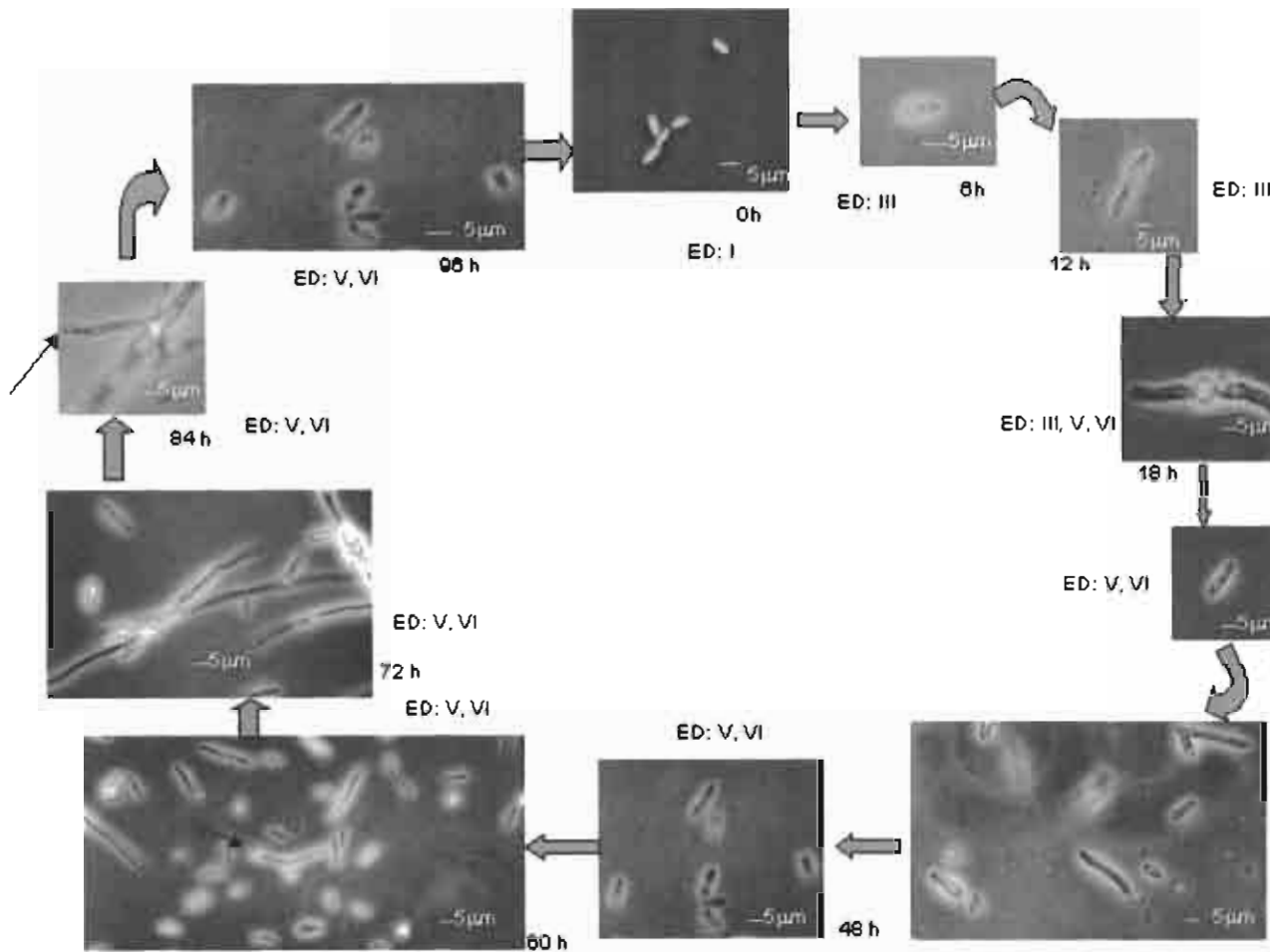


Figura 13. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-503/3 en medio H con caseína al 1%. Observa la aparición de cuerpos hifales a partir de las 24 h. A las 60 y 96 h, se observaron conidios sumergidos (flechas). ED: estado de desarrollo. ED: III: conidios germinando, V: cuerpos hifales, VI: blastosporas.

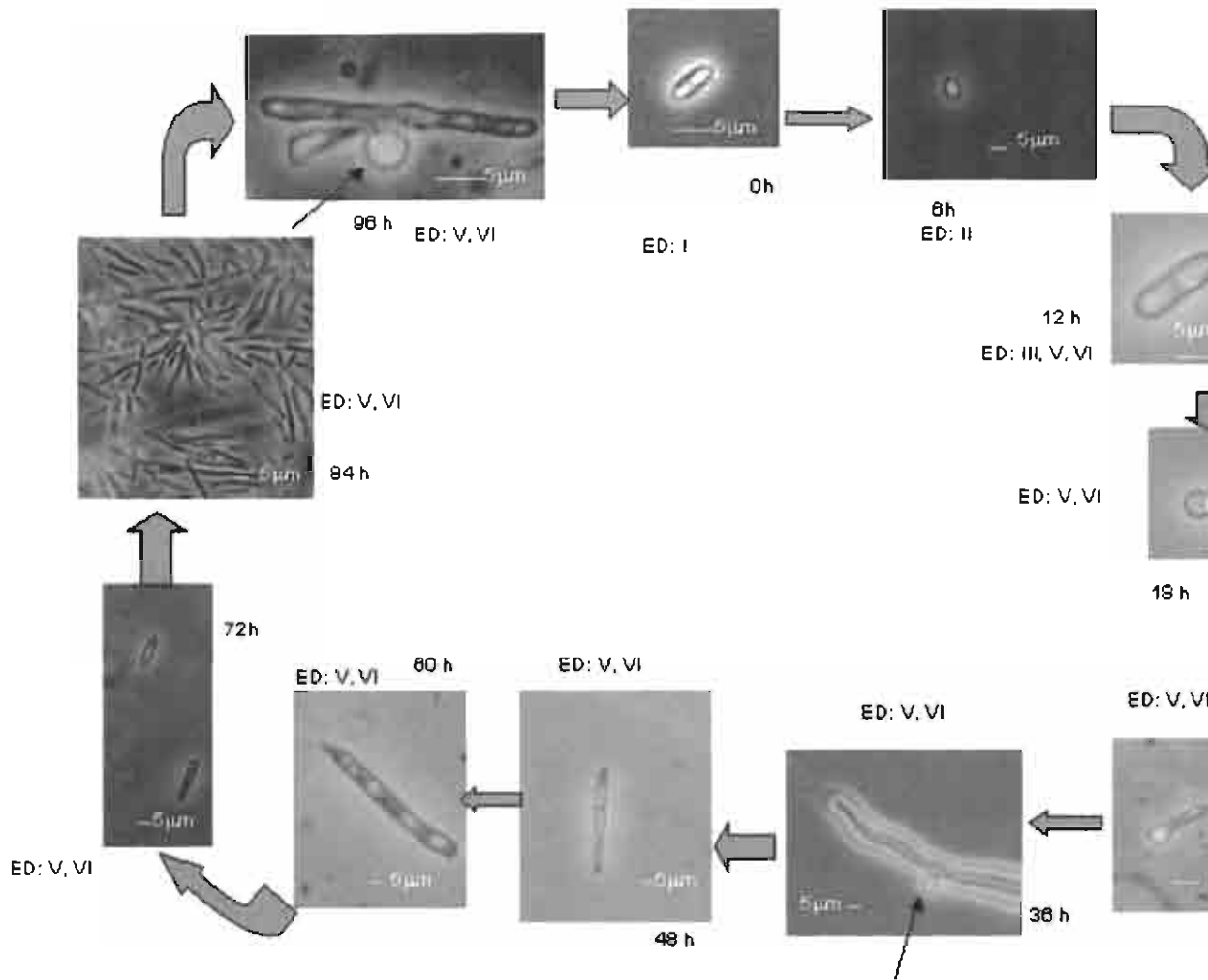


Figura 14. Cinética del a transición conidio-blastospora del aislado EH-520/3 en medio H con caseína al 1%. Obsérvese las blastosporas originadas a partir de los septos hifales a las 36 h. ED: estadio de desarrollo. I: conidios, III: conidios germinando, V y VI: blastosporas.

Producción de propágulos en medio sintético adicionado con quitina coloidal

En el presente estudio, también se obtuvo una producción de propágulos en un medio rico, similar a las condiciones nutrimentales que encuentra el hongo cuando entra en contacto con la cutícula del insecto. Esto es, en el medio sintético con quitina coloidal, se observaron también cuerpos hifales y blastosporas (Figuras 15-17). El conidio se hinchó (ED: II) y comenzó a producir uno o más tubos germinales (ED: III). Durante los primeros tiempos de muestreo, se observó un desarrollo diferencial de los tres aislados utilizados: a las 12 h, EH-506/3 y EH-503/3 ya habían producido tubos germinales (ED: III), mientras que EH-520/3, comenzó a germinar hasta las 24 h, (Tabla 7). A las 36 h, los tres aislados produjeron blastosporas primarias (ED: V); originadas de los septos y puntas de las hifas; así como gran cantidad de blastosporas gemando (ED: V) y en menor medida cuerpos hifales (ED: VI). Después de 48-96 h, estructuras ovales y estrechas, semejantes a hifas cortas fueron observadas, éstas producían principalmente blastosporas (ED: V). A partir de las 96 h, se observaron pelotillas de micelio (*pellets*) rodeando las partículas de quitina del medio, lo que predominó hasta las 196 h en el cultivo fueron las pelotillas de micelio. Después de las 196 h, prácticamente había desaparecido todo el material particulado del medio.

A las 6 h, el aislado EH-506/3, ya había comenzado a producir cuerpos hifales (Figura 15), los cuales se alargaron y alcanzaron su máximo tamaño entre las 12 y 24 h de acuerdo con la relación largo-ancho mencionada en la tabla 6. A las 24 h, se observó una mayor cantidad de cuerpos hifales largos, que estaban asociados a las partículas de quitina, después de ese tiempo, se observó una gran cantidad de

cuerpos hifales y al mismo tiempo, pelotillas de micelio que englobaron a las partículas de quitina, dicha quitina, fue desapareciendo progresivamente del medio de cultivo.

El aislado EH-503/3 produjo blastosporas típicas a las 12 h de cultivo (Figura 16), las cuales continuaron apareciendo hasta las 24 h, también se observó la presencia de pelotillas de micelio asociadas a la quitina. A partir de las 36 h, se observaron conidios sumergidos y a las 72 h, tubos germinales originados de dichos conidios.

El aislado EH-520/3, presentó conidios hinchados (Figura 17) y blastosporas típicas a las 6 h. Este aislado presentó blastosporas con varias yemas, así como conidios sumergidos originados a partir de cuerpos hifales cortos. También se observaron, como con los otros dos aislados, pelotillas de micelio asociadas a la quitina.

Las concentraciones de propágulos fueron, para EH-506/3, 1.1×10^5 propágulos/ml a las 36 h de incubación, para EH-503/3, 1.3×10^5 propágulos/ml a las 72 h y para EH-520/3, 6.4×10^5 propágulos/ml a las 12 h.

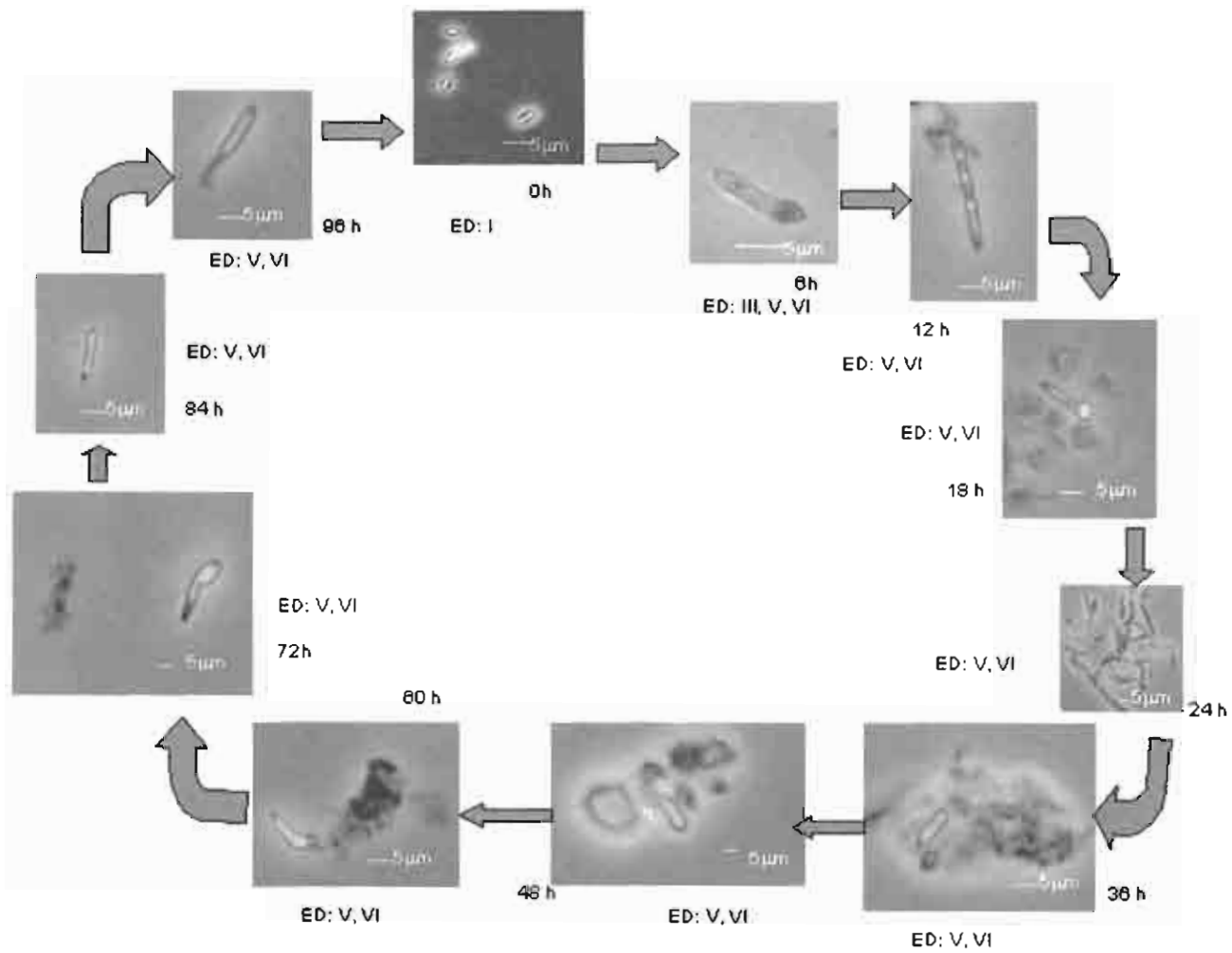


Figura 15. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-506/3 en medio sintético con quitina coloidal al cuerpos hifales orientados hacia la quitina a las 36 h. ED: estadio de desarrollo. I: conidios, III: conidios germinando, V, VI: blastosporas.

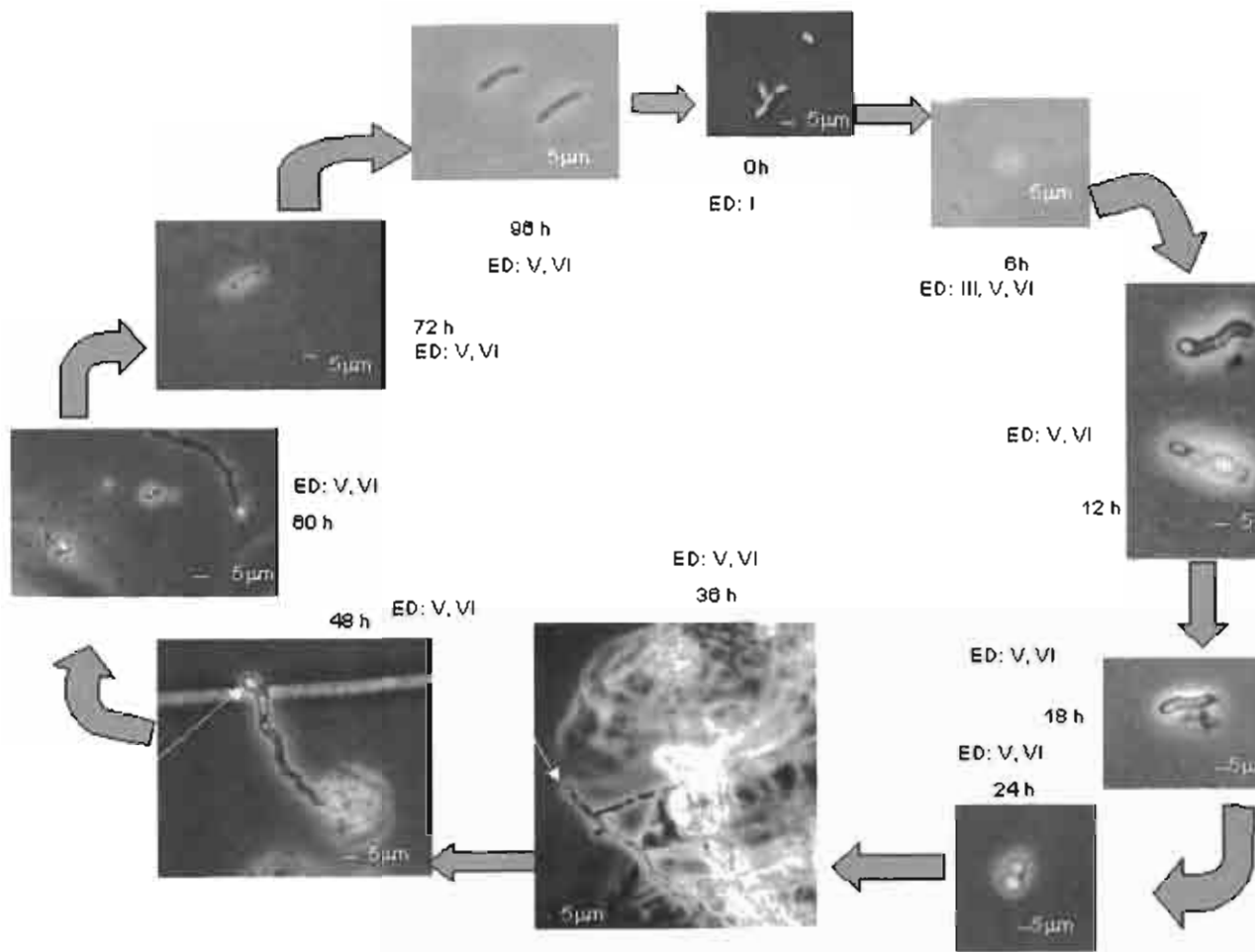


Figura 16. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-503/3 en medio sintético con quitina coloidal al conidios sumergidos (flecha) a las 36 y 48 h. ED: estadio de desarrollo. I: conidios, III: conidios germinando, V: blastosporas.

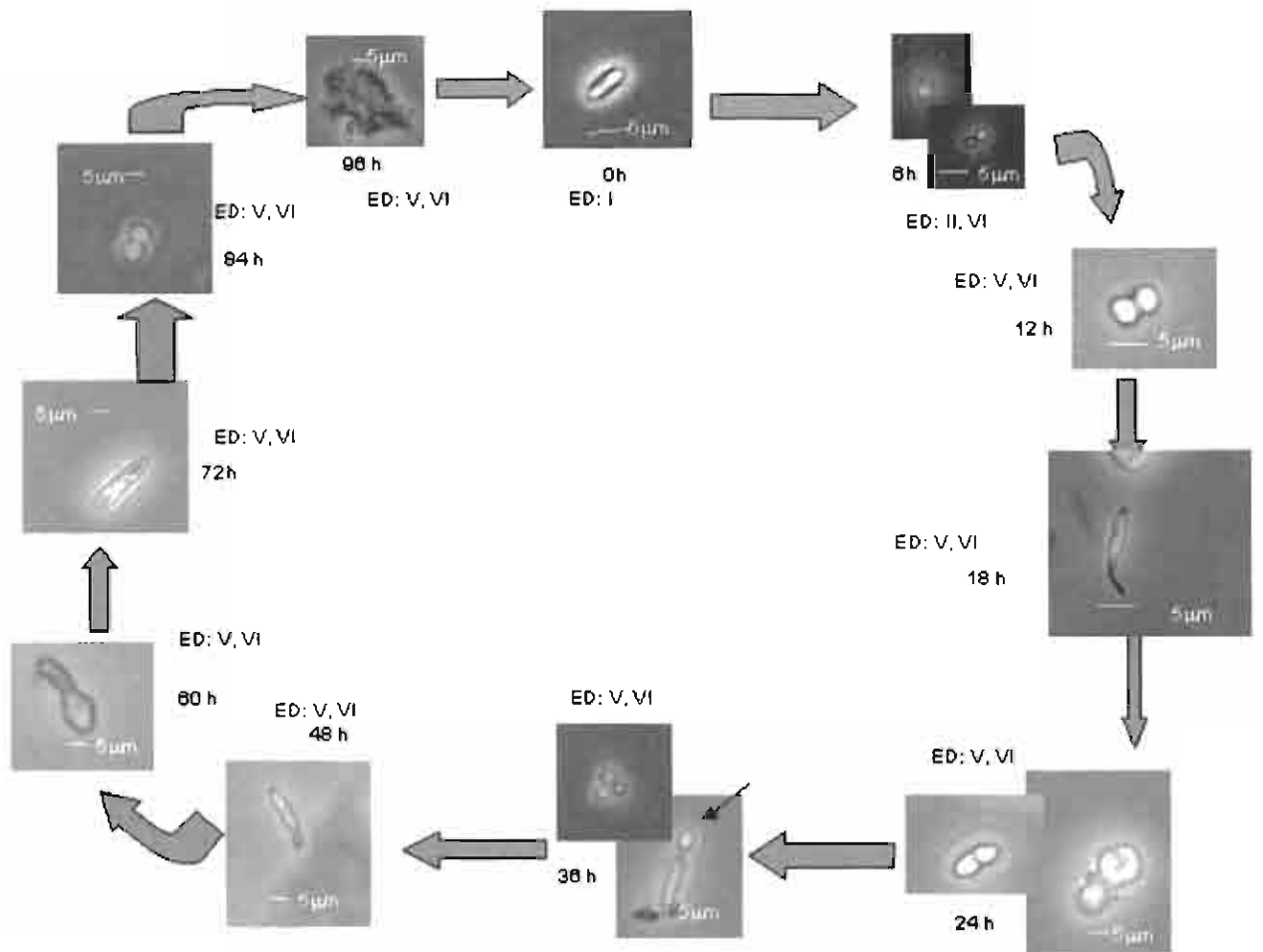


Figura 17. Cinética de la transición conidio-blastospora del aislado EH-520/3 en medio sintético con quitina coloidal al conidios sumergidos originados a partir de cuerpos hifales cortos a las 36 h. ED: estadio de desarrollo. I: conidios, III: cuerpos hifales, VI: blastosporas.

El tamaño de los conidios aéreos usados para la inoculación y medidos después de la incubación por 10 días a 28°C en medio H sólido fue de $5 \pm 0 \mu\text{m}$ de largo y $2.5 \pm 0 \mu\text{m}$ de ancho. El tamaño de los propágulos se determinó al dividir largo/ancho en cada tiempo de muestreo (Tabla 6 y 7).

