

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

ACTIVIDAD DE PROTEASAS Y QUITINASAS
ASOCIADAS A LA VIRULENCIA DE *Metarhizium anisopliae*
(Metschn.) Sorokin (=flavoviride) Gams & Roszypal var.
acridum EN LANGOSTA (Orthoptera: Acrididae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A
KARINA GARCÍA GUTIÉRREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

MÉXICO D.F.



SEPTIEMBRE, 2005

m. 349158



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Karina García Atz

FECHA: 21- Septiembre - 2005

FIRMA: [Firma]

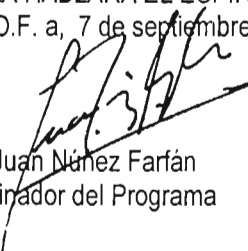
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de agosto del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **García Gutiérrez Karina** con número de cuenta **501048460** con la tesis titulada: "**Actividad de proteasas y quitinasas asociadas a la virulencia de Metarhizium anisopliae (Metschn.) Sorokin (=flavoviride) Gams & Roszypal var. acridum en langosta (Orthoptera: Acrididae)**", bajo la dirección del(a) **Dra. Concepción Toriello Nájera**.

Presidente:	Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa
Vocal:	Dra. María del Rocío Reyes Montes
Secretario:	Dra. Concepción Toriello Nájera
Suplente:	Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor
Suplente:	Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 7 de septiembre del 2005


Dr. Juan Nájera Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de la UNAM

Dra. Concepción Toriello Nájera

Dr. Miguel Ulloa Sosa

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

A

Dra. Teresa Mier González

M. en C. Judith Castellanos Moguel

Laboratorio de Micología de la UAM-X

A

M. en C. Jesús Sánchez Robles

Asesoría estadística UAM-X

A

CONACYT, Megaproyecto grupal G31451 B y beca Otorgada

A mi familia
René, Irene y Cyntya Selene

A
Román

Agradezco infinitamente a todos por su dedicación, enseñanzas y por todo su apoyo incondicional y confianza.

RESUMEN

El presente trabajo forma parte de la caracterización genotípica y fenotípica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* de México para la implementación de un agente microbiano autóctono que contribuya al control biológico de la langosta *Schistocerca gregaria* causante de grandes pérdidas económicas en el país. Se utilizaron 16 aislamientos procedentes de Colima e isla Socorro, México, proporcionados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), de Tecomán, Colima y depositados en la Colección del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se llevaron a cabo determinaciones enzimáticas en medio líquido, de quitinasas en un medio mínimo de sales con 2% de quitina teñida con azul brillante de remazol; y de proteasas en medio H con caseína al 1%. También se determinó la virulencia de los aislamientos en la langosta (*S. gregaria*) con el método el Tiempo Letal Medio (TLM). Se aplicó un análisis de varianza ($\alpha=0.05$) para detectar significancias en los resultados de las actividades enzimáticas y virulencia entre aislamientos. En los parámetros con significancias, se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey y se realizó un análisis de clasificación por medio de agrupación jerárquica. Los aislamientos con la más alta actividad de quitinasas a las 312 h fueron EH-483/8 y EH-499/10 con 43.1 y 43.7 UQ/ml respectivamente. La actividad más baja la presentaron los aislamientos EH-497/7 y EH-500/2 con 5.9 y 5.5 UQ/ml respectivamente. El análisis estadístico de los datos de la producción de quitinasas mostró diferencias significativas entre los aislamientos estudiados. A las 312 h se formaron seis grupos diferentes en cuanto a la producción enzimática. En el caso de las proteasas los aislamientos EH-483/8 y EH-487/4 a las 312 h con 124.7 y 126.3 UP/ml, los aislamientos EH-494/4, EH-498/8 y EH-499/10 tuvieron la mínima producción de proteasas con 28.2, 11.3 y 29.81 UP/ml. El análisis estadístico de los datos de la producción de proteasas mostró diferencias significativas entre los aislamientos estudiados. A las 312 h se formaron siete grupos diferentes en cuanto a la producción enzimática.