De manera general, la relación largo/ancho obtenidos en medio H fueron mayores a aquellos obtenidos en medio sintético. A las 12 h, EH-503/3 mostró un relación largo/ancho de 16 cuando se cultivó en medio H, este tamaño corresponde a hifas cortas. Para las 24 h, todos los propágulos sumergidos, excepto los obtenidos con EH-520/3 en medio sintético, mostraron relaciones largo/ancho más altas que los conidios aéreos. Diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron observadas entre el tamaño de los propágulos (Tabla 6 y 7) en casi todos los tiempos de muestreo.

Tabla 7. Relación largo/ancho de los propágulos (cuerpos hifales, células levaduriformes, hifas cortas y conidios sumergidos) de *P. fumosoroseus* en sintético con quitina coloidal.

Tiempo	Aislado	largo/ancho	Estado de desarrollo (tipo de morfología)
0 h	EH-506/3	2.0 ^a	Conidios (I)
	EH-503/3	2.0 ^a	Conidios (I)
	EH-520/3	2.0 ^a	Conidios (I)
6 h	EH-506/3	2.23 (±1.1) ^a	Conidios germinando (III)
	EH-503/3	2.2 (±1.1) ^a	Conidios germinando (III)
	EH-520/3	2.07 (±1.1) ^a	Conidios hinchados, blastosporas (II, VI)
12 h	EH-506/3	4.4 (±0.34) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	4.45 (±0.34) ^b	Cuerpos hifales (V)
	EH-520/3	2 (±0.34) ^a	Cuerpos hifales(V)
18 h	EH-506/3	7.1(±0.64) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	5.9(±0.64) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V,VI)
	EH-520/3	2.23(±0.64) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V,VI)
24 h	EH-506/3	4.6(±0.65) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	2.67(±0.65) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	4.7(±0.65) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
36 h	EH-506/3	3.77(±0.26) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	2.4(±0.26) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	2.33(±0.26) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
48 h	EH-506/3	4.3(±0.41) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	2.58(±0.41) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	3.88(±0.41) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
60 h	EH-506/3	3.33(±0.44) ^{a,b}	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	2.88(±0.44) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	4.03(±0.44) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
72 h	EH-506/3	3.8(±0.49) ^{a,b}	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	2.9(±0.49) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	4.85(±0.49) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
96 h	EH-506/3	4.63(±0.47) ^b	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-503/3	2.3(±0.47) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)
	EH-520/3	3.31(±0.47) ^a	Cuerpos hifales, blastosporas (V, VI)

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes entre sí. En el análisis de valor crítico de comparación de rangos múltiples de Tukey, los promedios que comparten la misma letra no son diferentes significativamente.

Con base en las observaciones obtenidas en ambos medios de cultivo, se propone un esquema general de la transición de conidio a blastospora de aislados de *P. fumosoroseus* de México (Figura 18). Dicho esquema, comprende el hinchamiento

del conidio, el cual puede producir un tubo germinal que a su vez generará una blastospora o bien, producir directamente una levadura, posteriormente, dicha blastospora germina y da lugar a un cuerpo hifal o a hifas cortas, estas estructuras, pueden dar origen a su vez, a blastosporas secundarias o a conidios sumergidos, los cuales, al geminar, generarán nuevos cuerpos hifales, conforme el cultivo envejece, comenzarán a desaparecer las blastosporas y cuerpos hifales, para encontrar en su lugar, pelotillas de micelio.

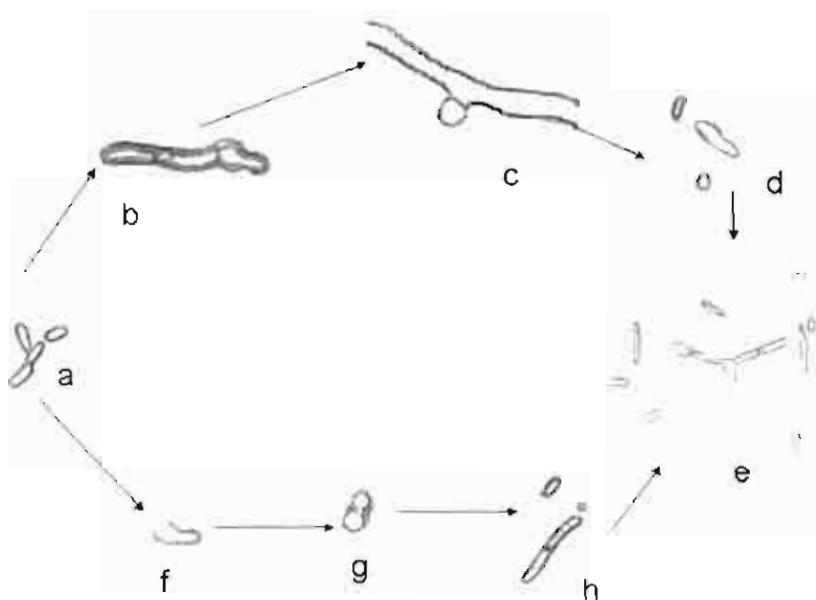


Figura 18. Esquema general de la transición de conidio a blastospora de aislados de *P. fumosoroseus* de México. a) conidios sin germinar. b) conidio produciendo un tubo germinal. c) hifas produciendo blastosporas. d) cuerpos hifales. e) cuerpos hifales produciendo conidios sumergidos. f) conidio produciendo una levadura. g) blastospora típica originada a partir de un conidio. h) cuerpos hifales originados de conidios.

Pruebas de virulencia

Determinación del índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico

El IDCDF proporcionó una perspectiva de los eventos cronológicos de la infección de *P. fumosoroseus* hacia la mosquita blanca. La tabla 8 describe el ICDF para los tres aislados. Entre las 6 y las 24 h del ensayo, se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre los aislados. A las 6 y 12 h, los valores del ICDF para las ninfas tratadas con EH-506/3 fueron significativamente diferentes de aquellos observados en las ninfas tratadas con EH-503/3 y EH-520/3. A las 18 y 24 h, los tres aislados mostraron diferencias significativas entre ellos. A las 36 y 48 h, los valores del ICDF para las ninfas tratadas con EH-506/3 y EH-503/3 fueron los mismos, y fueron significativamente diferentes de los obtenidos en las ninfas tratadas con EH-520/3. A las 60h, los tres aislados alcanzaron el mismo valor de ICDF. La figura 19 muestra una ninfa 4 sana y la 20, ninfas a las 0 h de incubación

El aislado EH-506/3, germinó y colonizó más rápidamente las ninfas, que los otros dos, señalándolo como el más virulento. A las 6 h, este aislado mostró germinación de los conidios en el área cercana a la ninfa (ICDF=0.5), mientras que este valor fue alcanzado por los otros dos aislados hasta las 12 h (Tabla 8). A las 12 h (Figura 21), el micelio de EH-506/3 estaba creciendo en la superficie del hospedante (ICDF=2.0), aparentemente, ya había emergido del mismo. En este mismo tiempo, los otros dos aislados, comenzaban la germinación en el área cercana a la ninfa y en el caso de EH-520/3, lo que se observaba principalmente eran conidios hinchados. A las 18 h de incubación (Figura 22), las ninfas tratadas con EH-506/3 mostraban unos pocos conidióforos en su superficie, con la esporulación

característica de *Paecilomyces* (ICDF=2.5). A este mismo tiempo de incubación, las ninfas tratadas con EH-503/3 mostraban hifas orientadas hacia la ninfa, y algunas de ellas ya tenían un contacto con el cuerpo del hospedante (ICDF=1.5). A las 18 h, el aislado EH-520/3 desarrolló uno o más tubos germinales en la cercanía de la ninfa (ICDF= 0.5). A las 24 h (Figura 23), EH-506/3 mostraba el mismo ICDF (2.5) y EH-503/3 desarrollaba un crecimiento micelial denso en la ninfa, sugiriendo emergencia de las hifas a partir del hospedante. En este mismo tiempo, el ICDF para EH-520/3 era de 1, ya que los conidios estaban germinando, y muy pocos tubos germinales mostraban contacto primario con la ninfa. A las 36 h (Figura 24), EH-506/3 continuaba esporulando y EH-503/3 iniciaba la esporulación en la superficie de las ninfas (ICDF=2.5). EH-503/3 continuó con un crecimiento micelial denso, y las ninfas tratadas con este aislado, mostraban daño estructural, así como cambio de forma. Las ninfas testigo o tratadas con los otros dos aislados, conservaron la forma típica del insecto, aún durante el proceso de manipulación. A este mismo tiempo (36 h), las ninfas tratadas con EH-520/3 mostraban un ICDF de 1.5, ya que las hifas comenzaban a colonizar el hospedante. A las 48 h (Figura 25) , las ninfas tratadas con EH-506/3 estaban completamente cubiertas de micelio (ICDF=3.0), pero no se observó nuevamente esporulación; por otro lado, EH-503/3 mostraba una esporulación profusa, y se notaban conidióforos prácticamente en toda la superficie de los insectos. EH-520/3 creció más despacio en comparación con los otros dos aislados, y alcanzó el máximo del ICDF hasta las 60 h (Figura 26) , mostrando también esporulación profusa que continuó hasta las 72 h (Figura 27). Todas las ninfas fueron incubadas hasta las 96 h (Figura 28) para seguir el proceso de

infección, y en este momento, los tres aislados mostraron una colonización completa de la superficie del hospedante. Las ninfas tratadas con EH-503/3 mostraron grandes alteraciones en la cutícula, en algunos casos, perforaciones mayores; este fenómeno no fue observado con los otros dos aislados, por lo que dicho daño pudo atribuirse a la acción del aislado sobre la cutícula.

Tabla 8. Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico de tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*.

Tiempo (h)	EH-506/3 (\pm DS)	EH-503/3 (\pm DS)	EH-520/3 (\pm DS)
0	0	0	0
6	0.5(\pm 0.7) ^b	0(\pm 0.14) ^a	0(\pm 0.9) ^a
12	2.0(\pm 0.3) ^b	0.5(\pm 0.23) ^a	0.5(\pm 0.18) ^a
18	2.5(\pm 0.13) ^c	1.5(\pm 0.21) ^b	0.5(\pm 0.15) ^a
24	2.5(\pm 0.1) ^c	2.0(\pm 0.32) ^b	1.0(\pm 0.21) ^a
36	2.5(\pm 0.06) ^b	2.5(\pm 0.18) ^b	1.5(\pm 0.25) ^a
48	3.0(\pm 0.13) ^b	3.0(\pm 0.16) ^b	2.0(\pm 0.34) ^a
60	3.0(\pm 0.08) ^a	3.0(\pm 0.09) ^a	3.0(\pm 0.19) ^a

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes entre sí. En el análisis de valor crítico de comparación de rangos múltiples de Tukey, los promedios que comparten la misma letra no son diferentes significativamente.



Figura 19. Ninfa testigo en cuarto estadio.

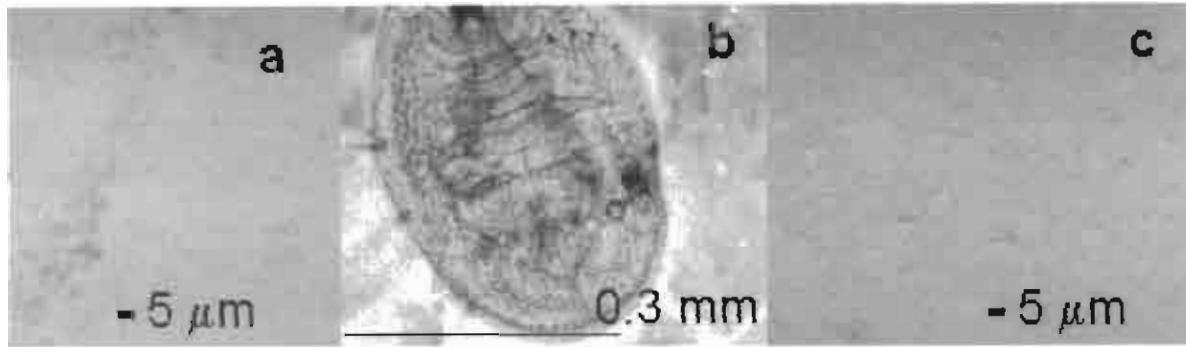


Figura 20. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* y conidios de *Paecilomyces fumosoroseus* a las 0 h de incubación. a) Aspecto de los conidios de EH-506/3. b) Ninfa en cuarto estadio recién infectada con EH-503/3. c) Conidios de EH-520/3, al ser depositados sobre las ninfas.

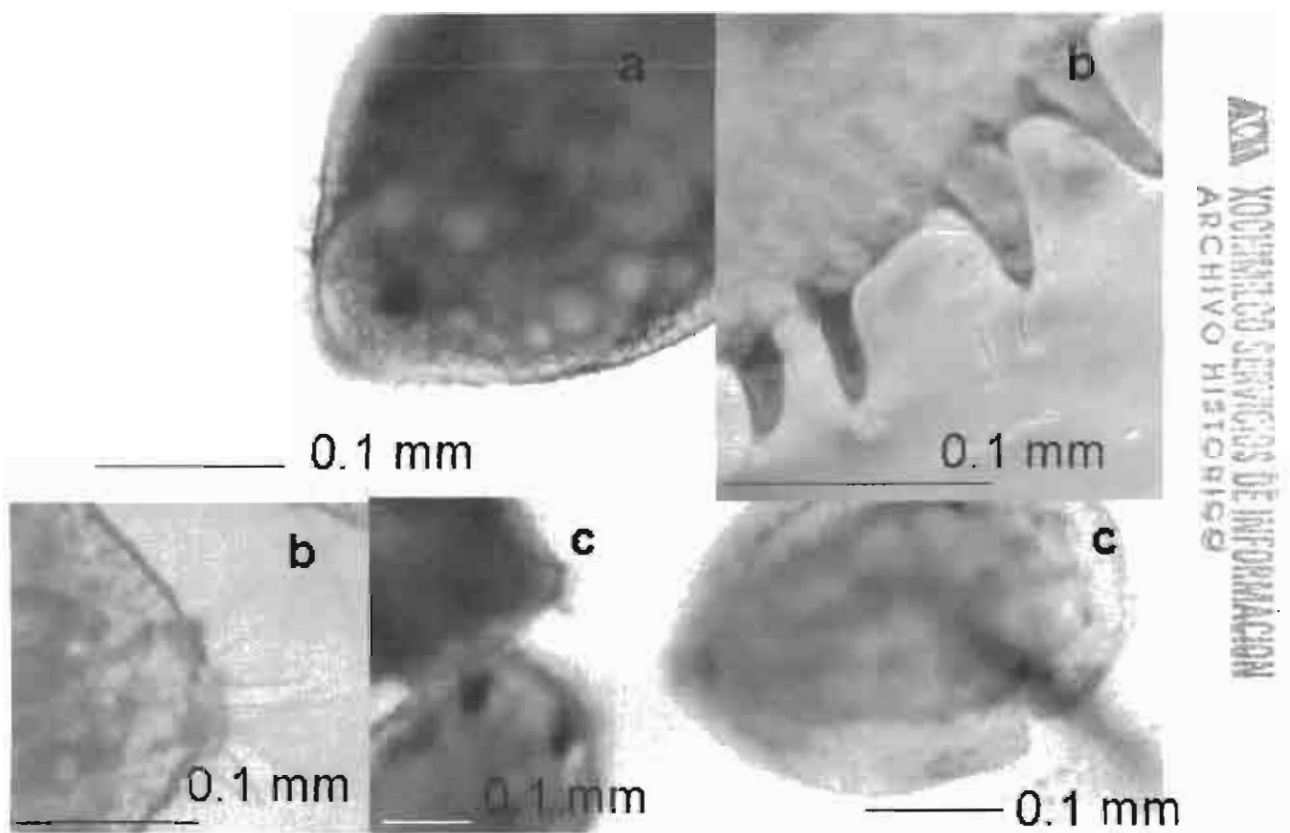


Figura 21. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a las 12 h de incubación con tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*. a) Hifas de EH-506/3 emergiendo de la ninfa, ICDF= 2. b) Tubos germinales de EH-503/3 alcanzando la ninfa a las 12 h de incubación (ICDF=0.5). c) Conidios de EH-520/3 con uno o varios tubos germinales, ICDF=0.5.

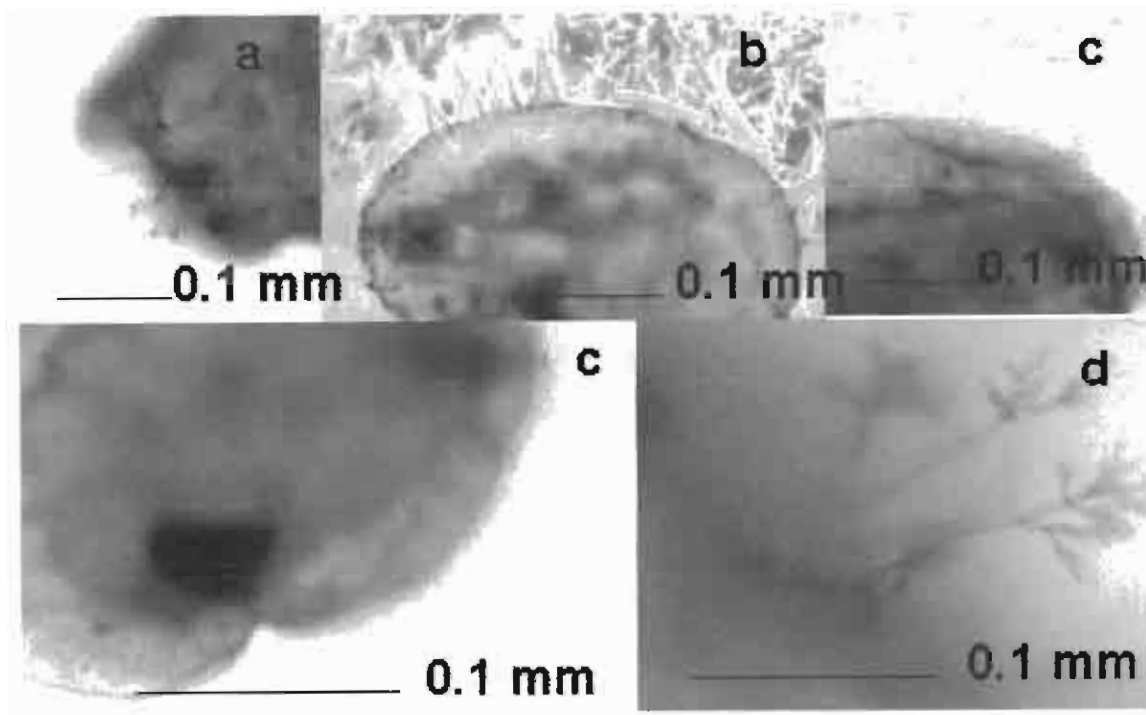


Figura 22. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a las 18 h de incubación con tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*. a) Hifas de EH-506/3 emergiendo de la ninfa, con conidióforos y conidios (ICDF= 2.0 y 2.5, respectivamente). b) Tubos germinales de EH-503/3 en contacto con la ninfa a las 18 h de incubación (ICDF=1.5). c) EH-520/3 con uno o varios tubos germinales, ICDF= 0.5. d) Conidióforos de EH-506/3 ampliados.

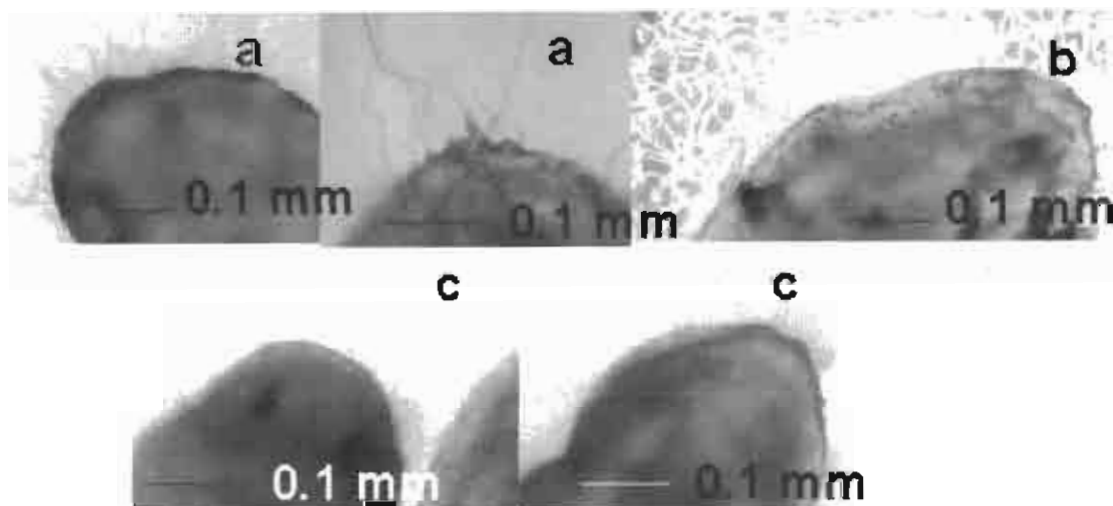


Figura 23. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a las 24 h de incubación con tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*. a) y b) Ninfa con crecimiento micelial de EH-506/3y EH-503/3 respectivamente, dentro y en su superficie (ICDF=2.0) a las 24 h de incubación. c) EH-520/3 con un crecimiento de tubos germinales y presencia de hifas, ICDF=1

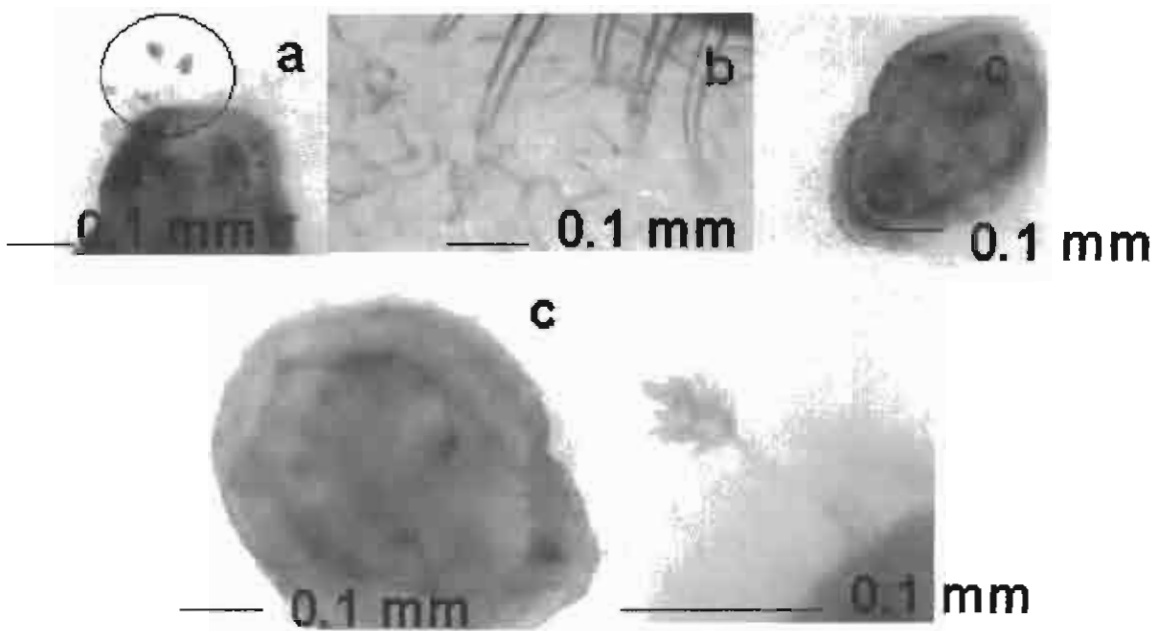


Figura 24. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a las 36 h de incubación con tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*. a) Esporulación completa de EH-506/3 en la ninfa a las 36 h de incubación (ICDF= 3.0) b) Ninfa cubierta por completo de micelio de EH-503/3 a las 36 h de incubación (ICDF=2.5). c) Tubos germinales de EH-520/3 haciendo contacto con la ninfa de mosquita blanca (ICDF=1.5) d) Conidióforo de EH-506/3 ampliado, señalado en la figura a con un círculo.

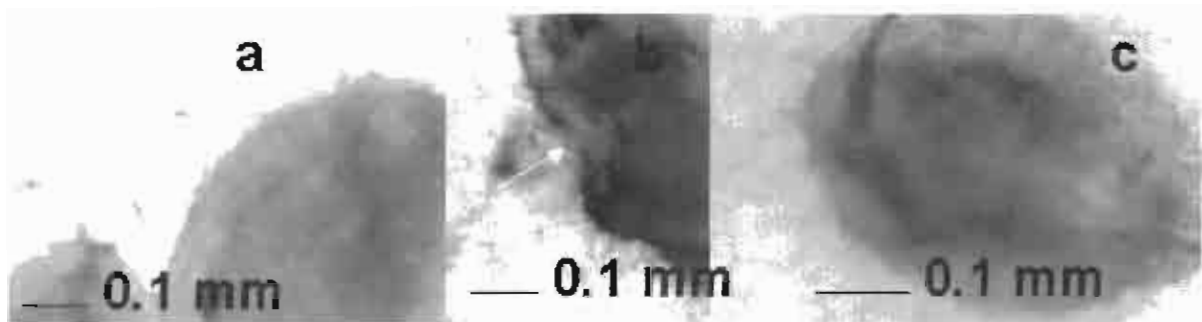


Figura 25. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a las 48 h de incubación con tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*. a) Ninfa completamente esporulada con EH-506/3 (ICDF= 3.0). b) Aspecto de la ninfa a las 48 h de incubación con EH-503/3 (ICDF= 3.0). La flecha señala el daño cuticular producido presumiblemente por las quitinasas del hongo. c) crecimiento micelial de EH-520/3 dentro y sobre la superficie de la ninfa (ICDF= 2.0).

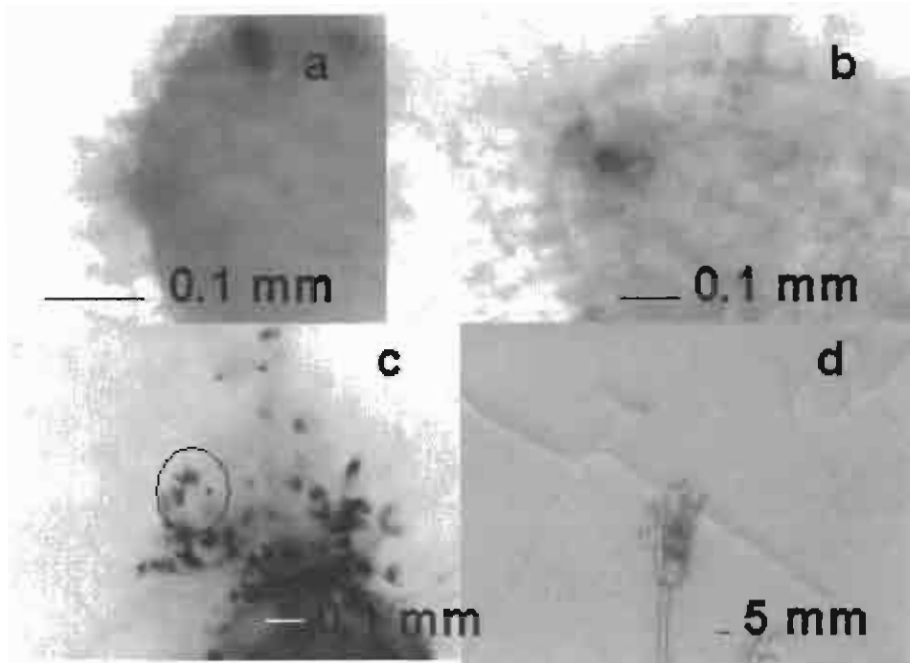


Figura 26. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a las 60 h de incubación con tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*. Aspecto de las ninfas a las 60 h de incubación con los tres aislados a) EH-506/3, b) EH-503/3. c) EH-520/3, hasta este momento se alcanzó el ICDF de 3.0. d) Conidióforo de EH-520/3 ampliado.

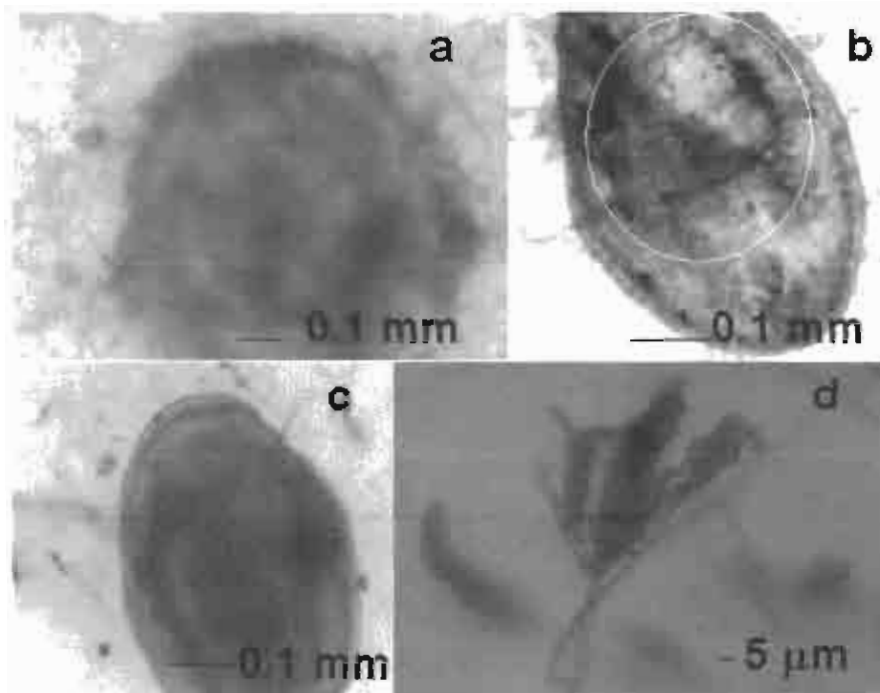


Figura 27. Ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a las 72 h de incubación con tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*. a) EH-506/3, b)EH-503/3. El círculo señala el hueco en la cutícula provocado por la acción del hongo. c) EH-520/3, d) Conidióforo ampliado de EH-520/3.

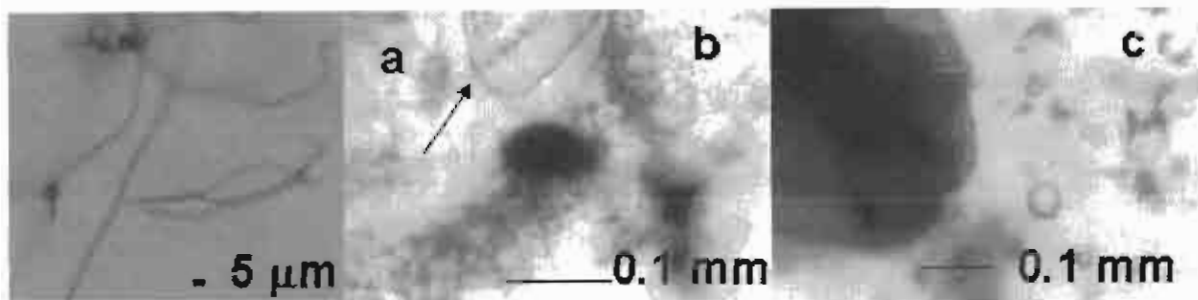


Figura 28. Aspecto de las ninfas a las 96 h de incubación con los tres aislados a) Conidioforo de EH-506/3 emergiendo de la ninfa. b)EH-503/3. La flecha señala el hueco de la cutícula provocado por la acción del hongo. c) Micelio de EH-520/3.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La MEB mostró que los conidios de ambos aislados de *P. fumosoroseus* son capaces de adherirse en cualquier tipo de la superficie de la ninfa, especialmente en la zona del raquis y del orificio vasiforme. En general, EH-506/3 mostró menos crecimiento micelial, pero un daño cuticular más severo en la vecindad de las estructuras fúngicas, comparado con EH-520/3.

La figura 29 muestra una ninfa testigo, que permaneció con su forma intacta y sin daño cuticular después de la manipulación. En las ninfas testigo, no se observó crecimiento fúngico, casi todos los insectos de este lote experimental alcanzaron el último estadio de desarrollo (ninfa cuatro en subestadio tres).

Todas las ninfas tratadas con EH-506/3 y EH-520/3 mostraron señales de infección. En la mayoría de los casos, un solo tubo germinal emergió de cada conidio y se alejó cierta distancia del mismo antes de penetrar. A las 0 h, los conidios de EH-506/3 y EH-520/3 (Figuras 30 a 32) fueron encontrados en la superficie de la ninfa, y cerca del orificio vasiforme del insecto. Se observó también la microbiota natural de la ninfa (bacterias). Los conidios adheridos de EH-506/3 fueron más abundantes

comparados con EH-520/3. A las 6 h (Figuras 33 a 35), los conidios de los dos aislados mostraron una matriz extracelular que aparentemente les dió una mayor capacidad de adherencia. Las ninfas tratadas con EH-520/3 mostraron una mayor cantidad de matriz, aún lejos de los conidios, en la zona del orificio vasiforme. Dicha matriz contenía pequeñas piezas de la cutícula que ya había sido degradada. También pudieron observarse conidios que habían comenzado a germinar. Las ninfas tratadas con EH-506/3, mostraron un gran daño cuticular en el área cercana al sitio donde fueron depositados los conidios. Asimismo, a las 6 h, las ninfas tratadas con EH-520/3 mostraron también daño cuticular, pero menos severo que el mostrado por las ninfas tratadas con EH-506/3. Para las 12 h, las ninfas tratadas con EH-506/3 (Figura 36) continuaron mostrando daño cuticular, e incluso huecos en la superficie de la ninfa, la cual estaba cubierta por una matriz extracelular, producida probablemente por este aislado, así como una gran cantidad de desechos cuticulares depositados en la superficie de la ninfa. El desarrollo de las hifas continuó y fue más rápido y denso que el observado para EH-520/3.

A las 12 h, EH-520/3 (Figura 37-40) formó estructuras en la punta de las hifas que eran morfológicamente semejantes a los apresorios. Esas estructuras fueron observadas principalmente cuando las hifas se desarrollaron en el raquis, donde la cutícula cercana a las hifas y a los apresorios estaba acompañada con una delgada matriz extracelular. En esa misma zona, se observó que los tubos germinales estaban orientados hacia huecos de la cutícula. Una capa mucilaginosa fue observada en la cercanía de las hifas y de las estructuras parecidas a apresorios, a las 12 h de incubación con EH-520/3. También se observó la penetración de la

cutícula y una zona ligeramente más clara rodeando el apresorio. A las 18 h, EH-506/3 mostró crecimiento micelial y conidios con tubos germinales largos, embebidos en una matriz mucilaginosa (Figura 41). También se observó crecimiento hifal de EH-520/3 (Figura 42 y 43) hacia el orificio vasiforme, y penetración de las hifas a través de dicha área. En algunos casos pudo observarse la penetración directa de la cutícula sin estructuras semejantes a apresorios. Una matriz mucilaginosa también se observó cubriendo las hifas. A las 24 h, las hifas y los apresorios de EH-506/3 (Figura 44) aparentemente penetraron a través de la zona del orificio vasiforme. Las ninfas tratadas con EH-520/3 (Figura 45) mostraron un crecimiento hifal denso, cubierto con la misma matriz mucilaginosa de la superficie de la ninfa. En la zona del orificio vasiforme se observaron apresorios bien desarrollados, así como hifas penetrantes, así como fiálides en la punta de las hifas de ambos aislados.

A las 48 h, las ninfas tratadas con EH-506/3, estaban densamente colonizadas con micelio, debajo del cual, podía verse una matriz mucilaginosa delgada, así como daño y huecos en la cutícula. Interesantemente, pudo observarse la producción de conidios (Figura 46).

El mismo tipo de crecimiento se observó con EH-520/3. A las 60 h, los aislados habían completado su ciclo de vida y el hongo había emergido de los cadáveres de las ninfas.

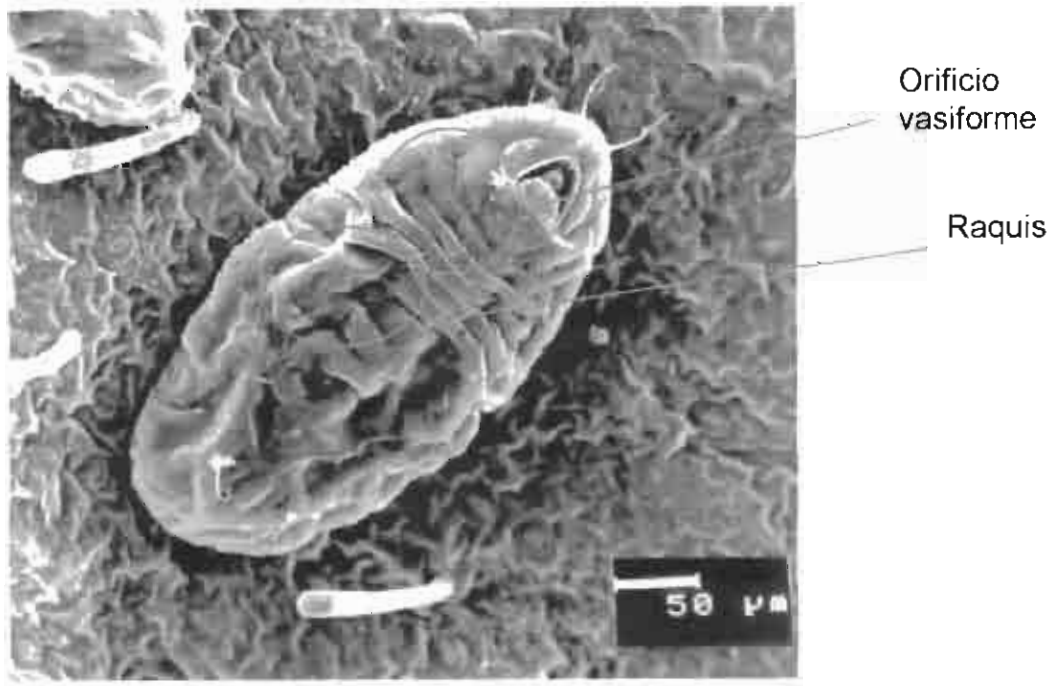


Figura 29. Ninfa testigo de *Trialeurodes vaporariorum* sin inocular

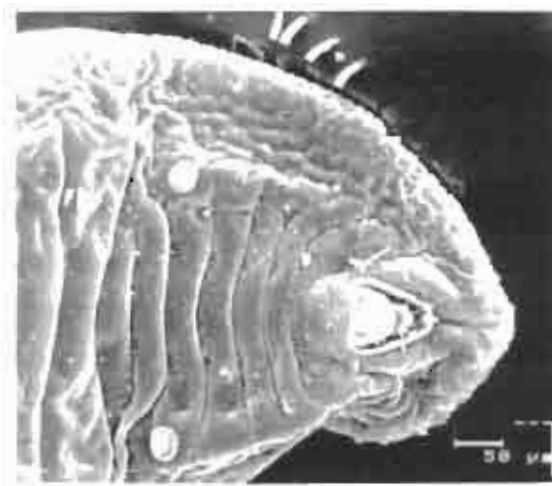


Figura 30 . Conidios de EH-506/3 a 0 h de incubación sobre la zona del raquis.



Figura 31. Conidios de EH-506/3 a 0 h de incubación. Obsérvese la presencia de una ligera capa de mucilago sobre los conidios (en un círculo). La flecha muestra la microflora de la mosquita.

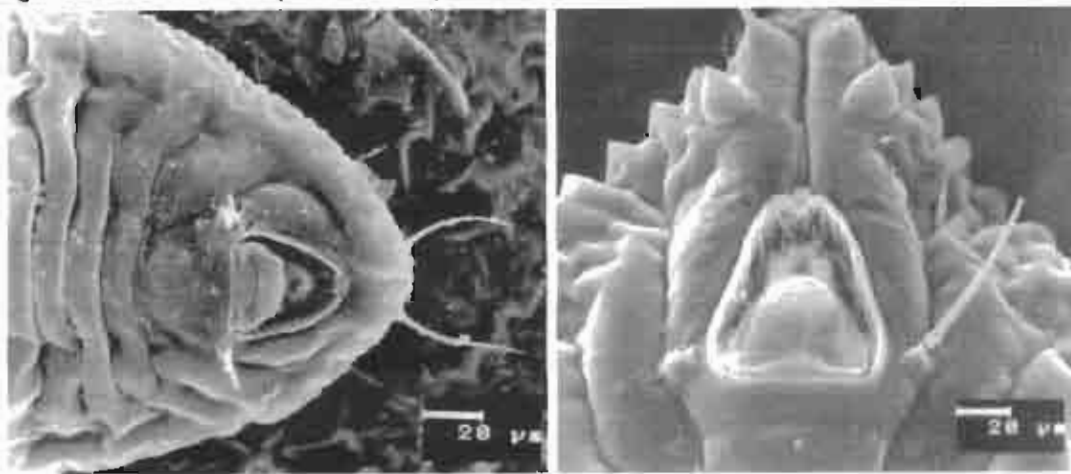


Figura 32. Conidios de EH-520/3 a 0 h de incubación. Los conidios se encuentran en la zona del orificio vasiforme. La flecha señala su posición exacta.

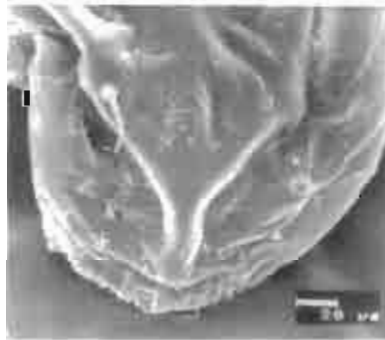


Figura 33. Conidios de EH-506/3 a las 6 h de incubación. Obsérvese una gran cantidad de conidios, presumiblemente adheridos ya a la cutícula (en el círculo).



Figura 34. Conidios de EH-520/3 a las 6 h de incubación. La flecha señala una ligera capa de mucilago adyacente a los conidios.

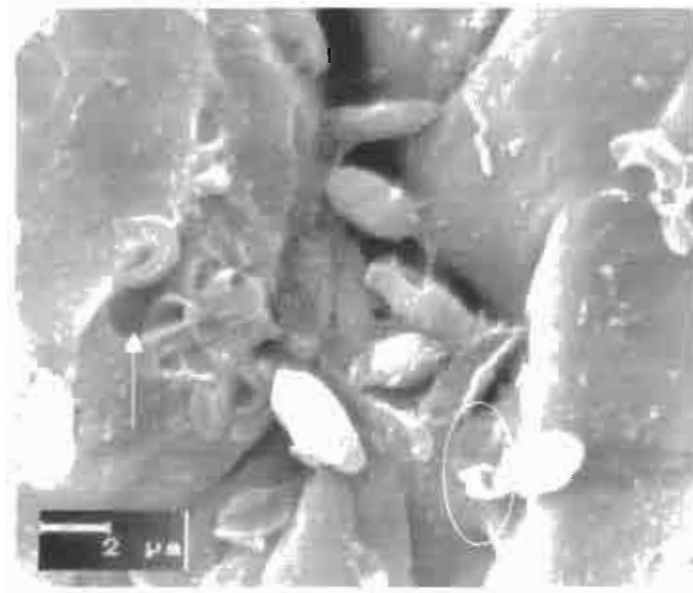


Figura 35 . Daño cuticular provocado por EH-520/3 a las 6 h de incubación. La flecha señala huecos producidos presumiblemente por las enzimas del hongo. El círculo muestra la capa mucilaginosa producida por el hongo.

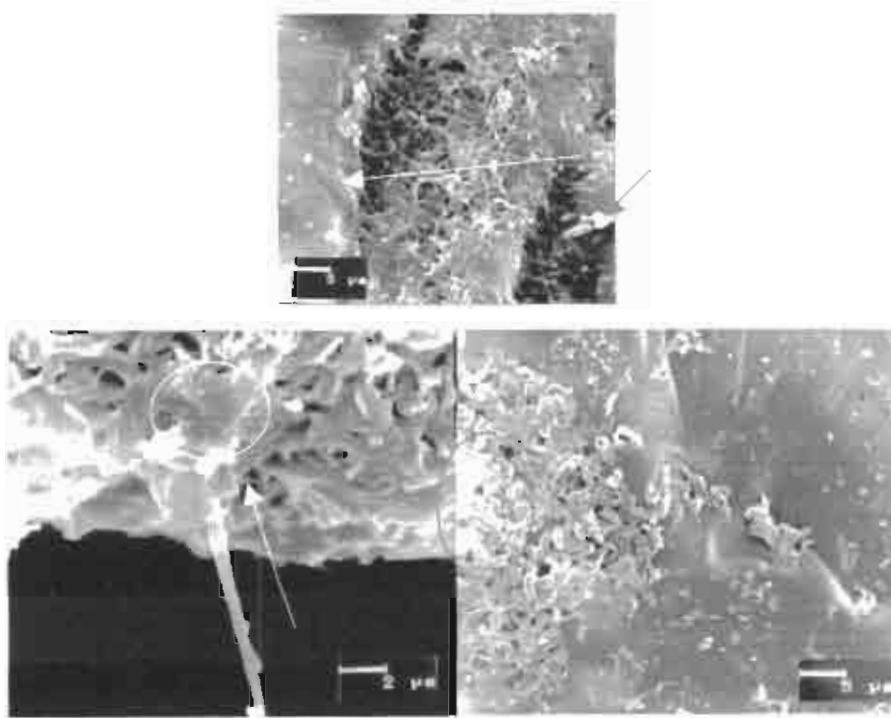


Figura 36. Daño cuticular provocado por EH-506/3 a las 6 h de incubación. Las estructuras fúngicas no son visibles, con excepción del apresorio señalado con la flecha azul. Sin embargo, puede observarse la presencia de una capa de mucilago (círculo), así como huecos (flecha en blanco), presumiblemente provocados por la acción enzimática.

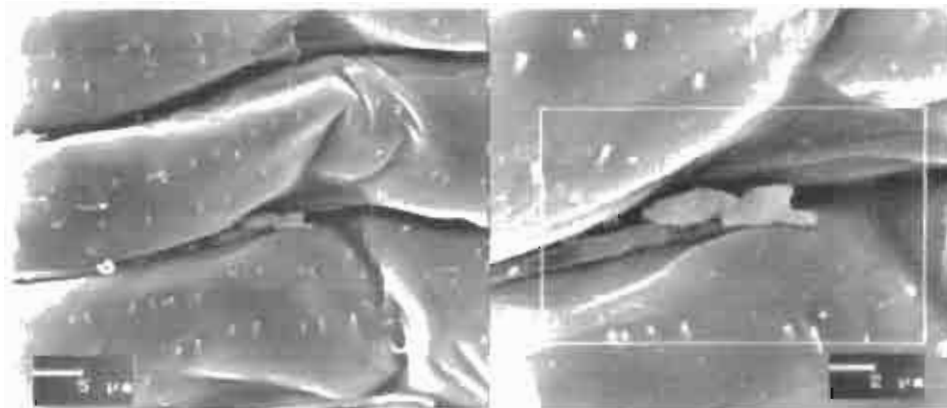


Figura 37. Estructura de EH-520/3 que semeja un apresorio a las 12 h de incubación. El apresorio se formó un pliegue de la zona del raquis.