En los resultados del bioensayo, los aislamientos EH-489/1, EH-490/1 y EH-502/8 presentaron el TLM más bajo de 5.7, 5.7 y 5.5 días respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos ($P>0.05$), siendo los más virulentos. El aislamiento EH-488/7 tuvo un TLM de 12.18 días siendo el menos virulento. En el análisis estadístico se distinguieron seis grupos de virulencia. Los tres aislamientos de mayor virulencia mostraron una mediana y baja producción de quitinasas y producciones medias de proteasas. Los resultados obtenidos muestran una variabilidad natural en las actividades enzimáticas de los aislamientos tanto de quitinasas como de proteasas; y aunque no señalan una relación directa entre estas actividades y la virulencia, es relevante realizar este tipo de pruebas para seleccionar el aislamiento idóneo para un Manejo Integrado de Plagas en México.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
3. Justificación y objetivos	11
Hipótesis de Trabajo.	11
Objetivo General	11
Objetivos Particulares	11
4. Metodología	12
4.1. Aislamientos fúngicos	12
4.1.1. Preparación de la suspensión fúngica	13
4.2. Determinación de quitinasas	13
4.2.1. Preparación de quitina coloidal	13
4.2.2. Producción de quitinasas en cultivo sumergido	14
4.2.3. Pruebas preliminares.	14
4.3. Determinación de proteasas	15
4.3.1. Producción de proteasas en cultivo sumergido	15
4.3.2. Determinación de la actividad proteolítica	16
4.4. Bioensayo de virulencia en langosta	16
4.5. Análisis estadístico	17
5. Resultados	18
5.1. Quitinasas	18
5.2. Proteasas	21
5.3. Bioensayo	24
5.4. Relación entre concentración de enzimas y virulencia	26
6. Discusión	28
7. Conclusiones	32
8. Bibliografía	33
9. Anexos	40

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas del desarrollo comercial de agentes microbianos para el control biológico en comparación con agroquímicos	2
Tabla 2. Comparación de la clasificación del género <i>Metarhizium</i> basada en caracteres morfológicos y en taxonomía molecular	3
Tabla 3. Participación de las quitinasas y proteasas de <i>M. anisopliae</i> en el mecanismo de ataque a insectos	9
Tabla 4. Características de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> aislados de <i>Schistocerca piceifrons</i>	12
Tabla 5. Producción de quitinasas de 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	19
Tabla 6. Producción de proteasas de 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	22
Tabla 7. Virulencia (TLM) y concentración de quitinasas y proteasas de los aislamientos estudiados	27

FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de penetración de los hongos entomopatógenos	5
Figura 2. Distribución y zonas gregarígenas de la langosta <i>Schistocerca piceifrons</i> en México	7
Figura 3. Cinética de producción de quitinasas de 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> en medio de sales según Kang <i>et al.</i> , (1999) con quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol (absorbancia a 595nm)	20

Figura 4. Agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados en cuanto a la producción de quitinasas a las 312 h	21
Figura 5. Cinética de producción de proteasas de 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> en medio H con caseína al 1%, y determinada con azocaseína absorbancia a 440nm)	23
Figura 6. Agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados en cuanto a la producción de proteasas a las 312 h	24
Figura 7. Comparación de un insecto testigo (arriba) con la langosta infectada (abajo) con <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> a los 10 días de inoculación.	25
Figura 8. Tiempo letal medio (TLM) en días de 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> .	26
Figura 9. Agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados de acuerdo al tiempo letal medio (TLM)	27

ANEXOS

Anexo 1. Árboles correspondientes a las agrupaciones jerárquicas de las 24, 72, 120, 168, 216 y 264 h de producción de quitinasas	41
Anexo 2. Matrices de distancias euclidianas, método de unión simple (nearest neighbor) definida por la concentración de quitinasas a las 24, 72, 120, 168, 216, 264 y 312 hrs	43
Anexo 3. Árboles correspondientes a las agrupaciones jerárquicas de las 24, 72, 120, 168, 216 y 264 h de producción de proteasas	47
Anexo 4. Matrices de distancias euclidianas, método de unión simple (nearest neighbor) definida por la concentración de proteasas a las 24, 72, 120, 168, 216, 264 y 312 hrs	49
Anexo 5. Prueba de Tukey y subconjuntos homogéneos correspondientes a las 24, 72, 120, 168, 216 y 312 h de producción de quitinasas	53
Anexo 6. Prueba de Tukey y subconjuntos homogéneos correspondientes a las 24, 72, 120, 168, 216 y 312 h de producción de proteasas	57

1. INTRODUCCIÓN

La constante lucha del hombre contra las plagas agrícolas, causantes de grandes pérdidas económicas en el mundo, ha provocado que se generen diferentes métodos de control, dentro de los cuales sobresalen el control químico y el biológico. El primero resultó eficiente en sus inicios, pero con el tiempo su aplicación indiscriminada y la continua e intensa presión selectiva indujeron la aparición de plagas resistentes. Además, estos químicos afectan de manera considerable el equilibrio del ecosistema, causando daños al hombre, la fauna silvestre y doméstica y al ambiente. Por lo anterior, se ha buscado dar un mayor apoyo al control biológico, el cual emplea organismos que, de manera natural, controlan poblaciones de insectos causantes de daño en la agricultura. Actualmente, a este tipo de control se le ha prestado mayor atención principalmente en el aprovechamiento de hongos entomopatógenos dentro del Manejo Integrado de Plagas (Lomer *et al.*, 2001; Butt *et al.*, 2001) (Tabla 1).