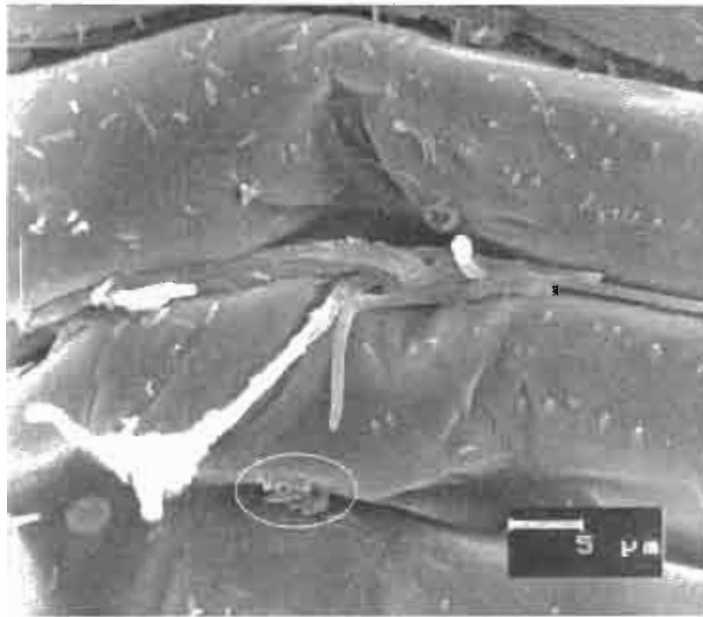


Figura. 38. Hifa de EH-520/3 dirigiéndose hacia un hueco de la cutícula a las 12 h de incubación. La flecha señala el hueco. El círculo señala un daño cuticular aparentemente producido por el hongo.



Figura 39. Matriz mucilaginosa que cubre a hifas de EH-520/3 a las 12 h de incubación. El recuadro señala la hifa cubierta de la matriz, así como una extensión de ésta sobre la cutícula del insecto, relativamente lejana de la estructura fúngica.

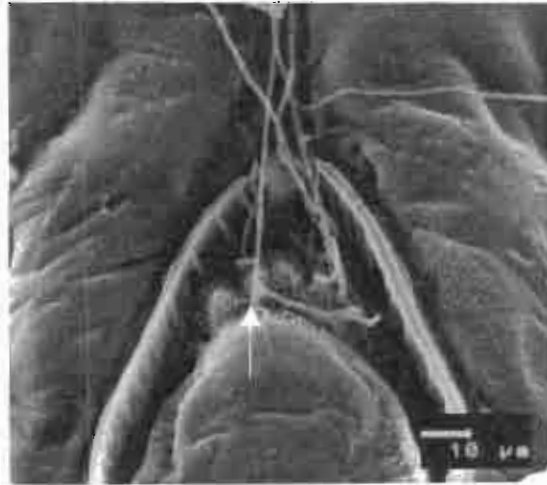
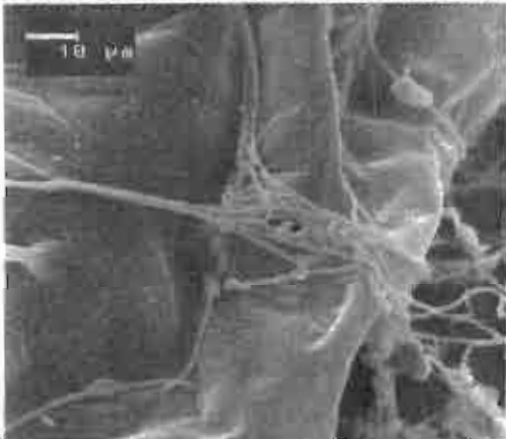


Figura 40. Crecimiento micelial de EH-506/3 a las 18 h de incubación. Observé la penetración del hongo a través del orificio vasiforme (flecha).



Figura 41. Hifas de EH-506/3 a las 18 de incubación. La flecha muestra una capa de mucílago sobre



las hifas.

Figura 42. Hifas de EH-506/3 penetrando directamente la cutícula a las 24 h de incubación. El círculo señala el sitio donde una hifa está penetrando.

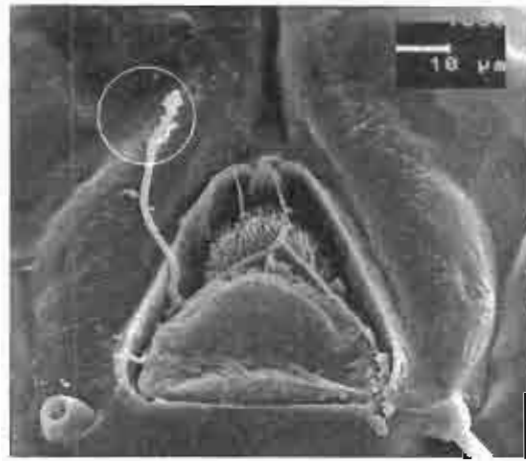


Figura. 43. Crecimiento de EH-506/3 a través del orificio vasiforme a las 24 h de incubación. El círculo señala una estructura semejante a una fláide.

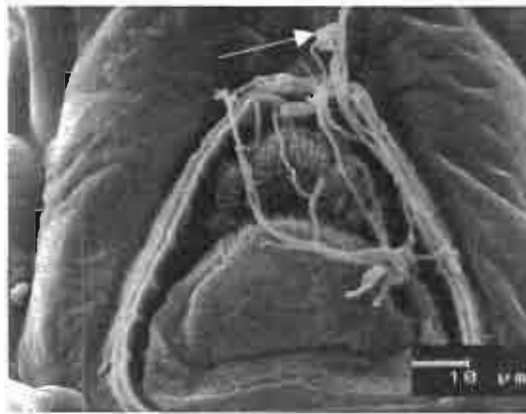


Figura 44. Crecimiento de EH-520/3 a través del orificio vasiforme a las 24 h de incubación. La flecha señala una estructura semejante a una fláide.

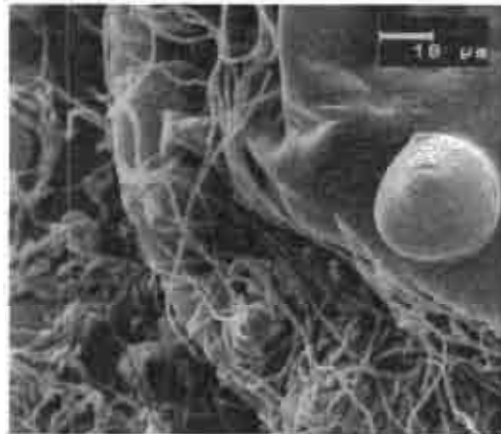


Figura 45. Crecimiento de EH-520/3 en la superficie de la ninfa a las 24 h de incubación. Obsérvese la orientación de las hifas hacia la superficie de la ninfa

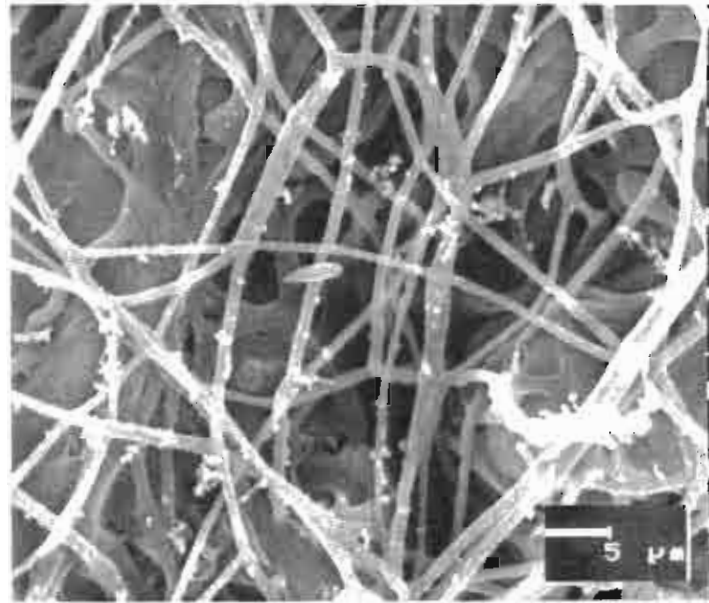


Figura 46. EH-506/3 creciendo en la superficie de la ninfa a 48 h de incubación. Obsérvense los huecos y la presencia de mucílago sobre la cutícula. Sobre el micelio pueden conidios desprendidos

Microscopia electrónica de Transmisión (MET)

Se corroboró la unión al anticuerpo monoclonal contra la aglutinina de germen de trigo, al hacer ensayos de DOT ELISA y obtener resultados positivos al reaccionar el anticuerpo con avidina-peroxidasa y no obtener reacción con las proteínas de referencia utilizadas. El anticuerpo entonces se utilizó para detectar las quitinasas de EH-506/3.

A las 6 h de incubación, el hongo había penetrado la pared de la ninfa (Figura 47-51), y se pudo observar claramente la presencia de hifas que estaban más allá de la pared de la mosquita (figura 49), así como estructuras esféricas, probablemente blastosporas en el tejido de la ninfa. Sin embargo, no se observó una gran cantidad de marcas de oro coloidal que señalaran la quitinasa.

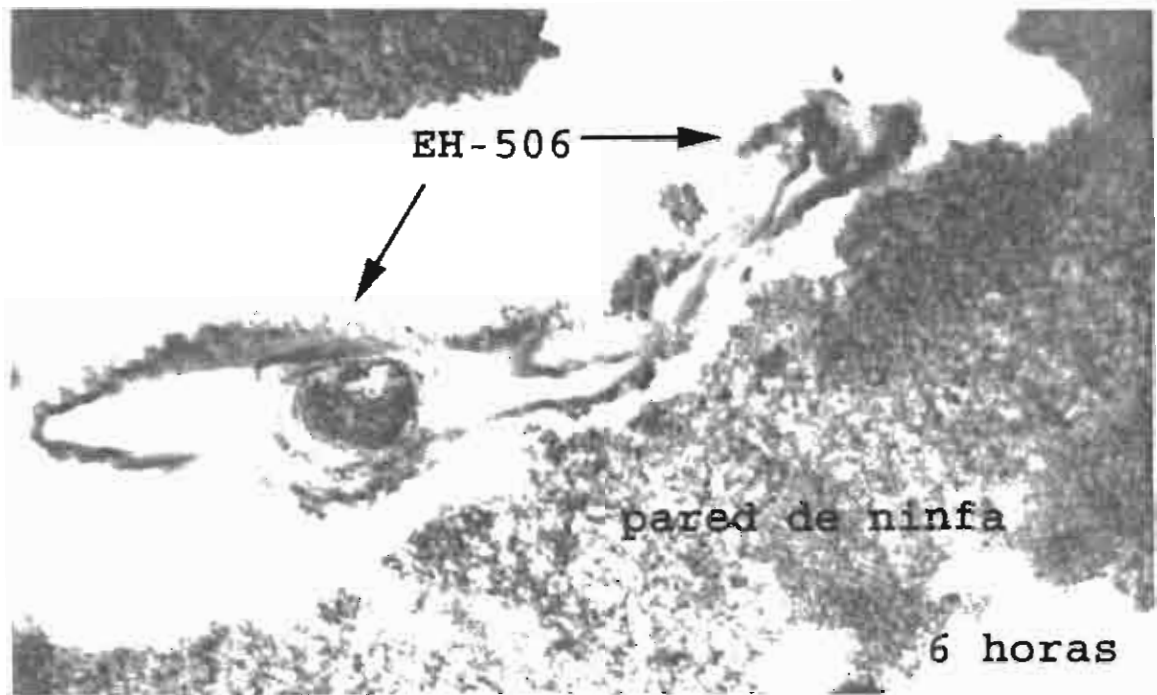


Figura 47. Penetración de EH-506/3 a las 6 h de incubación. Obsérvese la estructura fúngica adyacente a la pared de la ninfa.

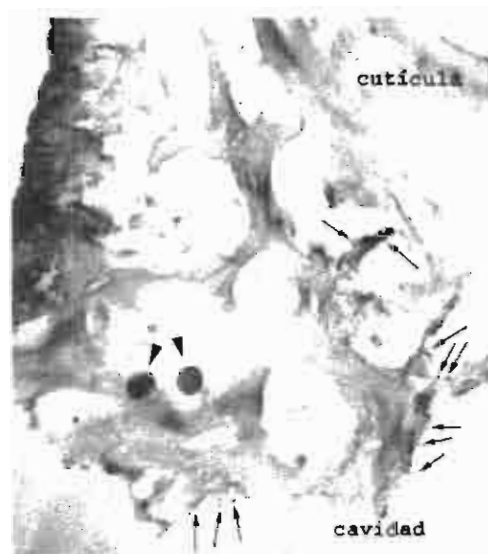


Figura 48. EH-506/3 penetrando a la ninfa a las 6 h. Las flechas señalan el sitio de unión del anticuerpo biotinilado con la quitinasa. Las puntas de las flechas señalan estructuras fúngicas cercanas a la cavidad de la ninfa.



Figura 49. Corte transversal de las estructuras fúngicas de EH-506/3 penetrando a ninfa de mosquita blanca. Las flechas señalan las estructuras que ya han pasado la pared de la ninfa.

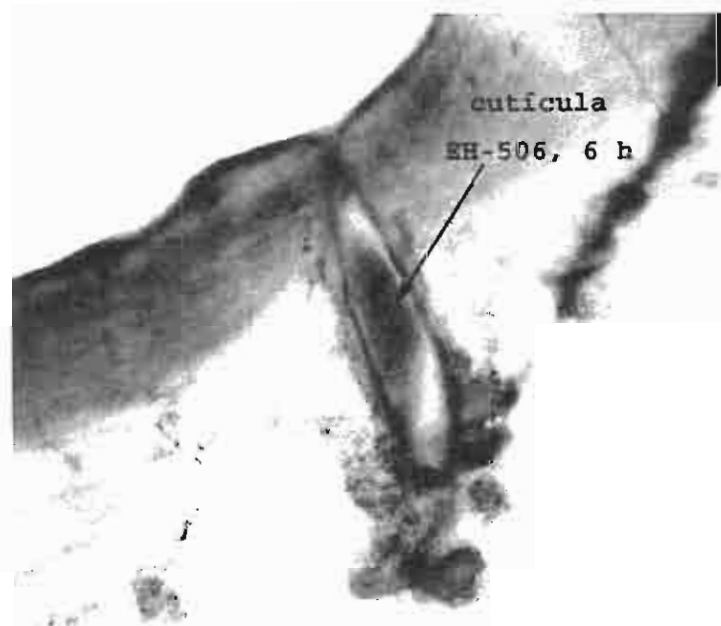


Figura 50. Hifa de EH-506/3 penetrando la cuticula de *T. vaporariorum*. El mayor contraste observado puede ser indicador del daño de la pared de la ninfa provocado por la penetración del hongo.

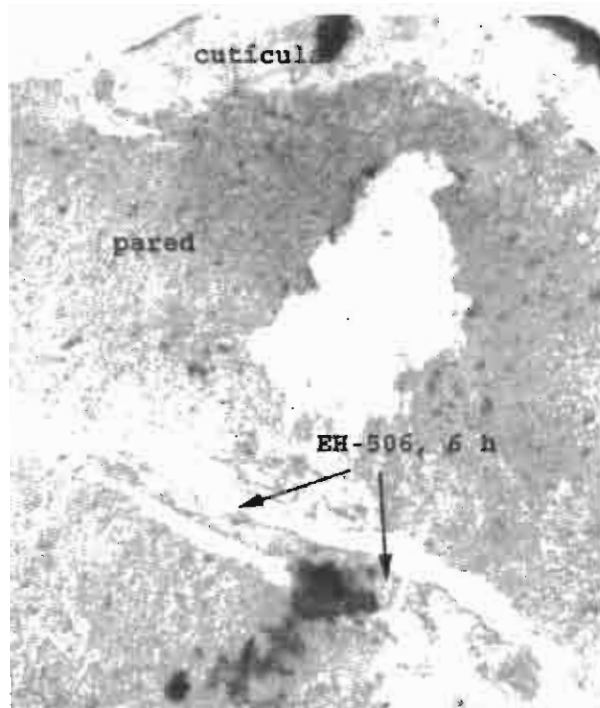


Figura 51. Aspecto de las hifas de EH-506/3 penetrando la mosquita blanca a las 6 h de incubación.

DISCUSIÓN

Debido a que es la primera vez que se determinan proteasas tipo tripsina (Pr1) y tipo subtilisina (Pr2) en *P. fumosoroseus* (Castellanos-Moguel *et al.*, 2006), se tuvieron que adaptar y modificar las condiciones de medición de estas enzimas descritas para otros hongos entomopatógenos, en especial para *M. anisopliae* (Gillespie *et al.*, 1998).

La actividad proteolítica total se detectó por el método de la azocaseína (Sarath *et al.*, 1989), ya que este es un método colorimétrico que permitió detectar la presencia de cualquier tipo de proteasas en el sobrenadante del cultivo. Este método, por tener su máxima absorbencia a los 440 nm, no mostró interferencias causadas por compuestos que pudiera haber producido el hongo al mismo tiempo, como la toxina beauvericina (Kleinkauf y van Dören, 1987).

Se tomaron muestras cada 6 h durante las primeras 24 h del experimento, debido a que en la literatura consultada (St. Leger *et al.*, 1987), se menciona que las primeras horas de cultivo es el momento en el que aparecen las proteasas en el sobrenadante, posteriormente, las muestras se espaciaron a cada 12 h hasta las 96, y a partir de ese momento, se tomaron cada 24 h, debido a que no se detectaba una actividad proteolítica alta. Durante las primeras 96 h, dicha actividad se mantuvo más o menos constante para los tres aislados y osciló entre las 3 y 10 UP/ml. Esta actividad relativamente baja, pudo deberse a los componentes del medio de cultivo, ya que las proteasas de *M. anisopliae* están sujetas a la represión por la cantidad de nitrógeno presente en el medio de cultivo (Paterson *et al.* 1993, 1994a y 1994b). Por

otra parte, las proteasas extracelulares de ciertos hongos, se producen tardíamente, como lo señala López-Llorca (1990) para *V. suchlasporium*, el cual produce proteasas alcalinas con un máximo de actividad a los 12-14 días de incubación.

Debido a que en la bibliografía consultada no se encontró una técnica para medir la actividad de Pr1 y Pr2 específicamente en *P. fumosoroseus*, se montó la técnica de acuerdo a lo propuesto por Gillespie *et al.* (1998) para la Pr1 y Pr2 de *M. anisopliae*. El montaje de la técnica se realizó con un solo aislado, EH-506/3, ya que presentó la actividad de proteasas totales más rápidamente. Se hicieron algunas modificaciones, como el uso de Tris en la mezcla de reacción de la determinación de la actividad, ya que las propiedades de las enzimas que degradan la cutícula pueden no ser las óptimas para todos los hospedantes o medios donde se están produciendo (Gillespie *et al.*, 1998). La actividad de Pr1 y Pr2 también es sensible a los cambios de pH, ya que *M. anisopliae* presenta disminuciones de actividad enzimática conforme el pH baja (St. Leger *et al.*, 1998), de ahí la importancia de elegir el amortiguador mas adecuado para determinar la actividad de *P. fumosoroseus*.

Los resultados obtenidos de las dos composiciones de la mezcla de reacción (con Tris y Tris-HCl), mostraron una mayor actividad cuando la enzima estuvo en presencia de Tris, por lo que se decidió utilizar dicho amortiguador para las determinaciones de Pr1 y Pr2 con los tres aislados.

Otro parámetro que se modificó ligeramente fue el tiempo de incubación de la mezcla de reacción de la enzima, ya que se midió la actividad de Pr1 cada min durante 5 y a partir de ese tiempo, se decidió que el más adecuado fue 1 min, ya que

se obtuvo la mayor actividad. El tiempo de incubación obtenido para *P. fumosoroseus* es semejante al observado para *M. anisopliae* (Gillespie *et al.*, 1998).

Las actividades enzimáticas de Pr1 que se obtuvieron con los dos reguladores y con los diversos tiempos de incubación, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y a una comparación de medias, pero sin embargo, estadísticamente no hubo una diferencia significativa, por lo que se compararon los resultados de los estudios cinéticos para cada caso. De acuerdo con esto, se decidió utilizar regulador Tris y establecer en 1 min el tiempo de incubación de la reacción, para entonces trabajar con los otros dos aislados EH-503/3 y EH-520/3.

La actividad de Pr1 observada en el presente estudio, tuvo actividad contra caseína. Dicha actividad se presentó después de las 96 h, probablemente por la riqueza del medio. En *M. anisopliae*, se ha detectado la actividad de Pr1, y se le ha descrito como una buena proteasa general con actividad contra un espectro amplio de proteínas, tales como caseína, elastina, albúmina sérica bovina, colágeno y las proteínas presentes en la cutícula de los insectos (Braga *et al.*, 1994). Peptidasas análogas han sido encontradas en filtrados de cultivo de *B. bassiana*, *V. lecanii*, *N. nileyi* y *A. aleyrodís* (Charnley y St Leger, 1991, Bidochka *et al.*, 1999).

Las actividades obtenidas en el estudio cinético de Pr1, sugieren que es una enzima inducible. La aparición tardía sugiere una represión por todos los productos nitrogenados (peptona y extracto de levadura) presentes en el medio de cultivo (Paterson *et al.* 1993, 1994a y 1994b). En *M. anisopliae*, se ha descrito a Pr1 como una enzima inducible, con un mecanismo de represión-inducción por carbono y nitrógeno (Screen *et al.*, 1997).

Las altas y bajas de actividad enzimática observadas en este estudio, podrían deberse a que se detectó actividad simultánea de isoenzimas. Pr1 de *M. anisopliae* ocurre como múltiples isoenzimas (Joshi *et al.*, 1997, St. Leger *et al.*, 1994); se han identificado a la fecha once genes que codifican para isoformas de Pr1 (Pr1A- Pr1J, Pr1G-K) (Freimoser *et al.*, 2003), los cuales han sido detectados en una base de datos de "Expressed Sequence Tag" (EST), indicando que todos son expresados y presumiblemente funcionales. La presencia de un número excepcionalmente grande de isoenzimas de subtilisina está presumiblemente relacionado a la patogenicidad de *M. anisopliae*. Según Shimizu *et al.* (1993), el mecanismo de regulación de proteasas de *B. bassiana* es desencadenado por los mismos componentes cuticulares del insecto, ya que la producción de proteasas disminuye cuando la proteína cuticular ha sido degradada y la quitina ha quedado al descubierto. Es entonces cuando ésta última actúa como un inductor para las quitinasas, las cuales comienzan a producirse en mayor cantidad.

Probablemente las diferentes actividades enzimáticas reflejan la actividad conjunta de diferentes isoformas, algunas de las cuales pueden estar apareciendo y desapareciendo conforme el hongo va degradando el sustrato (St. Leger *et al.*, 1987; Chul-Kang *et al.*, 1998). Las subtilisinas de amplio espectro son las principales proteínas producidas por *M. anisopliae* y otros entomopatógenos durante la infección y la degradación de la cutícula de los insectos (St. Leger, 1995).

En el presente estudio se observó una producción característica de Pr1 para cada uno de los aislados, reflejando variación intraespecífica, la cual podría estar asociada con diferencias adaptativas, como ha sido señalado para otros

entomopatógenos (St. Leger *et al.*, 1987; Bidochka y Khachatourians, 1994; Freimoser *et al.*, 2003). En un estudio previo de caracterización genotípica, con aislados de México y cepas de referencia de *P. fumosoroseus*, se observó que los primeros se relacionaron formando un solo grupo, no obstante, entre ellos mostraron una gran variabilidad genotípica (Cavallazi-Vargas, 2002), lo que apoya la variación intraespecífica observada en nuestro estudio.