Dentro del control biológico se cuenta con los hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill que controla áfidos, trips, mosquita blanca, gorgojos, escarabajos, gusanos barrenadores, orugas y termitas; *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith que controla principalmente mosquita blanca; *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas que controla áfidos, moscas, trips, gorgojos y nemátodos; *Hirsutella thompsonii* Fischer que controla ácaros y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin que controla escarabajos, termitas, chapulines y langostas (Inglis *et al.*, 2001).

Entre los insectos plaga nocivos a la agricultura se encuentran la langosta y el chapulín (Orthoptera: Acrididae). Los patógenos con mayor potencial para el control de la langosta son los hongos, particularmente los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, ya que son seguros para vertebrados (Goettel y Johnson, 1992; Goettel y Jaronski, 1997; Smith *et al.*, 1999), de producción relativamente fácil *in vitro* (Jenkins y Prior, 1993; Feng *et al.*, 1994; Jenkins y Goettel, 1997; Jenkins *et al.*, 1998) y pueden ser formulados como insecticidas biológicos para asperjarse con tecnología a ultra bajo volumen (Bateman, 1992; Bateman *et al.*, 1993).

Tabla 1. Ventajas y desventajas del desarrollo comercial de agentes microbianos para el control biológico en comparación con agroquímicos.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Ambientalmente compatibles, biorreguladores naturales	Inconsistencia y frecuentemente bajos niveles de control
No persistentes, bajo impacto ambiental	Sujeto a influencias ambientales
Campo de acción amplio o reducido dependiendo del organismo	Posibles mutaciones o variaciones
Menor resistencia a priones	Muy específico o de acción lenta
Costo específico de aplicaciones especializadas o donde no existen controles químicos	Más caro que los químicos
Métodos de aplicación fácilmente adaptables	Costos de registros y pruebas de toxicidad excesivas para algunos mercados
Bajo costo de desarrollo	No es práctico para grandes superficies de cosechas
Viable en pequeños mercados. Integración al control, reduciendo el uso de químicos	Pueden no ser compatibles con las prácticas aceptadas

Modificado de Whipps JM, Lumsden RD, 2001.

Tradicionalmente el género *Metarhizium* estaba constituido por tres especies y diversas variedades de acuerdo a sus caracteres morfológicos: *M. album* Petch, *M. anisopliae* con dos variedades: var. *anisopliae* (Metschn.) Sorokin y var. *majus* Tulloch y *M. flavoviridae* con dos variedades var. *flavoviridae* Gams & Rozsypal y var. *minus* Rombach (Tulloch 1976, Rombach *et al.*, 1986, Rombach *et al.*, 1987, Samson *et al.*, 1988, Hawksworth *et al.*, 1995). Actualmente, el mismo género se ha clasificado en diez grupos (clados) con base en la aplicación de técnicas moleculares, entre otras, el RAPD-PCR, secuenciación de las regiones ITS, 28S, D3 del DNA ribosomal y algunas características fenotípicas como termotolerancia y tamaño de los conidios (Driver *et al.* 2000) (Tabla 2).

En 1990, Gran Bretaña inició el programa Lutte Biologique contre les Locusts et les Sauteriaux (LUBILOSA), registrando el micoinsecticida "Green Muscle" desarrollado por el CABI en Sudáfrica y África Occidental entre 1998 y 1999. Su efecto ha sido demostrado bajo condiciones de campo contra la langosta (Prior *et al.*, 1988, Prior y Greathead 1989, Jenkins *et al.*, 1998, LUBILOSA 1998, Cherry *et al.*, 1999).

Tabla 2. Comparación de la clasificación del género *Metarhizium* basada en caracteres morfológicos y en taxonomía molecular.