Los tres aislados estudiados también mostraron actividad de Pr2, sin embargo, la actividad, cuando se comparó con la de Pr1, fue mucho más baja y relativamente constante durante el ensayo. Los resultados sugieren que Pr2 es una enzima constitutiva, ya que a pesar de la gran cantidad de compuestos nitrogenados en el medio, no presentó una aparente represión de actividad, ni un aumento de la misma.

Una actividad baja y constante de Pr2 ha sido reportada para *M. flavoviride* cultivado en medio mineral con cutícula de langosta (*Rhammatocerus schicercoides*) o caseína, por Silva-Pinto *et al.* (2002). Se ha señalado que Pr2 es una enzima constitutiva pero reprimible en *M. anisopliae* dependiendo de los niveles de carbono y nitrógeno del medio de cultivo (Paterson *et al.*, 1993) y probablemente también lo sea en *P. fumosoroseus*. La actividad de Pr2 en el presente estudio, se detectó en un medio con caseína. La tripsina Pr2 de *M. anisopliae* tiene gran actividad contra proteínas cuticulares solubilizadas y caseína (St. Leger *et al.*, 1987). Estas enzimas podrían estar involucradas en los mecanismos de control celular como la diferenciación, catalizando procesos proteolíticos específicos de activación e inactivación, y está aparentemente regulada por el nitrógeno presente en el medio de cultivo (Paterson *et al.*, 1993). Esa regulación por nitrógeno podría explicar los bajos

niveles de enzima observados en *P. fumosoroseus*. Sin embargo, probablemente esté menos sujeta que Pr1 a la represión por catabolitos ya que Charnley (2003), señala que Pr2 quizás no tenga un papel preponderante en la penetración fúngica, aunque podría complementar la acción de Pr1, proveyendo péptidos para la nutrición (Paterson *et al.*, 1993).

Las quitinasas de nuestro estudio se produjeron en medio sintético con quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol, por lo que pudo medirse la actividad directamente a partir de los sobrenadantes colectados. La actividad de quitinasas observada, difiere de la actividad obtenida en estudios previos para estos mismos aislados (Castellanos-Moguel *et al.*, 2001a y 2001b). Dicha variación puede atribuirse a que los aislados fueron cultivados previamente en medio sintético con agar adicionado con chapulín molido (Orthoptera: Acrididae) al 1 o 2% antes de la siembra en medio de glucosa Sabouraud para la obtención de los conidios que se utilizaron para los estudio cinéticos, tanto de proteasas como de quitinasas. La máxima actividad de quitinasas de los tres aislados fue observada después de las 168 h, lo cual coincide con Chul-Kang *et al.* (1998), que señalan que las quitinasas se producen en la última fase del crecimiento en cultivo sumergido. Se detectó un mínimo de actividad de quitinasas en el momento en que los matraces se sembraron con los conidios de EH-506/3, lo que podría señalar una actividad de dichas enzimas en los conidios. Este hecho ya ha sido reportada en conidios y conidios con tubos germinales de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi* (Smith y Grula, 1983; Coudron *et al.*, 1984).

El estudio cinético de las quitinasas de *P. fumosoroseus* sugiere que son enzimas inducibles por los componentes del medio, específicamente la quitina, mencionado también en *M. anisopliae* (Barreto *et al.*, 2004). Krieger de Moraes *et al.* (2003) realizaron experimentos de inducción de quitinasas con diversos sustratos y señalaron que la N-acetilglucosamina es el inductor específico para las quitinasas de *M. anisopliae*. García-Juárez *et al.* (1999), señalan que *V. lecanii* produce una mayor cantidad de N-acetil- β -glucosaminidasas que otras enzimas, cuantificadas con APIZYM, las cuales también podrían estar presentes en otros entomopatógenos como *P. fumosoroseus*. Cohen-Kupiec y Chet (1998) obtuvieron quitinasas de *Trichoderma* cuando lo cultivaron en medio con quitina como inductor.

Además del estudio de actividades enzimáticas específicas de *P. fumosoroseus*, también se investigó al mismo tiempo la transición conidio-blastospora en dos medios de cultivo: medio H adicionado con caseína al 1% y medio sintético con quitina coloidal. En ambos medios de cultivo, se observó la aparición de blastosporas típicas, así como de cuerpos hifales antes de 96 h de incubación. Las blastosporas ya habían sido obtenidas por otros autores para *P. fumosoroseus*. En diversos artículos, se señala la aparición de blastosporas durante las primeras 96 h de cultivo (Vidal *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1999; Altre y Vandenberg, 2001; Jackson *et al.*, 2003, Vega *et al.*, 2003). Sin embargo, en este trabajo, se describió con detalle el tiempo de aparición de los diversos propágulos, así como las diferencias observadas entre aislados de distinta virulencia de la misma especie.

P. fumosoroseus ha sido descrito como un hongo que puede crecer y esporular en una gran cantidad de fuentes de carbono y de nitrógeno (Cliquet y Jackson, 1999). En el presente estudio, las blastosporas fueron obtenidas en un medio rico (H), con sacarosa y glucosa, y varias fuentes de nitrógeno, tales como caseína, peptona y extracto de levadura. Sandoval-Coronado *et al.* (2001), encontraron una cantidad similar de blastosporas (5×10^7 a las 72 h) a las encontradas por nosotros con la cepa 612 de *P. fumosoroseus* en un medio suplementado con glucosa, peptona y extracto de levadura. Prerenová (1995) señala que el medio óptimo para la germinación de *P. farinosus*, contiene peptona. Jackson *et al.* (2003) obtuvieron grandes cantidades (6.0×10^8) de blastosporas de *P. fumosoroseus* resistentes a la desecación en un fermentador con un medio que contenía caseína. Issaly *et al.* (2005) observaron grandes cantidades de blastosporas de *M. flavoviride* ($1-5.4 \times 10^8$ blastosporas/ml) usando una elevada concentración de nitrógeno y baja de carbono en el medio de cultivo.

En nuestro estudio también se obtuvo una producción de propágulos en un medio rico, que asemeja las condiciones nutrimentales que encuentra el hongo cuando entra en contacto con la cutícula del insecto, esto es, el medio sintético con quitina coloidal. En este medio se observaron además de las blastosporas, cuerpos hifales. A la fecha, no se conoce un reporte de estructuras levaduriformes en medios de cultivo con cutícula de insecto o quitina coloidal. Con los tres aislados (EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3) en medio sintético con quitina coloidal, se observó un cambio de forma en menos tiempo que en medio H, lo cual probablemente se deba a la quitina coloidal ya que la cantidad de carbono y nitrógeno es semejante a la que

contiene la cutícula de los insectos. Es probable que este rápido cambio dimórfico sea inducido por la presencia de ciertos compuestos derivados de la quitina coloidal a partir de la esterilización, como por ejemplo, oligómeros de quitina producidos por el tratamiento térmico, ya que se ha demostrado que *M. anisopliae* requiere nutrientes solubles en agua provenientes de la cutícula del hospedante para germinar y desarrollarse (Wang y St. Leger, 1995). Braga *et al.* (1999) señalan que la N-acetilglucosamina acelera la germinación del hongo. El rápido cambio de forma en medio con quitina, podría ser explicado también porque la formación de blastosporas no siempre es dependiente del agotamiento de los nutrientes, sino de la cantidad de nitrógeno en el medio (Jackson *et al.*, 1997). Esto pudo ser observado en el presente estudio, ya que en medio H con caseína hubo crecimiento de tubos germinales y luego de la aparición de los mismos, comenzaron a observarse las blastosporas. En cambio, en el medio sintético con quitina, se observó una transición más rápida. Daigle *et al.* (1998) obtuvieron blastosporas típicas en 3 días, al incubar *P. fumosoroseus* en un medio basal de sales con glucosa y casaminoácidos. En nuestro estudio, se usó también un medio de sales, pero lo que aparentemente indujo la transición rápida fue la presencia de la quitina coloidal. Utilizando este medio se observó que el aislado más virulento EH-506/3 fue el que mostró la mayor rapidez en la transición a blastosporas, seguido por los aislados de mediana y baja virulencia. Esa relación entre rapidez de transición y virulencia ha sido observada en el hongo dimórfico patógeno de humanos *Histoplasma capsulatum*, Las cepas de este hongo de alta y mediana virulencia expresan el gen *yps3* que les permite adaptarse a aumentos de temperatura cambiando rápidamente de forma (Keath *et*

al., 1989). En *M. anisopliae*, se han señalado varios factores nutrimentales que influyen para una rápida germinación, y dichos factores dependen del insecto del cual fue obtenida la cepa (St. Leger *et al.*, 1994).

P. fumosoroseus tiene una gran plasticidad fenotípica (Vandenberg y Cantone, 2004) reflejada en las diversas formas obtenidas en cultivo *in vitro*. Se ha demostrado que *M. anisopliae*, cuando se cultiva en un medio de sales con gelatina, tiene un aumento en la producción de proteasas extracelulares conforme se produce micelio aéreo y la producción de las enzimas proteolíticas disminuye conforme aumenta la concentración de blastosporas (Bidochka y Melzer, 2000). Esto podría explicar nuestras observaciones, ya que la producción de blastosporas se realizó de manera simultánea en medios donde se estudiaron las enzimas extracelulares, y durante las primeras 96 h de cultivo en medio H con caseína, se observó una gran cantidad de blastosporas, pero la actividad enzimática permaneció baja. Al comenzar a aumentar las pelotillas de micelio, se observó también un aumento en la actividad, tanto de proteasas totales, como de Pr1 y Pr2. En el medio de quitina coloidal, se observó un fenómeno parecido, ya que la mayor cantidad de blastosporas se obtuvieron dentro de las primeras 72 h de cultivo, y las enzimas alcanzaron su máxima actividad hasta las 312 h.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la transición dimórfica de aislados de *P. fumosoroseus* de México, se sugiere que la germinación de los conidios es seguida de la formación de tubos germinales o producción directa de blastosporas. A partir de los tubos germinales, se producen blastosporas y cuerpos hifales, los cuales a su vez, dan origen a nuevos cuerpos hifales o a conidios sumergidos (Figura 18).

Dichos conidios sumergidos y blastosporas originan hifas que se agrupan en pelotillas de micelio, o bien, pueden formarse también blastosporas directamente de los conidios. Este modelo corresponde al propuesto por Fargues *et al.* (1994), donde proponen que la germinación de los conidios tiene tres pasos: pregerminación, hinchamiento y emergencia de uno o varios tubos germinales, y éstos, varían fuertemente dependiendo de las condiciones ambientales, ya que la diferenciación vegetativa de un tubo germinal podría consistir en el crecimiento micelial en forma de hifas, o la multiplicación celular por gemación, o llevar a la formación de conidios por conidiación microcíclica.

En cuanto al tamaño y forma de las blastosporas obtenidas, la relación largo-ancho de los propágulos de EH-506/3 y EH-503/3 entre las 36 y 96 h en los dos medios de cultivo probados, y para EH-520/3 entre las 48 y 96 h, también en ambos medios, fueron similares a los diámetros modales obtenidos por Vidal *et al.* (1998), usando medio Goral (4.28 mm) a las 96 h, y medio Jackson, Catroux y Paris (6.07 mm) a las 48 h.

Otro parámetro de singular relevancia en los hongos entomopatógenos es la virulencia de los aislados hacia el insecto plaga (Vidal *et al.*, 1999), ya que incide directamente en su control.

Los tres aislados probados mostraron ser virulentos contra la mosquita blanca en este estudio, el ICDF permitió la observación de la inducción del crecimiento fúngico por las ninfas, como lo observaron Landa *et al.* (1994) para *P. fumosoroseus* cuando infectó a *Bemisia argentifolii*. Los conidios de EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3 fueron capaces de adherirse a la cutícula del insecto, germinar y producir una

infección. Los valores más altos del ICDF alcanzados en diferentes tiempos, mostraron variaciones en la virulencia entre los aislados estudiados. Con base en los resultados pudo determinarse que el aislado más virulento fue EH-506/3 ya que alcanzó el ICDF más alto en menor tiempo. Los valores del ICDF, así como valores previos de CL_{50} (Castellanos-Moguel *et al.*, 2001b) lo confirmaron. El aislado que siguió en virulencia fue EH-503/3 y por último EH-520/3. Entre las 6 y 96 h, los tres aislados se adhirieron, germinaron, penetraron las ninfas y posteriormente esporularon en su superficie. Este desarrollo es más rápido que aquel señalado por Landa *et al.* (1994) para *P. fumosoroseus* colonizando *B. argentifolii*, y el de Askary y Brodeur (1999) para *V. lecanii* creciendo en el áfido *Marcrosiphum euphorbiae*. Para *P. fumosoroseus* se han observado tiempos letales medios de hasta 240 h cuando infecta *Boophilus annulatus* (Gindin *et al.*, 2001). Se observaron diferencias entre el ICDF obtenido por nosotros y el ICDF obtenido por otros autores. *V. lecanii* infectando mosquita blanca, alcanzó un índice de 2 (García-Juárez *et al.*, 1999) a las 48 h de incubación, en el presente estudio EH-506/3, el aislado más virulento, presentó ese mismo valor (2) a las 18 h. Las variaciones en virulencia pueden deberse a muchos factores, tanto del entomopatógeno, como por la fisiología del insecto (Jaramillo y Borgemeister, 2005) y su estado nutricional (Tefera y Pringle, 2003).

La infección de las ninfas con el aislado EH-506/3 presentó poca producción micelial, lo que de acuerdo con Vey *et al.* (2001) sugiere la intervención de toxinas, como la beauvericina o beauverolido. Después de la muerte del hospedante, el

hongo crece abundantemente en la superficie del insecto, lo que sugiere entonces un crecimiento de tipo saprobio (Charnley, 2003).

Las ninfas infectadas con EH-503/3 mostraron un crecimiento micelial más abundante en comparación con EH-506/3. A las 36 h de la infección, la cutícula ninfal estaba severamente deformada, y a las 96 h, estaba completamente destruida con el aislado EH-503/3. Este aislado posee una alta producción de quitinasas (Castellanos-Moguel et al., 2001a), lo que sugiere una hidrólisis enzimática (Charnley, 2003). Además de las proteasas, las quitinasas también han sido implicadas como determinantes de patogenicidad en hongos que atacan insectos. Por ejemplo, cepas hiperproductoras de quitinasa de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* han aumentado su virulencia hasta en 50% (Gupta et al, 1994; Resi-Bogo et al., 1998; Hernández-Torres et al., 2004; Fang et al., 2005). Las ninfas infectadas con los otros dos aislados no mostraron deformaciones cuticulares tan notorias. El aislado EH-520/3 de menor virulencia, se desarrolló muy despacio en comparación con los otros dos aislados, sin embargo, su esporulación en la cutícula ninfal fue muy abundante. Wang et al. (2003) han propuesto dos estrategias de virulencia para *M. anisopliae*. La primera, en la cual existe un crecimiento limitado del hongo, pero gran producción de toxinas que desencadenan la muerte del hospedante. La segunda, con crecimiento fúngico muy copioso, provocando un rompimiento de la homeostasis por deficiencia de nutrimentos que desencadena la muerte del hospedante. En nuestro estudio se observó un patrón similar, el aislado virulento EH-506/3 no presentó un crecimiento abundante en la ninfa, lo que sugiere que presenta la primer estrategia de virulencia (producción de toxinas). En cambio, los aislados EH-503/3 y

EH-520/3, de menor virulencia, tienen un crecimiento micelial más abundante, lo que sugiere la segunda estrategia de virulencia (crecimiento invasivo) de Wang *et al.* (2003).

La virulencia de los tres aislados por ICDF señala una marcada variabilidad intraespecífica. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre aislados, contrastando con los resultados de Poprawski y Jones (2000), donde no encontraron diferencia intraespecífica estadísticamente significativa entre aislados de *P. fumosoroseus* al infectar *B. argentifolii*.

El ensayo de ICDF permitió seleccionar los tiempos óptimos para el estudio de la interacción hongo/hospedante por microscopía electrónica de barrido (MEB) de los dos aislados probados: EH-506/3, muy virulento y con una rápida muerte de la ninfa y EH-520/3, baja virulencia y lenta colonización de la ninfa.

En otros entomopatógenos como *Entomophaga maimaga*, *Paecilomyces*, *Tolyocladium*, *Metarhizium* y *Verticillium* (Jefferis *et al.*, 1999), se ha observado que la interacción conidio-hospedante podría involucrar un complejo de mecanismos de reconocimiento específicos, i.e. glicoproteínas, interacciones ligando-receptor (por ejemplo lectinas) y no específicos, i.e. electrostáticos o hidrofóbicos, fuerzas de Van der Waals (Cotter y Kavanagh, 2000; Doyle, 2000). En hongos patógenos para el hombre, la adherencia de los conidios a tejidos del hospedante está estudiado como un mecanismo importante en la patogenicidad. Las moléculas que intervienen en este proceso han sido el objeto de estudio en varios hongos, como por ejemplo en *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. En el primer hongo se han descrito dos sistemas de adherencia, el primero corresponde a la unión de la laminina y el

fibrinógeno, mediado por una lectina fúngica específica para ácido sialico (27 kDa), el segundo implica la interacción entre dos polipéptidos de 23 y 30 kDa y la fibronectina por su secuencia de tripéptidos Arg-Gly-Asp (Bouchara y Tronchin, 1999). Este mecanismo también ha sido descrito para *Candida albicans* (Hostetter, 2000). Es probable que mecanismos y moléculas análogas se encuentren presentes en la adherencia de los conidios de los hongos entomopatógenos en el hospedante. En nuestro estudio, a las 0 h de infección, los conidios de ambos aislados (EH-506/3 y EH-503/3), mostraron una delgada matriz extracelular, la cual podría contener moléculas proteicas que mediarían en la adhesión, dichas moléculas que confieren cierta hidrofobicidad han sido descritas por Jeffs *et al.* (1999) para conidios de *P. farinosus*.

Las imágenes de MEB del aislado más virulento EH-506/3, mostrando un mayor número de conidios sobre la superficie ninfal sugieren que éstos tuvieron una mayor capacidad de adherencia, probablemente mediada por moléculas relacionadas con la adherencia. Boucias *et al.* (1988) demostraron que los componentes responsables de la interacción hidrofóbica para la adherencia del conidio están localizados a lo largo de la pared celular de los conidios que tienen microfibrillas. Se ha demostrado con *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* y *Verticillium* que la capa de microfibrillas está formada principalmente por hidrofobinas (Kamp y Bidochka, 2002). La adhesión de la espora influencia los eventos de desarrollo subsecuentes manteniendo la espora en la proximidad de la superficie del hospedante y la unión parece a menudo ser requerida para la

transmisión de señales morfogenéticas para la extensión del tubo germinal y el desarrollo de las estructuras de infección (Tucker y Talbot, 2001; Kennedy, 1990).

La interacción de los aislados de mayor (EH-506/3) y menor virulencia (EH-520/3) con las ninfas también se observó en MEB. Las imágenes de MEB mostraron amplias zonas de degradación de la cutícula a las 6 h de incubación con EH-506/3, dichas zonas, probablemente fueron provocadas por la producción de enzimas extracelulares. Estas observaciones son congruentes con lo obtenido en nuestro estudio, ya que *in vitro*, EH-506/3 produce la mayor cantidad de Pr1, enzima determinante de patogenicidad (St. Leger, 1995). EH-506/3, también es el aislado más virulento, como se observó con el ICDF, ya que a las 18 h ya había matado al insecto. El fenómeno de daño cuticular ha sido observado para huevecillos de mosquita blanca tratados con *P. fumosoroseus* (Lacey *et al.*, 1999), pero se presentó hasta las 48 h de incubación. Gran daño estructural sido observado para huevecillos del nemátodo *Meloidogyne javanica*, tratados con proteasas y quitinasas de *P. lilacinus* (Khan *et al.*, 2004). En nuestro estudio, EH-506/3 provocó un intenso daño cuticular y una amplia zona de histolisis en comparación con EH-520/3. Este daño podría haber sido causado por esas enzimas, facilitando la penetración fúngica (Charnley, 2003), como lo señalan St. Leger *et al.* (1987) para *M. anisopliae* cuando penetra a *Manduca sexta* y *Calliphora vomitoria*.

De acuerdo con todos los resultados obtenidos anteriormente, la microscopía electrónica de transmisión (MET) con inmuno-oro se realizó con EH-506/3, por ser el aislado mas virulento. Las observaciones señalaron que no hubo una gran cantidad de marcas de oro coloidal en la vecindad de las hifas, por lo que puede inferirse que

no existe gran cantidad de quitinasas producidas *in vivo* en el momento de la infección por este aislado. St. Leger *et al.* (1996b) demostraron que las quitinasas son producidas en bajas cantidades por las estructuras de infección de *M. anisopliae* en el proceso inicial de penetración en *M. sexta*. La mencionada producción de quitinasas podría ser tomada como un indicador indirecto de la presencia de proteasas, ya que es necesaria la acción de éstas para que la quitina cuticular sea desenmascarada. Además, St. Leger *et al.* (1987) señalan que Pr1 y Pr2 son producidas en los sitios de infección de *M. sexta* y *C. vomitoria*. En nuestro estudio, también se observó durante la determinación del ICDF, que el aislado EH-503/3, que produce gran cantidad de quitinasas, provocó daños cuticulares muy extensos, e incluso huecos en la superficie de la ninfa, visibles con microscopía de luz.

También con MEB se observó la formación de estructuras semejantes a apresorios en los pliegues del raquis y el orificio vasiforme de la ninfa, tanto para las infectadas con EH-506/3, como con EH-520/3. La penetración del hongo al insecto es alcanzada, entre otros factores, con fuerza mecánica, ejercida con estructuras especializadas tales como los apresorios, como ha sido propuesto para el fitopatógeno *Magnaporthe grisea* (Howard *et al.*, 1991). En nuestro estudio, los dos aislados (EH-506/3 y EH-520/3) mostraron un hinchamiento en la punta de las hifas, que se asemeja a los apresorios por la forma. Este tipo de estructuras no han sido observadas por otros autores en ensayos con *P. fumosoroseus*, cuando infecta otros insectos, como *Plutella xylostella* (Altre y Vandenberg, 2001a). Ellos reportaron que el hongo aparentemente penetró la cutícula directamente, con tubos germinales no diferenciados dentro de las primeras 22 horas de incubación. En contraste con otros

eventos, la diferenciación de los apresorios no siempre aparecen en el ciclo mecanismo de infección, pero es una reacción específica al ambiente (Altre y Vandenberg, 2001). Wang y St. Leger (2005) demostraron al menos cuatro diferentes señales que afectan la formación de apresorios en un patógeno de insectos específico: una fracción polar de la cutícula, niveles de nutrimentos, superficies hidrofóbicas y una señal desconocida.

Nuestras observaciones mostraron que *P. fumosoroseus* aparentemente penetra directamente por la cutícula o bien por el orificio vasiforme y la zona del raquis y que las estructuras tipo apresorio observadas probablemente median esa penetración. En otras secciones de la cutícula, se observó penetración directa por las hifas, que podría ser explicado por las condiciones particulares de humedad de las zonas antes mencionadas creando un microclima que promovería el desarrollo de los apresorios (Bidochka y Khachatourians, 1988; Charnley, 2003). Otro factor ampliamente demostrado para hongos fitopatógenos en la penetración del tejido vegetal (Howard *et al.*, 1991) es la dureza de la superficie. Las observaciones de MEB, mostraron que los conidios forman un tubo germinal unipolar que se extiende cierta distancia antes de penetrar, esto ha sido descrito por Hajek y Eastburn (2003) para *Entomophora maimaga*, creciendo en *Limantria dispar* y por Askary *et al.* (1999) para *V. lecanii*, cuando invade el áfido de la papa *Macrosiphonella sanbornii*. Dichos autores refieren que con MEB no es posible obtener evidencia clara de la entrada del hongo. En nuestro estudio, las imágenes de MET mostraron diferentes estructuras fúngicas en el sitio de los cortes, como hifas penetrantes, así como estructuras esféricas en la cercanía de las mismas.

La zona dañada de las ninfas tratadas con EH-506/3 estaba cubierta con mucílago, aún lejos de la zona del micelio. Este mucílago también se observó en las ninfas tratadas con EH-520/3, pero solamente se encontraba cerca de las estructuras fúngicas. Este fenómeno ha sido observado asociado a la degradación de los huevecillos de *Phoenicococcus marlatii* por *Lecanicillium dimorphum* (Asensio *et al.*, 2002), así como en *M. anisopliae* cuando infecta al trip *Frankliniella occidentalis* (Vestegaard *et al.*, 1999). Esa matriz mucilaginosa podría tener propiedades de adhesión y facilitar la penetración fúngica (Askary *et al.*, 1999), o bien contener proteínas de reconocimiento (Latgé, 2001).

Probablemente la capa mucosa pueda tener un papel en la preparación de la superficie del hospedante para la penetración, ya que se ha demostrado que en especies de fitopatógenos como *U. viviae-fabae*, dicha capa forma un tapete de adhesión junto con la superficie de la planta. En dicho tapete se encuentran presentes enzimas hidrolíticas, que además podrían afectar la adhesión a las células del hospedante y así podría ayudar al hongo a persistir en la superficie del hospedante y penetrar en tejidos más profundos. La presencia de tales proteínas en el material de adhesión proporciona un medio para asegurar que el material proveniente de la ruptura de la cutícula esté inmediatamente disponible como nutrimento para la parte más activa del hongo (Tucker y Talbot, 2001; Cole *et al.*, 1998).

Las características más marcadas del aislado virulento (EH-506/3) fueron una elevada producción de Pr1 y la rapidez de transición de conidio a blastospora, lo que

concuerta con lo que se observó en los bioensayos, con la mayor digestión de la superficie cuticular, penetración y muerte del insecto.

Los estudios sobre la biología básica de los entomopatógenos son esenciales para contribuir al conocimiento integral del hongo lo que permitiría su aplicación en los factores prácticos que influyen para mejorar su eficiencia terminal en el campo agrícola, y favorecer así el aumento en la utilización de este tipo de microorganismos en un manejo integrado de plagas, que contribuya a un mantenimiento racional de los agroecosistemas.

Conclusiones

1. Los tres aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* utilizados presentaron diversos factores de patogenicidad, tales como enzimas hidrolíticas específicas para los componentes cuticulares, formación de estructuras especializadas como los apresorios.
2. Los tres aislados presentaron *in vitro*, la transición de conidio a diferentes propágulos del hongo, tales como blastosporas, cuerpos hifales y levaduriformes.
3. Se observó una marcada variabilidad intraespecífica de virulencia entre los tres aislados, expresada mediante el índice de crecimiento y desarrollo fúngico.
4. Las variaciones de virulencia se observaron con microscopía electrónica de barrido (MEB), al contrastar la rapidez de la formación de estructuras fúngicas sobre las ninfas.
5. La MEB permitió observar también el daño cuticular producido por los aislados del hongo.
6. Otra característica asociada a la patogenicidad observada con MEB fue la formación de apresorios, estructuras que permiten al hongo ejercer fuerza mecánica.
7. En este estudio, EH-506/3 mostró la mayor cantidad de Pr1, una enzima identificada como fundamental en la virulencia de los hongos, así como una transición mas rápida de conidio a blastospora, esta transición dimórfica ha sido documentada en la mayoría de los hongos entomopatógenos.

Además, este aislado es muy virulento, ya que a las 18 h, ya había matado a las ninfas de mosquita blanca.

8. Con los estudios *in vitro*, se constató que el aislado que tuvo una mayor cantidad, enzimas, además de una rápida transición de conidio a blastospora, fue también el aislado mas virulento.
9. En este estudio pudo comprobarse que los propágulos de *P. fumosoroseus* pueden seguir el esquema propuesto para el dimorfismo de *B. bassiana*, o bien, pasar por la fase de conidio hinchado, emitir un tubo germinal e inmediatamente iniciar la formación de una blastospora.
10. Este estudio mostró características asociadas a la virulencia no descritas previamente para *P. fumosoroseus* de México, como son la producción de Pr1 y Pr2, y la formación de apresorios en la cutícula del insecto.

Bibliografía

- Altre, J.A., J. D. Vandenberg y F. A. Cantone. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamond back moth *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 332-338.
- Altre, J.A. y J.D. Vandenberg. 2001a. Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against lepidopteran larvae. *J Invertebr Pathol* 78:81-86.
- Altre, J.A. y J.D. Vandenberg. 2001b. Comparision of blastospores of two *Paecilomyces fumosoroseus* isolates: *in vitro* traits and virulence when injected into fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* *J Invertebr Pathol* 78: 170-175.
- Alves, S. B., L.S. Rossi, R. B. Lopes, M., A. Tamai, y R. M. Pereira. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity aganst *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Carmbidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Invertebr. Pathol.* 81: 70-77.
- Andersen, S.O. 1979. Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.* 24; 29-61.
- Apoga, D., J. Barnard, H. G. Craighead y H.C. Hoch. 2004. Quantification of substratum contact required for initiation of *Colletotrichum graminicola* appresoria. *Fungal Gen. Biol.* 41: 1-12.
- Askary, H., N. Benhamov y J. Brodeur. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii*. *J Invertebr Pathol* 74: 1-13.

- Bagga, S. G. Hu, S.E. Screen y R.J. St. Leger. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 324:159-169.
- Baratto, C.M., M. V. da Silva, L. Santi, L. Passaglia, I.S. Schrank, M.H. Vainstein. A. Schrank. 2003. Expression and characterization of the 42kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 49: 723-726.
- Barranco-Florido, J, E., R. Alatorre-Rosas, M. Gutierrez-Rojas, G. Viniegra-Gonzalez, G. Saucedo-Castañeda. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzym. Microb. Technol.* 30: 910-915.
- Barreto, C.C., C.C. Staats, A. Schrank, M. H. Vainstein. 2004. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr. Microbiol.* 48: 102-107.
- Bastmeyer, M., H. B. Deising, y C. Bechigner. 2002. Force exertion in fungal infection. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:321-341.
- Bidochka, M.J. y G.G. Khachatourians. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Environ. Microbiol.* 53(7): 1679-1684.
- Bidochka MJ, Pfeifer TA, Khachatourians GG. 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*; 99: 77-83.

- Bidochka, M.J. y G. G. Khachatourians. 1988. N-Acetyl-D-Glucosamine -mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2699-2704.
- Bidochka, M.J. y G. G. Khachatourians. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J Invertebr Pathol* 64: 26-32
- Bidochka, M. J., S. Burke, y L. Ng. 1999. Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium* adaptations for pathogenesis. *Can. J. Microbiol.* 45: 856-864.
- Bidochka, M.J. y M. J. Melzer. 2000. Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B y Pr1C) from *Metarhizium strains*. *Can J. Microbiol.* 46:1138-1144.
- Borges-Walmsley, M.I., D. Cheng, X. Shu y A.R. Walmsley. 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *TRENDS Microbiol.* 10(2): 80-87.
- Bouchara, J.P. y G. Tronchin. 1999. Adhesion and pathogenicity in *Aspergillus* infections. *Med. Maladies Infectieuses* 29(11): 705-711.
- Boucias, D. G. y J. C. Pendland. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle, the initial event of mycoses in arthropod hosts. En: Cole, G. T y H. C. Hoch Eds. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press. New York, pp.101-113.
- Boucias, D.G., J.C. Pendland y J.P. Latgé. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environm. Microbiol.* 54(7):1795-1805
- Boyer, R. 2000. *Conceptos de bioquímica*. International Thompson. México. 693 p.

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Braga, G.U.L., C.L. Messias y R. Vencovsky. 1994. Estimates of genetic parameters related to protease production by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 64(1): 6-12.
- Braga, G.U.L., R.H.R. Destefano y C.L. Messias. 1999. Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on differential carbon sources. *J. Invertebr. Pathol.* 74: 112-119.
- Brownbride, M., S. Costa y S. T. Jaronski. 2001. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *J. Invertebr. Pathol.* 77: 280-283.
- Butt, T. B, J.G. Harris y K. A. Powel. 1998. Microbial biopesticides: The European Scene. En, Hall, F. R, y J.J. Men. Eds. *Methods in Biotechnology, Vol 5: Biopesticides: Use and Delivery*, Humana Press, New Jersey, pp 23-44.
- Byrne, D.N. y T. S. Bellows. 1991. Whitefly biology. *Ann. Rev. Entomol* 36: 431-457
- Cantone, F.A. y J. D. Vandenberg. 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol.Res.* 102 (2): 209-215.
- Casadevall, A., J. N. Steenbergen, y J. D. Nosanchuck. 2003. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi-the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr. Op. Microbiol.* 6: 1-6
- Castellanos-Moguel J, R. Cruz-Camarillo y C. Toriello. 2001a. Selección de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith, con base en sus niveles de proteasa y quitinasa para su utilización posterior en bioensayos con mosquita blanca. Memoria del Encuentro de Estudiantes de Posgrado, 40 Aniversario del Posgrado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

- Castellanos-Moguel J, R. Cruz-Camarillo, E. Aranda y C. Toriello. 2001b. Selección de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith, con base en sus niveles de proteasa y quitinasa. Memoria del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, Veracruz. CIV-33
- Castellanos-Moguel, J., González-Barajas, M., T. Mier, M.R. Reyes-Montes, E. Aranda y C. Toriello. 2006. Comparison of blastospore production, extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activities, and virulence of three *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). Rev. Iberoam. Micol. *En prensa*.
- Cavallazzi-Vargas G, Pérez-Mejía A, Berlanga Padilla A, Hernández-Velázquez V, Toriello C. 2001. Selección de cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* con base en sus características fenotípicas. En: Nevárez-Morillón GV, Sánchez-Martínez G, Muñoz-Castellanos LN (Eds.). Memorias del XXIV Congreso Nacional de Control Biológico, 9-10 Agosto, Chihuahua, Chih. pp 112-115.
- Cavallazi-Vargas, G. M. 2002. Caracterización genotípica de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith aislado en México y análisis de su virulencia *in vitro* en la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Tesis de grado. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Charnley, A.K. y R. J. St. Leger. 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. En Cole, G. T y H. C. Hoch Eds. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press. New York, pp. 267-286.
- Chávez-Camarillo, G. y R. Cruz-Camarillo. 1984. El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. Rev. Lat. Microbiol. 26: 203-215.

- Chul-Kang, S., S. Park y D. Gyu-Lee. 1998. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol Letts. 165: 267-271.
- Chul-Kang, S., S. Park y D. Gyu-Lee. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol 73: 276-281.
- Clarkson, J.M. y A.K. Charnley. 1996. New Insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol. 4(5):197-202.
- Clermont, A., M. Weede, V. Seitz, L. Podsiadlowki, D. Lenze, M. Hummel y A. Vilcinskas. 2004. Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity. Biochem. J. 382: 315-322.
- Cliquet, S. y M. A. Jackson. 1999. Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastospores. J. Industr. Microbiol. Biotechnol. 23: 97-102.
- Cohen-Kupiec, R y I. Chet. 1998. Te molecular biology of chitin digestion. Curr. Op. Biotechnol. 9:270-277.
- Cole, S.C.J., A. K. Charnley y R. M. Cooper. 1993. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Letters. 113(2): 189-195.
- Cole, L., F.M: Dewey. Y C.R. Hawes. 1998. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae*. I. The fungal extracellular matrix in penetration and post-penetration processes. New Phytol, 139(4): 597-609.

- Cotter, G., y K. Kavanagh. 2000. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. Br. Biomed. Sci. 57(7).241-249.
- Coudron, T.A., M. J. Kroha y C.M. Ignoffo. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. Comp. Biochem. Phisiol.. 79(3):339-348.
- Cutbertson, A.G.S., K. F. A. Walters y P. Northing. 2005. The susceptibility of immature stages of *Bemisia tabaci* to the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* on tomato and verbena foliage. Mycopathologia. 159: 23-29.
- Daigle, D.J., W.J. Connick Jr, C. D: Boyette, M.A. Jackson y J. W. Domer. 1998. Solid-State fermentation plus extrusion to make biopesticide granules Biotechnol. Tech. 12(10): 715-719.
- Dowdy, S. y S. Wearden. 1983. Statistics for research. John Wiley and Sons. New York, USA, 573 p.
- Doyle, R.J. 2000. Contribution to the hydrophobic effect to microbial infection. Microbes and infection 2(4):341-400.
- Drummond, J., J. B. Heale y A. T. Gillespie. 1987. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. Ann. Appl. Biol. 111: 193-201.
- Dutra, V., L. Nakazato, L. Boretto, I. S. Schrank., M. Henning-Vainstein y A. Schrank. 2004. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus micropulus* cuticle. Research Microbiol. 2004. 155(4): 245-251.

- Eguchi, M., M. Hoh, L.Y. Chou y K. Nishino. 1993. Purification and characterization of a fungal protease specific protein inhibitor (FPI-F) in the silkworm haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem and Molecular Biol.* 104(3): 537-543.
- Eguchi, M y K. Shomoto. 1985. Purification and properties of a chymotrypsin inhibitor from the silkworm haemolymph. *Comp. Biochem. Phisiol II: Biochem Mol. Biol.* 81(2): 301-307.
- Fargues, J., N. Kalemba Maniana, y J.C. Delmas. 1994. Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumosoroseus* during in vitro development to *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 173-178.
- Fargues, J., N. Smiths, C. Vidal, A. Vey, F. Vega, G. Mercadier y P. Quimby. 2001. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production and pathogenic activity of te Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia.* 154: 127-138.
- Fargues, J. y M. C. Bon. 2004. influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. *J. Invertebr. Pathol. En prensa*
- Fang, W., B. Leng, Y. Xiao, K. Jin, J. Ma, Y. Fan, J. Feng, X. Yng, Y. Zhang, y Y. Pei. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 363-370.
- Feng, K. C., B.L. Liu y Y. M. Tzeng. 2002. Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 217-224.
- Fernández-Tavizón, S. 1980. Opciones para el uso de insecticidas convencionales. *Ciencia y Desarrollo* 6 : 69-75.

- Fernández, S., E. Groden, J. D. Vandenberg y m. J. Furlong. 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J. Invertebr. Pathol. 77: 217-226.
- Ferron, P., J. Fargues y G. Riba. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. En: Arora, D.K. L. Ajello, K. G. Mukerji, Eds. Handbook of Applied Mycology, Vol 2. Humans, Animals and Insects. Marcel Dekker, New York, pp 665-700.
- Freimoser, F.M., S. Screen, S. Bagga, Hu, G. Y R. J. St. Leger. 2003. Expressed sequence Tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. Microbiology. 149, 239-247.
- Fuget, R., M. Theraud, A. Vey. 2004. Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. Comp. Biochem and Physiol. Toxicol Pharmacol. *En prensa*
- García-Juárez, M; C. Toriello y T. Mier. 1999. Compatibilidad *in vitro* de *Verticillium lecanii* con un insecticida piretroide y su efecto sobre la patogenicidad del hongo en la mosquita blanca. Revista Mexicana de Micología 15: 11-16.
- Gillespie, J., P.R. Bateman y K. Charnley. 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. J Invertebr Pathol 71: 128-137.
- Gillespie, J.P., C. Burnett y A.K. Charnley. 2002 The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *M. anisopliae* var. *acridum*. J. Insect. Physiol. 46: 429-437.

- Gindin, G., M. Samish, E. Alekseev e I. Glazer. 2001. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) Ticks to entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci. Technol.* 11: 111-118.
- Goettel, M. S., R. J. St. Leger, N. W. Rizzo, R. C. Staples y D. W. Roberts. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J General Microbiology* 135: 2233-2239.
- Goettel, M.S y G. D. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes En: Lacey, L.A. Eds. *Manual of techniques in insect Pathol.* Academic Press, USA, pp.213-247
- Gómez-Ramírez, M. 2000. Selección y caracterización de una cepa quitinolítica de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría en CQB. ENCB-IPN.
- Greer, L. 2000. Greenhouse IPM: Sustainable whitefly control. *Appropriate Technology for Rural Areas, Arizona*, pp 1-9.
- Gupta, S., T.D. Leathers, G.N. El-Sayed y C. M. Ignoffo. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 13-17.
- Hajek., A.E. y C. C. Eastburn. 2003. Attachment and germination of *Entomophaga maimaga* conidia on host and non-host larval cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 12-22.
- Hallsworth , J. E. y N. Magan. 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trealosa contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7): 2435-2442.
- Harlow, E. y D. Lane. 1988. *Antibodies, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory, New York, p 340-341.
- Haynes, K. 2001. Virulence in *Candida* species. *TRENDS Microbiol.* 9(12): 591-596.

- Hernandez-Torres, I., M. Iracheta, L.J. Galan-Wong, C. Hernández, J. Contreras, M. Jackson y B. Pereyra-Alferez. 2004. A *Paecilomyces fumosoroseus* mutant over-producing chitinase displays enhanced virulence against *Bemisia tabaci*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 207-210.
- Hostetter, M. 2000. RGD mediated adhesion in fungal pathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 3: 344-348.
- Howard, R.J., M. A. Ferrari, D.H. Roach y N.P. Money. 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 11281-11284.
- Holland, R. J., T. S. Gunasekera, K.L. Williams y K. M. H. Nevalainen. 2002. Ultrastructure and properties of *Paecilomyces lilacinus* spores. *Can. J. Microbiol.* 48: 879-885.
- Hornby, J.M., S.M. Jacobitz-Kizzier, D.J. McNeel, E. C. Jensen, D.S. Treves y K. W. Nickerson. 2004. Inoculum size effect in dimorphic fungi.
- Huang, X., N. Zhao, y K. Zhang. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology*. En prensa.
- Hube, B. 1996. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr. Top. Med. Mycol.* 7(1):55-69.
- Hube, B. y J. Naglik. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147:1997-2005.
- Issaly, N., H. Chaveau, F. Aglevor, J. Fargues y A. Durand. 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochem.* 40: 1425-1431.

- Jackson MA. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *J Industr Microbiol Biotechnol* 1997; 19: 180-187.
- Jackson, M. A., S. Cliquet y L.B. Iten. 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci. Technol.* 13:23-33.
- Jackson, C.W., J.B. Heale y R. A. Hall. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* 106:39-48.
- Jackson, M. A., M. R. Mc Guire, L. A. Lacey y S. P. Wraight. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research* 101: 35-41.
- James, R.R., J.S. Buckner y T.P. Freeman. 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invertebr. Pathol.* 84: 67-74.
- Jaramillo, J. y C. Borgemeister. 2005. New bioassay method to assess the pathogenicity of Colombian strains of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin and *Paecilomyces* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *J. Invertebr. Pathol.* *En prensa*.
- Jeffs, L.B., I. J. Xavier, R.E. Matai y G.G. Khachatourians. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* y *Verticillium*. *Can. J. Microbiol.* 45:936-948.

- Joshi, L. R. J. St. Leger y D.W.Roberts. 1997. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using diferential display-RT-PCR. *Gene* 197:1-8.
- Kanost, M.R. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Develop. Comp. Immunol.* 23(4-5):291-301.
- Kamp, A.M. y M. J. Bidochka. 2002. Protein analysis in a pleomorphically deteriorated strain of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can.J. Microbiol.* 48: 787-792.
- Kawachi, I., T. Fujieda, M. Ujita, Y. Ishii, K. Yamagishi, H. Sato, T. Funaguma y A. Hara. 2001. Purification and properties of extracellular chitinases from de parasitic fungus *Isaria japonica*. *J. Biosci. Bioeng.* 92(6): 544-549.
- Keath, E. J. , A. A. Painter, G. S. Kobayashi y G. Medoff. 1989. Variable expression of a yeast phase specific gen in *Histoplasma capsulatum* strains different in thermotolerance and virulence. *Infect. Immun.* 57: 1384-1390.
- Kennedy, M.J. 1990. Models for studying the role of fungal attachment in colonization and pathogenesis. *Mycopathologia.* 109(2):123-137.
- Khachatourians G. C. 1992. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En Arora, D.K. L. Ajello, K. G. Mukerji, Eds. *Handbook of Applied Mycology, Vol 2. Humans, Animals and Insects.* Marcel Dekker, New York, pp 613-663.
- Khan, A. K. Williams, M.P. Molloy y H. Nevalainen. 2003. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Prot. Express. Purific.* 32(2): 210-220.

- Khan, A., K.I. Williams y H.K.M. Nevalainen. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biological control*. *En prensa*.
- Kleinkauf, H., Dören, H. van, 1987. Biosynthesis of peptide antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 259-289.
- Knogge, W. 1998. Fungal pathogenicity. *Curr. Op. Plant. Biol.* 1: 342-328.
- Krieger de Moraes, C., A. Schrank, M.H. Vainstein. 2003. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogenic and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* 46: 205-210.
- Kucera, M. 1981. The production of toxic protease by the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 33-38.
- Lacey, L.A., A.A. Kirk, L. Millar, G. Mercadier y C. Vidal. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Biocontrol. Sci. Technol.* 9: 9-18.
- Landa, Z., L. Osborne, F. López y J. Eyal. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological control.* 4: 341-350.
- Latgé, J.P. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *TRENDS Microbiol.* 9(8):382-388.
- Lipsitch, M., S. Siller, y M.A. Nowak. 1996. The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution.* 50 (5):1729-1741.

- Liu, B. L., P. M: Kao., Y.M: Tzeng y K.C. Feng. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enz. Microb. Technol.* 33: 410-415.
- López-Llorca, L.V. 1990. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Can. J. Microbiol.* 36:530-537.
- Lomer, C.J., R.P. Bateman, D.L. Johnson, J. Langewald y M. Thomas. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 667-702.
- Madigan M.T., Martenko J.M. y Parker J. 2000. Brock. Biología de los microorganismos. Ed. Pentrice Hall.
- Mesquita A. L. M., L. A. Lacey, G. Mercadier y F. Lecant. 1996. Entomopathogenic activity of a whitefly derived isolate of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the Russian wheat aphid *Diviaphis noxia* (Homoptera: Aphididae) with the description of an effective bioassay method. *European J Entomology* 93:69-75.
- Mesquita, A. L. M. y L. A. Lacey. 2001. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) and their aphid host. *Bio Control* 22: 51-59.
- Mier, T., F. Rivera, J. C. Bermudez , Y. Dominguez, C. Benavides y M. Ulloa. 1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre este insecto. *Revista Mexicana de Micología* 7: 149-156.

- Mier, T., C. Silva-Romero, R. Mendez, M. Ulloa y C. Toriello. 1999. Effect of three insecticides used in Mexico on whiteflies (Homoptera Aleyrodidae) and a fungicide on the viability and morphology *in vitro* of *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas. *Rev. Lat. Microbiol.* 41: 217-222.
- Mitchell, A. P. 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr. Op. Microbiol.* 1: 687-692.
- Moino, A., S. B. Alves, R. B. Lopes, P. M. Oliveira, J. Neves, R. M. Pereira, S. A. Vieira. 2002. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola.* 59: 267-273.
- Paterson, I.C., A.K. Charnley, R.M. cooper y J.M. Clarkson. 1993. Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Letters.* 109(2-3): 323-327.
- Paterson, I. C., A. K. Chamley, R. M. Cooper y J. M. Clarkson. 1994a. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 3153-3159.
- Paterson, I. C., A. K. Charnley., R. M. Cooper y J. M. Clarkson. 1994 b. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 185-189.
- Pendland, J.S., S. Y. Hung y D.G. Boucias. 1993. Evasion of host-defense by *in vivo* produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. *J. Bacteriol.* 175 (18): 5962-5969.