TAXONES RECONOCIDOS MORFOLÓGICAMENTE ¹	TAXONES RECONOCIDOS MOLECULARMENTE ² DIEZ GRUPOS (CLADOS)
	<i>M. album</i>
<i>M. album</i> (Petch)	<i>M. flavoviride</i> Tipo E
	<i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i>
<i>M. anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	<i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i>
var. <i>anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	<i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i>
var. <i>majus</i>	<i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>
	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>
<i>M. flavoviride</i> (Gams & Roszypal)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i>
var. <i>minus</i> (Rombach)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
var. <i>flavoviridae</i> (Gams & Roszypal)	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>

¹Samson et al., 1988; Hawksworth et al., 1995.

²Driver et al., 2000.

Otro insecticida biológico "Green Guard" se desarrolló por la Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) en Australia. Se utiliza operacionalmente para el control de la langosta australiana *Chortoicetes terminifera* Walker, y la langosta migratoria *Locusta migratoria* Linnaeus (Hunter et al., 2000, Milner y Staples 1998, Milner y Rowland 1998). Los aislamientos IMI 330189 y FI985 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* están siendo formulados por CABI Bioscience y CSIRO respectivamente. *Metarhizium* ha sido recomendado por la FAO para el control de langosta y saltamontes en áreas ambientalmente sensibles como los ranchos de agricultura orgánica, parques nacionales, reservas naturales y áreas protegidas (Jenkins et al., 1998).

En México, se implementó en 1996, el uso del manejo integrado de plagas, por lo que la atención fitosanitaria para el control de la langosta *Schistocerca piceifrons* ssp. *Piceifrons* Walker se lleva a cabo autorizada en el marco legal de la norma oficial mexicana NOM-049-FITO-1995. La langosta ha demostrado capacidad de alimentarse tanto de plantas cultivadas como de vegetación en general, se conocen más de 400 especies de plantas que sirven como alimento de la langosta, resultando mayormente afectados los pastizales, agostaderos y los cultivos de maíz, frijol, sorgo, soya, caña de azúcar, cítricos, plátano, coco y mango.

Existe una gran diversidad de enemigos naturales de la langosta, vertebrados e invertebrados y microorganismos. Entre ellos: virus (entomopoxvirus EPV, Greathead 1992, Streett *et al.*, 1997), bacterias *Enterobacter* (Prior y Greathead 1989), protozoarios como *Nosema locustae* Canning (Henry y Oma 1981, Raina *et al.*, 1987) y nemátodos de la familia *Mermithidae* (Beker y Capinera 1997). Sin embargo, los hongos son los patógenos más frecuentemente reportados sobre acrididos (Greathead y Prior 1989).

Los hongos entomopatógenos infectan a los insectos por penetración del integumento aunque puede distinguirse un mecanismo básico de infección que consiste en:

- a) adhesión de los conidios, b) penetración al insecto con la producción de enzimas como proteasas y quitinasas, que facilitan la digestión de las capas más externas (epicutícula), y la degradación de las capas internas (procutícula y epidermis) hasta invadir el hemocele con la aparición de blastosporas, c) diseminación del hongo en el interior del insecto y d) salida del hongo al exterior del insecto y su posterior esporulación (St. Leger, 1995) (Figura 1).

En el interior del insecto, el hongo se reproduce, matándolo en pocos días. El periodo que tarda el hongo en producir la infección es aproximadamente de 6-7 días. Los insectos enfermos disminuyen el consumo de alimento 3-4 días después de haber sido infectados, volviéndose más lentos y muriendo para el sexto o séptimo día, dependiendo de la cepa.

Los insectos son artrópodos, por lo que poseen un esqueleto externo o cutícula que tiene la función de anclaje muscular y soporte. La función defensiva en la cutícula es evidente y sólo los hongos entomopatógenos han desarrollado la capacidad de invadir al insecto por esta ruta. Debido a la complejidad estructural de la cutícula, es necesaria su degradación enzimática para que el hongo pueda tener acceso a los nutrimentos del interior del insecto (Glare y Milner, 1991; Hernández-Velásquez, 1995).

Entre las enzimas involucradas en el proceso de degradación de la cutícula, así como en las demás fases de la infección se encuentran las proteasas, quitinasas y lipasas principalmente.