- Peng, C.Y.S., X. Zhou, y H. K. Kaya. 2002. Virulence and site of infection of the fungus *Hirsutella thompsonii*, to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. J. Invertebr. Pathol. 81: 185-195.
- Poprawski, T.J. y W.J. Jones. 2000. Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemisia whiteflies* (Homoptera: Aleyrodidae). Mycopathologia. 151:11-20.
- Prenerová E. Accelerated germination by aeration: a novel method of preparation of germinated blastospores of *Paecilomyces farinosus* for practical application. J Invertebr Pathol 1995; 65: 225-229.
- Rao, M.B., A.P. Tanksale, M. S. Ghatge y V.V. Desphande. 1998. molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3): 597-635.
- Resi-Bogo, M., C. Agustín-Rota, H. Pinto Jr., M. Ocampos, C. T. Correa, M. Henning Vainstein, A. Schrank. 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* Gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. Curr. Microbio. 37: 221-225.
- Rombach MC. 1989. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. Entomophaga; 34: 45-52.
- Samsinakova A. 1966. Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. J Invertebr Pathol; 8: 395-400.
- Samuels, R.I y I. C. Patterson. 1995. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. Comp. Biochem and Phisiol part B. 110(4): 661-669.

- Sánchez-Peña, S.R. 2000. Infectivity of *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) towards *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) nymphs. Fla. Entomol. 83 (1): 101-105.
- Sánchez-Potes, A. 1990. Cultivos oleaginosos. Manuales para educación agropecuaria. Producción vegetal; Trillas, México, 72 p.
- Sandoval-Coronado CF, Luna-Oliver HA, Arévalo-Niño K, Jackson MA, Poprawski TJ, Galán-Wong LJ. 2001. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. World J Microbiol Biotechnol; 17: 423-428.
- San-Blas, G., L. R. Travassos, B.C. Fries, D.L. Goldman, A. Casadeval, A.K. Carmona, T. F. Barro, R. Puccia, M.K. Hostetter, S.G. Shanks, V.M. Copping, Y. Knox, y N.A. Gow. 2000. Fungal morphogenesis and virulence. Med. Mycol. 38(0):79-86.
- Santos, S.-X., B. Magalhães, E. A. Lu, y A.Lima. 1999. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). Rev. Microbiol. 30: 47-51.
- Sarath, G., R. S. De la Motte y F. W. Wagner. 1989. Protease assay methods. En: Benyon, R.J. y J. S. Bond Eds. Proteolytic Enzymes, a Practical Approach. IRL. Press, Oxford. pp 25-55.
- Screen, S., A. Bailey, K. Charnley, R. Cooper y J. Clarkson. 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. Curr. Genet, 31:511-518.

- Segers, R., T.M. Butt, J.F. Keen., B.R. Kerry y J.F. Peberdy. 1995. The subtilisins of the invertebrate mycopathogens *Verticillium chlamidosporium* and *Metarhizium anisopliae* are serologically and functionally related.
- Shimizu, S., Y. Tsuchitani y T. Matsumoto. 1993. Serology and substrate specificity of extracellular proteases from four species of entomopathogenic hyphomycetes. *J Invertebr Pathol* 61: 192-195.
- Sierra, C., A. Pérez; C. Agundis; E. Zenteno; L. Vázquez. 1999. Subcellular localization of a seric lectin in haemocytes from *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Nantia) and its role in phagocytosis. En: Schram F.R. y J. C. von Vaupel Kelin. *Crustaceans and Biodiversity Crisis*. Brill Academic Publishers, Leiden, pp 961-970
- Silva Pinto, da F.G., Pelegrinelli-Fungaro, M.H., Maldonado-Ferreira, J., Valadares-Ingliš M.C., Furlaneto, M.C., 2002. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Gen. Mol. Biol.* 25, 231-234.
- Smith, J. S., y E. A. Grula. 1983. Chitinase is an Inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 42: 319-326.
- Sosa-Gomez, D. y S. B. Alves. 1983. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok 1. Estandarización. virulencia y actividad enzimática. CIRPON. *Revista de Investigación* 1: 83-102.
- Sosa-Gómez, D.R., D. G. Boucias y J.L. Nation. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J. Invertebr. Pathol.* 69(1): 31-39

- St. Leger, R. J., R. M. Cooper y A. K. Charnley. 1986a. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degrading *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *J Invertebr Pathol* 47: 167-177.
- St. Leger, R. J., A. K. Charnley y M. Cooper. 1986b. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J Invertebr Pathol* 47: 295-302.
- St. Leger, R. J., A. K. Charnley y M. Cooper. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 253: 221-232.
- St. Leger, R.J., R.M. Cooper, Y A.K. Charnley. 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 52: 459-470.
- St. Leger, R.J., R. C. Stales y D. W. Roberts. 1992. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene *ssgA*, encoding a hydriohibin-like protein from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 20: 119-124.
- St. Leger, R. J., M. J. Bidochka y D. W. Roberts. 1994. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 313: 1-7.
- St. Leger, R. J. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J Bot.* 73: 1119-1125.
- St. Leger, R. J., L. Joshi, M.J. Bidochka y D. W. Roberts. 1996a. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracelular trypsins produced

by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1257-1264.

St. Leger, R. J., L. Joshi, M. J. Bidochka, N. W. Rizzo y D. W. Roberts. 1996b. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. App. Environ. Microbiol. 62: 907-912.

St. Leger, R. J., L. Joshi y D.W. Roberts. 1997. Adaptation of proteases and carbohidrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. Microbiology 143: 1983-1992.

St. Leger, R.J., L. Joshi y D. Roberts. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle degrading enzymes and hidrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 709-713.

St. Leger, R.J., J.O. Nelson y S.E. Screen. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allows extracellular protease production and activity. Microbiology. 145: 2691-2699.

Sugavanam, B y X. Tianjian. 1998. Developing Countries. En: Hall, F. R. y J. J. Men Eds. Methods in Biotechnology, Vol 5. Biopesticides: Use and Delivery, Humana Press, New Jersey, pp 45-54.

Tefera, T. y K.L. Pringle. 2003. Food consumption by *Chilio partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. J. Invertebr. Pathol. 84: 220-225.

- Toriello, C. 2001. Bioseguridad de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. En: Memoria del Taller internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA, SENASICA-DGSV, Mérida, Yucatán, pp 81-86.
- Tucker, S.L y N. Talbot. 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 39:
- Vandenberg, J.D., M.A. Jackson, L. Lacey. 1998. Relative efficacy of blastospores and aerial conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the Russian wheat aphid. J. Invertebr. Pathol. 72: 181-183.
- Vandenberg, J.D. y F.A. Cantone. 2004. Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth *in vitro*, virulence and host specificity. J. Invertebr. Pathol. 85: 40-45.
- Vännien I., H. Hokkannen y J. Tyni-Juslin. 1999. Attempts to control cabbage root flies *Delia radicum* and *Delia floralis* (Fall) (Dipt: Anthomyiidae) with entomopathogenic fungi: Laboratory and greenhouse tests. J. Appl. Ent. 123: 107-113.
- Van Burik, J. A. H., y P. T. Magee. 2001. Aspects of fungal pathogens in humans. Annu. Rev. Microbiol. 55: 743-772.
- Vázquez, L., G Maldonado; C Agundis; A. Pérez, E.L. Cooper; E. Zenteno. 1997. Participation of a sialic acid-specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells. J Experimental Zoology 279: 265-272

- Vega, F.E. M.A. Jackson y M.R. McGuire. 1999. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathologia*. 147:33-35.
- Vega FE, M.A. Jackson y M.R. McGuire. 1999. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathologia*; 147: 33-35.
- Vega FE, M.A. Jackson, G. Mercadier y T.J. Poprawski. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J Microbiol Biotechnol*. 19: 363-368.
- Vestergaard, S., T. M. Butt, J. Bresciani, A.T. Gillespie y J. Eilenberg. 1999. Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Tysanoptera: Thripidea) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 25-33.
- Vey, A; R.E. Holand y T.M. Butt. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., C. Jackson y N. Magan (Eds.) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI Publishing, Bristol, pp 311-346.
- Vidal, C., L. A. Lacey y J. Fargues. 1996. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *J Economic Entomology* 90: 765-700.
- Vidal, C., L. S. Osborne, L. A. Lacey y J. Fargues. 1998a. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for

controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses *Biological Control* 12: 191-199

Vidal, C., J. Fargues, L.A. Lacey y M.A. Jackson. 1999. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia*. 143:33-46.

Wang, C., M. A. Typas y T.M. Butt. 2002. Detection and characterization of Pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Letters*. 213(2): 251-255.

Wang, C., A. Skrobek y T.M. Butt. 2003. Concurrence of losing a chromosome and the ability to produce destruxins in a mutant of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Letts*. 226:373-378.

Wang, C. y R.J. St. Leger. 2005. Developmental and transcriptional responses to host and non-hostcuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Eukariotic cell*. 4(5): 937-947.

Wolken, W.A.M., J. Tramper y M. J. van der Werf. 2003. What can spores do for us?. *TRENDS biotechnol*. 21(8):338-345.

Xavier-Santos, S., B. Magalhães, E. A. Luna-Alves Lima. 1999. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). *Rev. Microbiol*. 30 (1): 47-51.

Zhi-Gang, W., C. Li-Ming, L. Xiu-Mei, T. Zhe, C. Su-Yun y G. Su-Jun. 1999. Dimorphic fungus characteristic of fumosin-producing strains of *Fusarium moniliforme* from Zhejiang. *Mycopathologia*: 144: 165-167.

**Artículo aceptado para su publicación en la Revista Latinoamericana de Micología el
7 de diciembre de 2005.**

No. de Referencia: 915

TITLE: Virulence tests and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activities during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae)

AUTHORS:

Judith Castellanos-Moguel¹, Margarita González-Barajas¹, Teresa Mier¹, María del Rocío Reyes-Montes², Eduardo Aranda³, and Conchita Toriello^{2*}

¹Departamento el Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico D. F. 04960, Mexico; ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D. F. 04510, Mexico and ³Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, 62250, Mexico

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Dra. Conchita Toriello. Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F. 04510, Mexico.

Phone/Fax: (52 55) 5623-2461. Email:

toriello@servidor.unam.mx

RUNNING TITLE:

Virulence, Pr1 and Pr2 activities during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus*

SUMMARY:

In order to characterize isolates for biocontrol purposes, virulence towards whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, (Homoptera: Aleyrodidae) and subtilisin-like (Pr1) and

trypsin-like (Pr2) protease activities during blastospore production were investigated in monospore cultures (MCs) of *Paecilomyces fumosoroseus*. Virulence towards second instar whiteflies was assessed in three MCs, and expressed as lethal median concentration (LC₅₀). Number and width–length ratio of propagules (blastospores, hyphal bodies, short hyphae, submerged conidia and others) and simultaneously the extracellular proteolytic activity were determined in liquid medium. Total protease activity was assayed with azocasein, Pr1 and Pr2 activities were determined with N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide and N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide as substrates, respectively. A natural variability in virulence, propagule production and cuticle-degrading proteases was observed among isolates. Bioassays showed an LC₅₀ of 1.1×10^3 , 2.5×10^4 and 7.6×10^4 conidia/ml for MCs EH-506/3, EH-503/3 and EH-520/3, respectively, showing EH-506/3 as the most virulent isolate. Under the experimental conditions assayed, isolate EH-503/3 produced the highest yield of propagules (7.7×10^7 propagules/ml), followed by EH-506/3 with 1.0×10^7 and EH-520/3 with 6.4×10^7 propagules/ml. Subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activities were present in the three MCs. Subtilisin-like (Pr1) activity was highest (745.7 UPr1/ml at 120 h) in EH-506/3, the most virulent isolate, pointing out Pr1 as a phenotypic marker of virulence for *P. fumosoroseus*. EH-506/3 appears as a good candidate for whitefly biocontrol due to its high virulence, Pr1 concentration and rapid transition to blastospores in submerged liquid medium.

KEY WORDS:

Paecilomyces fumosoroseus, whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* subtilisin-like (Pr1), trypsin-like (Pr2), biocontrol, virulence, blastospores

TÍTULO:

Pruebas de virulencia y determinación de actividad extracelular de proteasas tipo subtilisina (Pr1) y tipo tripsina (Pr2) durante la producción de propágulos de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* de mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae)

RESUMEN:

Con el objetivo de caracterizar aislados para el control biológico de mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae), se estudiaron tres cultivos monospóricos (CM) de *Paecilomyces fumosoroseus*, hongo entomopatógeno de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Se determinó la virulencia en ninfas de segundo estadio de la mosquita blanca expresada como concentración letal media (CL₅₀). Se determinó la producción de propágulos fúngicos (blastosporas, cuerpos hifales, hifas cortas, conidios sumergidos y otros) en medio líquido, se midió la relación de largo y ancho de los propágulos, y la actividad proteolítica (total; tipo subtilisina, Pr1 y tipo tripsina, Pr2) simultáneamente con la producción de propágulos. La proteasa total se determinó con azocaseína, y las actividades de Pr1 y Pr2 con N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida y N-Benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida como sustratos específicos, respectivamente. Se observó variabilidad entre los tres CM en cuanto a la virulencia, producción de propágulos y proteasas. Los

bioensayos mostraron una CL_{50} de 1.1×10^3 , 2.5×10^4 y 7.6×10^4 conidios/ml para los CMs EH-506/3, EH-503/3 y EH-520/3, respectivamente. El CM donde se observó el mayor número de propágulos en las condiciones ensayadas fue EH-503/3 (7.7×10^7), luego EH-506/3 con 1.0×10^7 y EH-520/3 con 6.4×10^7 propágulos/ml. Las actividades enzimáticas de Pr1 y Pr2 se demostraron en los tres CMs. La actividad tipo subtilisina (Pr1) fue mayor en el aislado más virulento (EH-506/3) con 745.7 UPr1/ml a las 120 H, y señala a Pr1 como un marcador fenotípico de virulencia para *P. fumosoroseus*. EH-506/3 es un buen candidato para el control biológico de la mosquita blanca en México, por su alta virulencia, elevada concentración de Pr1 y su rápida transición a blastosporas en el medio líquido ensayado.

PALABRAS CLAVE:

Paecilomyces fumosoroseus, mosquita blanca, *Trialeurodes vaporariorum*, proteasa tipo subtilisina (Pr1), proteasa tipo tripsina (Pr2), control biológico, virulencia, blastosporas

Introduction

Paecilomyces fumosoroseus has been used successfully as a biocontrol agent of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) and other insect pests [8, 36]. Whiteflies are polyphagous insects that can attack vegetable, staple and ornamental crops, as well as other cultivated plant species, both in greenhouses and in the open field worldwide. In Mexico, the whitefly is considered as an important pest of vegetable crops, as well as ornamental plants [30].

For the successful use of a mycoinsecticide in biocontrol, a relevant characteristic for biocontrol agents' success in the field is their virulence toward target insects. Proteases are primary enzymes in insect cuticle degradation that play a key role in different aspects of fungal biology and have been related to virulence [12, 13]. St. Leger *et al.* [39] isolated a general protease from *Metarhizium anisopliae* capable of degrading a wide variety of proteins. The serine proteases, Pr1 and Pr2, have been identified in *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Nomuraea rileyi* [3, 24, 38, 40]. Pinto *et al.* [28] described Pr1 and Pr2 activities in *M. flavoviride* growing in a mineral medium supplemented with either cuticle from the locust *Rhammatocerus schistocercoides* or casein. Recently, eleven protease isoforms and a metalloprotease related to the mechanism of fungal penetration have been identified and cloned from *M. anisopliae* var. *anisopliae* and var. *acridum* [16]. These enzymatic activities have been reported in other entomopathogenic fungi, particularly *Metarhizium* isolates [39, 41], in the mycelial phase, but to our knowledge not in *P. fumosoroseus* during propagule production in submerged

cultures. In these cultures, entomopathogenic fungi usually form asexual spores as single cells by schizolytic separation at septa, or by mechanical fragmentation of hyphae, or can also be produced from hyphae by yeast-like budding [31]. These structures are described by several authors as blastospores or hyphal bodies [21, 31, 32, 45]. These blastospores have been shown to be at least as infective as conidia in assays using topically applied propagules against several insects [1]. These structures are similar to the ones found when the fungus grows in the insect haemolymph [19]. Furthermore, submerged culture processes have advantages over conidial production in solid-state fermentation, such as reducing time of propagule production, and faster germination rate of blastospores on the insect cuticle [1, 43, 45].

In order to characterize a strain for biocontrol purposes, it is necessary to assay the virulence toward the target insect of different isolates to assess their potential as biocontrol agents, in addition to other fungal characteristics. In this study, virulence of three monospore cultures (MCs) of *P. fumosoroseus* isolated in Mexico was tested in whiteflies, as well as total proteases, and Pr1 and Pr2 activities during propagule production to select a suitable candidate to be used as a microbial agent for whitefly control.

Materials and methods

Fungal isolates and growth conditions. All *P. fumosoroseus* PFCAM, MBP, and PSMB1 strains were isolates from whiteflies and were obtained from the

National Center for Biological Control, Mexico (Centro Nacional de Referencia de Control Biológico-CNRCB). Single spore cultures denominated EH-506/3, EH-503/3 and EH-520/3 from PFCAM, MBP, and PSMB1, respectively, were prepared by the method of Goettel and Inglis [17] as modified by Cavallazzi *et al.* [11]. Monospore cultures (MCs) were preserved in sterile water, mineral oil, and in liquid nitrogen cryopreservation at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ and deposited in the fungal collection of the Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Isolates were maintained on culture medium slants containing (in grams per liter): sucrose, 10; glucose, 5; peptone, 0.5, yeast extract, 5; agar, 23, (SGPYE medium), until used.

The MC were selected based on total protease activity, showing high, low, and intermediate activity [9, 10].

Virulence test: Insects. The whitefly nymphs (*Trialeurodes vaporariorum*) used for bioassays originated from colonies maintained at the greenhouse and experimental field of the Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CEIB-UAEM), Mexico. Whiteflies were reared on "flor de mayo" beans (*Phaseolus vulgaris*).

Bioassay procedure. The method used was according to Vidal *et al.* [46], with minor modifications. Fungal conidia were produced in SGPYE medium cultures, and five doses ranging from 4.7×10^2 to 4.7×10^6 conidia /ml were used. *Phaseolus vulgaris* leaf disks were outlined with a plastic cap (3.5 cm of diameter)

and cut with a sterile scalpel. In all bioassays, second instar nymphs were identified by marking leaves with a permanent ink pen near the selected insects. Nymphs were disinfected in a laminar flow hood by soaking them in the following solutions: 70% alcohol for 5 s, sterile distilled water for 40 s, 5% sodium hypochlorite for 20 s, followed by rinsing in 3 changes of sterile distilled water for a total of 120 s. Leaves were air-dried on sterile filter paper. Nymphs were infected by floating the disks downwards on the fungal suspension so that the side infested with the whitefly nymphs touched the suspension, on each of the five selected conidia concentrations (4.7×10^2 to 4.7×10^6 conidia /ml). Disks were transferred to 3.5 cm Petri dishes containing sterile KNOP medium (in grams per liter: phosphate nitrate, 0.125; calcium nitrate, 0.500; manganese sulfate, 0.125; potassium phosphate, 0.125; agar, 23). The top side of the leaf disks was placed against the agar so that the side of the nymphs faced upward. Control disks were used with 0.005% Tween 80. The lids of the Petri dishes were sealed with strips of parafilm to maintain saturated humidity and placed in an incubator at 24°C and a photoperiod of 16:8 h light:dark, (L:D). After incubation for 24 h under high humidity, the lids were replaced with another one that had a paper-filter covered 1-cm hole for aeration, and to prevent condensation as described in Vidal *et al.* [46]. Petri dishes were maintained in the incubator at 26°C ($\pm 1^\circ$ C), 60% RH, and a photoperiod of 16:8 (L:D) h, during a total of 10 d. Individual selected nymphs were monitored for mortality at 10 d. Emerged whiteflies (empty pupal cases) were considered non infected. A total of 75 nymphs were used, 25 for each replicate bioassay, and another 25 nymphs as control, for each conidial concentration

tested. The number of nymphs of second instar that did not change to the next developmental stage was recorded (dead nymphs). All nymphs were then removed from the leaf surface, placed on sterile water agar dishes, and incubated at 24°C for 5-7 d to determine the percentage of mortality caused by mycosis, based on fungal sporulation on the insects. Nymphs that remained in second instar, were considered dead, and lethal median concentration (CL₅₀) was calculated using second instar data.

Propagule production, and assays of enzyme activity. For all shake flask blastospore production studies, cultures of *P. fumosoroseus* were grown in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 70 ml of SGPYE liquid medium supplemented with 1% casein (w/v) to ensure a high yield of blastospores and simultaneously, produce enzymes. Inocula consisted of conidia from 10-day old slant SGPYE medium cultures with a final cell density of 1×10^6 conidia/ml. All experiments were repeated at least three times. Conidia and blastospore concentrations were determined microscopically with a haemocytometer. The length and width of 30 submerged propagules (blastospores, hyphal bodies, short hyphae, and submerged conidia), randomly chosen, of each isolate were measured using an Olympus BX-40 microscope through a calibrated objective at 40 x. Micrographs were made with an Olympus PM-C35 camera and an Olympus PM20 exposure control unit. Fungal transformation was registered according to the classification scheme of Bidochka *et al.* [4], with slight modifications. This scheme comprises six developmental stages (DS). (I) Unswollen conidia. (II) Swollen conidia. (III)

Emergence of the germ tube. (IV) Elongation of the germ tube and formation of the first septum. (V) Polar and bipolar elongation (growth) of the resulting mycelium and initiation of a blastospore, and (VI) Seccession of that blastospore. Flasks were incubated with orbital shaking (150 rpm) at 28°C, for 312 h. Control flasks of liquid medium without inocula were maintained under the same experimental conditions. At 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 240, and 312 h, 3-ml aliquots of cultures and controls were collected. After blastospore and propagule measurements, the remainder samples were centrifuged (5000 X g, 10 min), and cell-free supernatants were maintained at -20 °C until enzymatic activities were determined.

A nonspecific proteolytic assay with azocasein was performed for both, cell free supernatants and controls, according to Sarath *et al.* [35]. Briefly, 2% azocasein in 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, was equilibrated at 25°C. Reactions were performed in Eppendorf tubes containing 250 µl of azocasein and 150 µl of crude enzymatic extract. After 1 h of incubation at 25°C, reactions were stopped by the addition of 1.2 ml of 10% trichloroacetic acid (Baker, Mexico). After 10 min at 4°C, samples were centrifuged (5000 x g, 10 min), 1.2 ml of supernatant was placed in test tubes, mixed with 1.4 ml of 1.0 M NaOH for color development and absorbance was read at 440 nm in a Beckman DU650 spectrophotometer (Beckman Instruments, CA, USA). One unit of protease activity (UP) was defined as the amount of enzyme that produced a change of 0.010 in the optical density at 440 nm.

Pr1 and Pr2 activities were determined using N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide and N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide as substrates, respectively, essentially as described by St. Leger *et al.* [39], except that 0.1 M tris/HCL buffer, pH 8.0 was used. Briefly, 1 mM substrate diluted in this last buffer and the enzyme fraction were pre-warmed at 23°C prior to mixing. Control absorbance values were read at 410 nm, before adding the substrate. Then, triplicate reaction mixtures, containing 50 µl of crude enzyme extract, 50 µl of substrate (for Pr1 and Pr2), and 900 µl of Tris buffer, pH 8.0, were incubated at 23°C. After 1 min, absorbance was read at 410 nm in the spectrophotometer. One enzyme unit was defined as the amount of Pr1 (UPr1) or Pr2 (UPr2) that produced a change of 0.001 in the optical density at 410 nm under the experimental conditions described above. Control samples were also incubated with specific substrates for Pr1 and Pr2.

Experiments were replicated thrice with different aerial conidia inocula and samples were taken from 3 shake-flasks for each MC tested.

Protein determination. Protein content was measured using Coomassie Brilliant Blue G-250 [7].

Chemicals. Unless otherwise stated, all chemicals used were obtained from Sigma-Aldrich Quimica (Toluca, Mexico).

Statistical analysis. Mortality of second stage nymphs was subjected to Probit analysis [15], generating a concentration-mortality relationship for the estimates of LC₅₀ and its 95% confidence intervals for each of the MCs tested, using POLO-PC program (1996). Analysis of variance (ANOVA $\alpha = 0.05$) was calculated for the length to width ratio of propagules at the different assay times, total protease, and Pr1 and Pr2 activities among the three MCs selected, followed by a Tukey multiple mean comparison test [14]. Statistical analyses were performed using the SPSS Program, version 10, 2003.

Results and discussion

Bioassays. Fungal MCs varied in their ability to infect *T. vaporariorum* nymphs. The criterion for mortality status of whitefly nymphs was instar change, because nymphs are immobile, and at day 10, nymphs that had not shown change from 2nd to 3rd instar, were considered dead. At day 10, all marked nymphs, independently from the instar stage were transferred to water-agar and all of them showed mycelial growth, suggesting an insect mycosis, and were considered killed by the fungus. In all cases, mycoses were above 95% of the treated nymphs (data not shown). Control nymphs reached the 4th stage or adult stage in the same time period of the bioassay. The MCs impact on nymph mortalities largely depended on the conidial concentrations tested. Change of nymphs to the next developmental stage tended to decrease with increasing concentrations of conidia, showing a concentration-mortality response in all MCs tested.

All EH-506/3 concentrations were highly toxic for 2nd instar whiteflies, in contrast with a lower mortality observed for EH-520/3 at the same concentration, for the same instar stage (data not shown). This last MC (EH-520/3) showed a marked concentration-response, mycelial growth from nymphs placed on water-agar showed that insects were infected but infection signals were observed late (7 days) in the experimental time-course. Conidial concentrations of the other MC tested, EH-503/3, were also virulent, however, this isolate infected nymphs in the 2nd instar, but killed them late in the time-course experiment. The same conidial concentration-response has been observed for whiteflies treated with *Verticillium lecanii* [25], and mites treated with several isolates of *P. fumosoroseus* [37]. In contrast, James *et al.*, [23] observed no differences among the dose ranges of *P. fumosoroseus* tested in whitefly nymphs.

MC EH-506/3 was considered the most virulent isolate because 1.1×10^3 conidia/ml were enough to kill half of the tested insects in the experimental period. In contrast, EH-503/3 showed a LC₅₀ of 2.5×10^4 , and EH-520/3 of 7.6×10^4 conidia/ml, suggesting the last as the isolate with the lower virulence. All LC₅₀ observed in this study (from 1.1×10^3 to 7.6×10^4 conidia/ml) were lower than those mentioned by Vidal *et al.* [46] (from 1.79×10^3 to 9.9×10^8 conidia/ml) for *P. fumosoroseus* treated whiteflies.

Propagule production. The three MCs selected exhibited transition from conidia (DS: I) (Figure 1a) to different propagules in different times. First, conidium swells (DS: II) and begins producing one or more germ tubes (Figure 1b) (DS: III).

Early at the experimental time, differential development of MCs was observed: at 6 h, EH-506/3 already produced germ tubes (DS: III), while EH-503/3 started to germinate between 6 and 12 h, and EH-520/3, until 12 h (Table 1). At 36 h, the three isolates produced primary blastospores (DS: V), originated from hyphal septa (Figure 1c) and tips (Figure 1d); budding blastospores (DS: V) (Figure 1e); and hyphal bodies (DS: VI) (Figure 1f). Similar yeast-like structures have been described in several liquid media [1, 22, 43, 44, 45]. After 48-96 h, oblong narrow structures (Figure 1g) similar to short hyphae were formed, but these produced both blastospores (DS: V) (Figure 1h), or submerged conidia (Figure 1i). From 96 h, pellets were more evident, and at 196 h larger and more hyphal bodies were observed (Figure 1j). At 240 h, blastospores showed well defined vacuoles, and produced germ tubes. After 240 h, single propagules were less evident, and mainly hyphal pellets were observed (Figure 1k).

Assays showed different propagules (blastospores, hyphal bodies, short hyphae, and submerged conidia) for the three MCs tested during the first 96 h of the experiment, as reported by other authors [1, 22, 43,45].

Significant differences of propagule concentrations were observed among EH-506/3, the most virulent MC, and the other two isolates. Maximal propagule (blastospores, hyphal bodies) concentrations were observed at different times for each isolate. At 96 h, 1.0×10^7 propagules/ml for EH-506/3; at 60 h, 7.7×10^7 conidia/ ml for EH-503/3; and 6.4×10^7 conidia/ml for EH-520/3. In different experiments, other authors [34] found similar amount of blastospores (5×10^7 at 72

h) with *P. fumosoroseus* strain 612 in a mineral medium supplemented with glucose, peptone, and yeast-extract.

Blastospores were obtained in a rich medium, with sucrose and glucose, and several nitrogen sources, such as casein, peptone, and yeast extract, a medium with peptone has been pointed out by Prenerová [29] as the optimal germination medium for *P. farinosus*. Jackson *et al.* [22] obtained high yields (6.0×10^8) of desiccation-tolerant *P. fumosoroseus* blastospores in a fermentor with a medium containing casein. Issaly *et al.* [18] reported high yields of *Metarhizium flavoviride* blastospores ($1-5.4 \times 10^8$ blastospores/ml) when a medium with a high rate of nitrogen and low rate of carbon was used in flask cultures.

The size of the aerial conidia used for initial inoculation, and measured after incubation for 10 d at 28°C on SGPYE solid medium, was $5 \pm 0 \mu\text{m}$ length and $2.5 \pm 0 \mu\text{m}$ width. The propagule size was determined by the ratio of length to width for each sample time (Table 1). At 12 h, MC EH-503/3 showed a ratio of 16 that corresponds to short hyphae (conidia producing one or more germ tubes), but longer than the two other MCs. From 24 h on, all submerged propagules (DS: VI) showed higher ratios than those from aerial inoculated conidia (DS: I). This has been mentioned for *P. fumosoroseus* and other entomopathogens [21]. Significant differences ($P < 0.05$) of propagule size among the three MCs were observed (Table 1) at almost all times tested, with the exception of 18 and 96 h. Ratio values of propagules from MC EH-506/3 and EH-503/3 between 36 and 96 h, and between 48 and 96 h for EH-520/3, were similar to the modal diameters obtained by Vidal *et*

al. [45], using Goral medium (4.28 μm) at 96 h, and Jackson, Catroux and Paris (6.07 μm) medium, at 48 h. In our study, MC EH-506/3 that exhibited the highest virulence showed the fastest transition from conidia (DS: I) to blastospore (DS: VI) as showed in Table 1. This dimorphic transition from conidia to yeast-like propagules (blastospores) has been documented in most entomopathogenic fungi [33]. In liquid culture, this MC (EH-506/3) produced 1×10^7 propagules/ml, but otherwise has always shown a very low conidia production on slant or rice cultures, however, its fast transition from conidia to blastospore, suggests another characteristic of virulent strains.

Enzymatic activity. Dimorphism was evident in SGPYE medium, with several nitrogen and carbon sources, and proteases determined during blastospore production. During the first hours of the experiment, proteolytic activity remained low, but after 96 h of culture incubation, a rise in total proteolytic activity was detected for the three MCs. Total proteases started to rise at 120 and 168 h (data not shown). Peaks of *P. fumosoroseus* total protease activity corresponding to 91 UP/ml at 216 of incubation, by the highly virulent EH-506/3 strain. The medium-virulence isolate (EH-503/3) showed a much lower activity (58.7 UP/ml) at 216 h. The low virulence isolate (EH-520/3), on the other hand, exhibited a lower activity (49 UP/ml) at 216 h (Table 2). Total extracellular proteases were measured by the azocasein method [35] instead of by absorbance at 280 nm because *P.*

fumosoroseus produces beauvericin [26], which contains phenylalanine [27] that interferes with absorbance at this wavelength.

The three MCs tested expressed Pr1 and Pr2 activities under the experimental conditions used in this study. Some points showed significant differences, and these values are summarized on Table 2.

At day 0 of the time course experiment, the three isolates showed Pr1 and Pr2 activities from 49.3 UPr2/ml to 150.6 UPr1/ml, suggesting that conidia contain proteolytic activity, as reported by Boucias and Pendland [6]. Significant differences were observed ($F_{2,24} = 127.8$, $P < 0.05$ for Pr1 and $F_{2,24} = 184.9$, $P < 0.05$ for Pr2) at this time among the three MCs. For Pr1, at 120 h of incubation, this difference persisted between the highest-virulence MC (EH-506/3) and the other two MCs, but not among the low and medium virulence isolates ($F_{2,24} = 1631$; $P < 0.05$), as well as at 216 h ($F_{2,24} = 120.4$; $P < 0.05$) (Table 2). For Pr2, a significant difference was observed among the three MCs, at 120 ($F_{2,24} = 214.1$, $P < 0.05$) and 216 h ($F_{2,24} = 208$, $P < 0.05$).

For the three isolates, Pr1 activity varied between 66 and 192 UPr1/ml up to 96 h of incubation (Data not shown). Pr1 activity of EH-506/3 started to increase reached a major peak (745.7 UPr1/ml) at 120 h and a second, lower one (620.4 UPr1/ml), at 216 h. Pr1 activity of EH-503/3, on the other hand, started to increase after 168 h and reached a value of 496 UPr1/ml at the end of the experimental period (312 h, data not shown). The lowest Pr1 activity was shown by the low virulence EH-520/3 strain with a maximum of 347.4 UPr1/ml at 216 h.

Among the three isolates tested, Pr2 showed a much lower activity than Pr1 and this remained low and relatively constant. Broad-spectrum subtilisins are the main proteins produced by *M. anisopliae* and other entomopathogens during infection and degradation of insect cuticle [38]. Different levels of production are signals of intraspecific variation among isolates, and could be associated with adaptative differences [2, 16, 39]. The differences observed here among isolates of the same species of *P. fumosoroseus* confirm previous studies with other fungi in which protease activity has been related to virulence [5, 20, 39, 42].

Pr1 and Pr2 activities on the specific substrates used here have been reported in *M. anisopliae* isolates [38, 39, 41] but not in *P. fumosoroseus* propagules. In this study, Pr2 was induced at lower levels and with less variability among isolates than Pr1. This phenomenon was also observed in *M. flavoviride* by Pinto et al. [28].

Subtilisins comprise the major protease components in entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium* and *Beauveria* [2, 39]. The number of Pr1 proteases produced by *M. anisopliae* and the slight differences in their catalytic activities is not only of great interest to the functional pathology but also to population structure of species of this fungus [3]. This may also be valid for other entomopathogenic fungi as well. Results showed that the virulent MC (EH-506/3), had a high Pr1 activity (745.7 UPr1/ml), and the low virulence isolate (EH-520/3) had a low Pr1 activity (347.4 UPr1/ml) when compared with EH-506/3. As Pr1 appears to be a pathogenicity determinant by virtue of its considerable ability to degrade cuticle [41], our findings suggest that Pr1 production of the propagules of *P.*

fumosoroseus, could be assumed as a virulence marker, and supernatant concentration measurements considered as a screening test for preliminary selection among several isolates. The selected isolates with high Pr1 activity could be used for pathogenicity bioassays. Studies of induction-repression mechanism of these enzymes must be done to determine optimal production in conditions of low nutritional availability, similar to the ones found when infecting the insect cuticle.

The intra-specific variability of virulence towards whitefly nymphs, propagule production, and Pr1 and Pr2 activities found among *P. fumosoroseus* isolates are relevant findings for the characterization and selection of isolates suitable for their use as biocontrol agents. Our results would suggest MC EH-506/3 as the best candidate for whitefly control among the three studied MCs, due to its high virulence, Pr1 production (745.7 Upr1/ml at 120 h) of the propagules, and rapid transition to blastospores in submerged culture.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Víctor Hernández Velázquez and Angélica Berlanga from the Centro Nacional de Referencia en Control Biológico, for the original *P. fumosoroseus* isolates, and Biol. Laura Lina for the maintenance of whitefly colonies. This research was supported by Grant No. G-31451-B from CONACyT, Mexico, and JCM acknowledges the granted Ph.D. scholarship. This research is part of JCM's Ph.D. thesis, student of the *Doctorado en Ciencias Biológicas* from the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

References

1. Altre JA, Vandenberg JD. Comparison of blastospores of two *Paecilomyces fumosoroseus* isolates: In vitro traits and virulence when injected into fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. J Invertebr Pathol 2001; 78: 170-175.
2. Bidochka MJ, Khachatourians GG. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. J Invertebr Pathol 1994; 64: 26-32.
3. Bidochka MJ, Meltzer MJ. Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1, Pr1B and PrC) from *Metarhizium* strains. Can J Microbiol 2000; 46: 1138-1144
4. Bidochka MJ, Pfeifer TA, Khachatourians GG. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. Mycopathologia 1987; 99: 77-83.
5. Bidochka MJ, St. Leger RJ, Stuart A, Gowanlock K. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. Microbiology 1999; 145: 955-963.
6. Boucias DG, Pendland JC. Attachment of mycopathogens to cuticle. En: Cole GT, Hoch HC (Eds.) The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. New York, Plenum Press, 1991: 101-127.
7. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

8. Butt TM, Jackson C, Magan N Fungi as Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential. New York, CABI, 2001.
9. Castellanos-Moguel J, Cruz-Camarillo R, Aranda E, Toriello C. Selección de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith, con base en sus niveles de proteasa y quitinasa. En: Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería; XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, 10-14 septiembre, 2001, Veracruz, Mexico: CIV-33.
10. Castellanos-Moguel, J Relación entre los niveles de proteasa y quitinasa en aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith y su patogenicidad hacia la mosquita blanca. MS dissertation, 2002. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 102.
11. Cavallazzi-Vargas G, Pérez-Mejía A, Berlanga Padilla A, Hernández-Velázquez V, Toriello C. Selección de cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* con base en sus características fenotípicas. En: Nevárez-Morillón GV, Sánchez-Martínez G, Muñoz-Castellanos LN (Eds.) Memorias del XXIV Congreso Nacional de Control Biológico 9-10 Agosto, 2001 Chihuahua, Mexico: 112-115.
12. Charnley AK, St. Leger RJ. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. En: Cole GT, Hoch HC, (Eds.) The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. New York, Plenum Press, 1991: 267-286.
13. Clarkson JM, Charnley AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol 1996; 4: 197-202.

14. Dowdy S, Wearden S. Statistics for research. New York, John Wiley and Sons, 1983.
15. Finney, DJ. Probit analysis. 3rd ed. London, Cambridge University Press, 1971.
16. Freimoser FM, Screen S, Bagga GH, St. Leger RJ. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 2003;149: 239-247.
17. Goettel MS, Inglis GD. Fungi: Hyphomycetes. En: Lacey, L.A. (Ed). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. London, Academic Press, 1997: 213-247.
18. Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fargues J, Durand A. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* MF189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochem* 2005; 40: 1425-1431.
19. Jackson MA. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *J Industr Microbiol Biotechnol* 1997; 19: 180-187.
20. Jackson CW, Heale JB, Hall RA. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphonella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann Appl Biol* 1985; 106: 39-48.
21. Jackson MA, McGuire MR, Lacey LA, Wraight SP. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res* 1997; 101: 35-41

22. Jackson MA, Cliquet S, Iten LB. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci Technol* 2003; 13: 23-33.
23. James RR, Buchner JS, Freeman TP. Cuticular lipids from silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *J Invertebr Pathol* 2003; 84: 67-74.
24. Joshi L, St. Leger RJ, Roberts DW. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (PrIB) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display RT-PCR. *Gene* 1997; 197: 1-8.
25. Kanagaratnam P, Hall RA, Burges HD. Control of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, by an 'aphid' strain of the fungus *Verticillium lecanii*. *Ann Appl Biol* 1982; 100: 213-219.
26. Khachatourians GC. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En: Arora DK, Ajello LK, Mukerji G (Eds.) *Handbook of Applied Mycology, Vol 2. Humans, Animals and Insects*. New York, Marcel Dekker, 1992: 613-663.
27. Kleinkauf H, van Dören H. Biosynthesis of peptide antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41: 259-289.
28. Pinto FGS, Fungaro MHP, Ferreira JM, Valadares-Inglis MC, Furlaneto MC. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Gen Mol Biol* 2002; 25: 231-234.

29. Prenerová E. Accelerated germination by aeration. a novel method of preparation of germinated blastospores of *Paecilomyces farinosus* for practical application. *J Invertebr Pathol* 1995; 65: 225-229.
30. Ramírez-Villapudua J. Manejo integrado de la mosquita blanca de la hoja plateada. Sinaloa, Mexico, Universidad Autónoma de Sinaloa, 1996.
31. Rombach MC. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. *Entomophaga* 1989; 34: 45-52.
32. Samsinakova A. Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. *J Invertebr Pathol* 1966; 8: 395-400.
33. Samson RA, Evans HC, Latgé JP. Atlas of entomopathogenic fungi. The Netherlands, Springer Verlag, 1988.
34. Sandoval-Coronado CF, Luna-Oliver HA, Arévalo-Niño K, Jackson MA, Poprawski TJ, Galán-Wong LJ. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. *World J Microbiol Biotechnol* 2001; 17: 423-428.
35. Sarath G, De la Motte RS, Wagner FW. Protease assay methods. En: Benyon RJ, Bond JS (Eds.) *Proteolytic Enzymes, a Practical Approach*. Oxford, IRL Press, 1989: 25-55.
36. Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 61: 413-423.

37. Shi WB, Feng MG. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biol Control* 2004; 30: 165-173.
38. St. Leger RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can J Bot* 1995; 73: 1119-1125.
39. St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys* 1987a; 253: 221-232.
40. St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper M. Distribution of chymoelastases and trypsin- like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. *Arch Biochem Biophys* 1987b, 258: 123-131.
41. St. Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degrading *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *J Invertebr Pathol* 1986; 47: 167-177.
42. St. Leger RJ, Joshi L, Roberts DW. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* 1997;143: 1983-1992.
43. Vega FE, Jackson MA, McGuire MR. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathologia* 1999, 147: 33-35.

44. Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J Microbiol Biotechnol* 2003; 19: 363-368.
45. Vidal C, Fargues J, Lacey LA, Jackson MA. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus* *Mycopathologia* 1998; 143: 36-46.
46. Vidal C, Lacey LA, Fargues J. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *J Econom Entomol* 1997; 90: 765-700.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Paecilomyces fumosoroseus* propagules produced in submerged culture. a) aerial conidia of EH-503/3. Developmental stage I: unswollen conidia. b) EH-503/3 swollen conidia with two germ tubes at 6 h. Developmental stage III: emergence of the germ tube. c) EH-520/3 blastospore originated from hyphal septum at 36 h. Developmental stage V: polar and bipolar elongation of the resulting mycelium and initiation of a blastospore. d) EH-520/3 blastospore originated from hyphal tip at 24 h. e) EH-503/3 budding yeast at 24 h. Developmental stage V. f) EH-506/3 hyphal body at 24 h. Developmental stage VI: secession of the blastospore. g) EH-503/3 short hyphae at 24 h. h) EH-503/3 blastospores at the hyphal body tips at 36 h. i) EH-503/3 submerged conidia at 60h, j) EH-503/3 large hyphal bodies at 72 h of incubation. k) EH-520/3 hyphal pellets after 240 h of incubation. Scale bar: 5µm

Table 1

Morphological type and length to width ratio of fungal propagules from *Paecilomyces fumosoroseus*.

Time	Isolate	Length to width ratio	Morphological type (Developmental stage)
0 h	EH-506/3	2.0 ^a	conidia (I)
	EH-503/3	2.0 ^a	conidia (I)
	EH-520/3	2.0 ^a	conidia (I)
6 h	EH-506/3	2.1 (± 0.5) ^{a,b}	germinating conidia (III)
	EH-503/3	2.3 (± 0.4) ^b	germinating conidia (III)
	EH-520/3	1.9 (± 0.4) ^a	swollen conidia (II)
12 h	EH-506/3	8.5 (± 2.57) ^b	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-503/3	16 (± 3.11) ^c	germinating conidia (III)
	EH-520/3	5 (± 5.16) ^a	germinating conidia (III)
18 h	EH-506/3	5.1 (± 2.16) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-503/3	4.5 (± 2.11) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-520/3	6.9 (± 6.5) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
24h	EH-506/3	4.4 (± 1.5) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-503/3	4.6 (± 1.7) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-520/3	10.4 (± 7.4) ^b	hyphal bodies, blastospores (V, VI)

	EH-506/3	4.4 (\pm 1.5) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
36 h	EH-503/3	4.6 (\pm 1.7) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-520/3	10.4 (\pm 7.4) ^b	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-506/3	5.4 (\pm 2.3) ^b	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
48 h	EH-503/3	3.2 (\pm 1.2) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-520/3	5.1 (\pm 2.5) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
	EH-506/3	5.5 (\pm 2.4) ^b	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
60 h	EH-503/3	4.1 (\pm 1.4) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI), submerged conidia
	EH-520/3	4.6 (\pm 1) ^{a,b}	hyphal bodies, blastospores, (V, VI) submerged conidia
	EH-506/3	4.8 (\pm 1.2) ^{a,b}	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
72 h	EH-503/3	4.3 (\pm 0.9) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI), submerged conidia
	EH-520/3	5.5 (\pm 1.3) ^b	hyphal bodies, blastospores (V, VI), submerged conidia
	EH-506/3	4.5 (\pm 0.9) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI)
96 h	EH-503/3	4.03 (\pm 0.81) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI), submerged conidia
	EH-520/3	4.0 (\pm 1.1) ^a	hyphal bodies, blastospores (V, VI), submerged conidia

Values are representative of three independent experiments run in triplicate.

Values in the same column corresponding to the same time, marked with the same letter did not differ significantly according to Tukey's test at a significance level of 5%.

Table 2

Total proteases, Subtilisin-like (Pr1) and Trypsin-like (Pr2) activities of *P. fumosoroseus* isolates and their virulence against whiteflies.

Isolates	Lethal median concentration (conidia/ml)	Total protease activity (UP/ml)			Subtilisin-like Pr1 activity (UPr1/ml)			Trypsin-like Pr2 activity (UPr2/ml)		
		0 h	120 h	216 h	0 h	120 h	216 h	0 h	120 h	216 h
		EH-506/3	1.1×10^3	3.6 ^a	62.4 ^c	91 ^c	66.0 ^a	745.7 ^b	620.4 ^b	49.3 ^a
EH-503/3	2.5×10^4	3.3 ^a	2.7 ^a	58.7 ^b	150.6 ^c	90.1 ^a	391.1 ^a	138.4 ^c	109.0 ^c	155.7 ^b
EH-520/3	7.6×10^4	8 ^a	8.7 ^b	49 ^a	94.0 ^b	111.2 ^a	347.4 ^a	103.0 ^b	95.4 ^b	92.3 ^a

Average of three independent experiments.

Values in the same column marked with the same letter did not differ significantly according to the significance level of 5%.