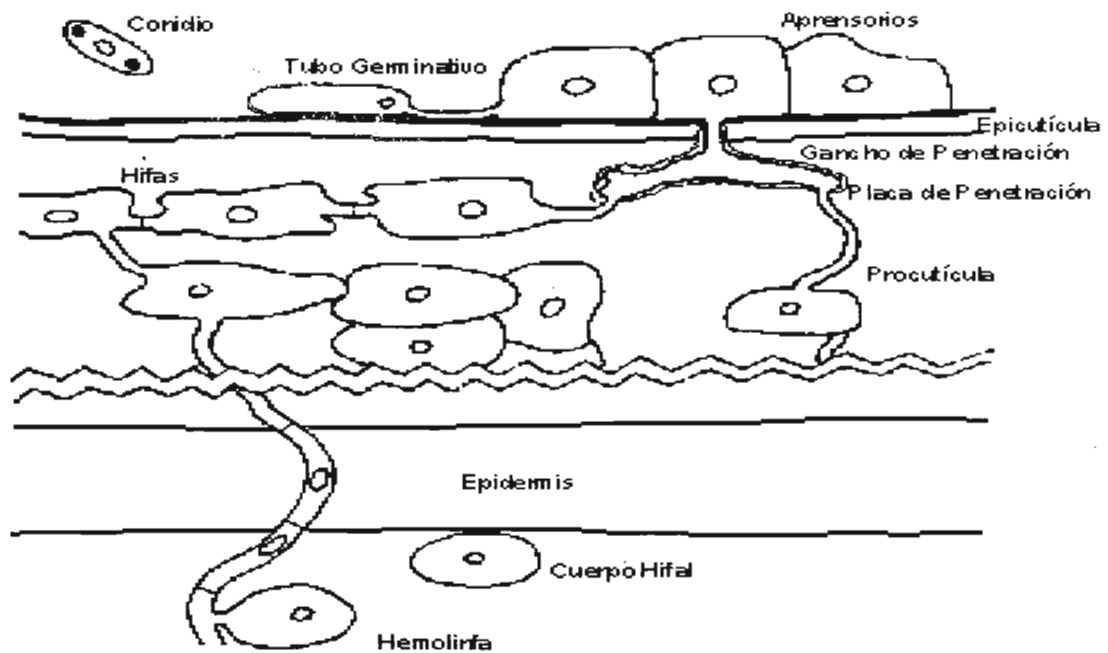


Figura 1. Mecanismo de penetración de los hongos entomopatógenos
Tomado de Charnley y St. Leger, 1991.

2. ANTECEDENTES

En México, se han reportado varias especies del orden Orthoptera causando problemas al sector agrícola, tales como los chapulines (*Sphenarium* sp. *Melanoplus* sp. *Brachystola* sp., *Taeniopoda* sp.) y la langosta (*S. piceifrons*). Esta última especie mencionada es clasificada como un insecto gregario (con alta capacidad de formar grandes grupos o mangas), y es, sin duda, objeto de preocupación para los estados del sureste de México, lugar donde comúnmente se presenta en los cultivos, de los cuales se desplaza a los campos agrícolas, representando un peligro potencial para los estados de la vertiente del Pacífico y Golfo de México (Ramírez *et al.*, 2001).

En nuestro país se distribuye en las entidades de menor altitud sobre el nivel del mar, como lo son: Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Ramírez *et al.*, 2001).

Se consideran cinco zonas gregarígenas principales (Figura 2) que cubren una superficie aproximada de 20,000 ha, extendiéndose la zona de invasión a más de cinco millones de hectáreas (SAGAR, 2000).

Estas zonas son:

1. **Yucatán**, donde se encuentran dos áreas, la primera está dentro de la zona henequenera de los estados de Yucatán y Campeche. La segunda y más importante, de la cual han provenido las mangas que han causado mayores daños a los cultivos agrícolas y de importancia pecuaria se localiza en los municipios de Dzilam González, Buctutz, Panabá, Cenotillo y en menor grado San Felipe, Tizimin y Río Lagartos.
2. **Veracruz**, se ubica en los municipios de Medellín, Boca del Río, Alvarado, Tlalixcoyan y Tierra Blanca. Veracruz es la segunda zona en importancia y ha ocasionado invasiones graves en el mismo estado.
3. **Chahuities-Tapanatepec**, se encuentra en los límites de Oaxaca y Chiapas, dentro del triángulo geográfico formado por los poblados de Salina Cruz, Chahuities y Tepanatepec. Esta zona no ha tenido tan graves problemas con esta plaga como la zona anterior, pero ha causado invasiones en el Istmo de Tehuantepec y otros lugares del estado de Oaxaca.

4. **San Luis Potosí-Tamaulipas**, se encuentra en los límites de los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas, en los valles de la sierra Nahola. El impacto que ha tenido esta zona es menor que en las zonas anteriores pero ha dado lugar a las invasiones que se presentan en las Huastecas Potosina y Tamaulipeca.
5. **Tabasco**, se localiza en los límites con los estados de Campeche y Chiapas y el Departamento de Flores de Guatemala, abarca los municipios de Tenosique, Balancán y Emiliano Zapata en Tabasco y la Libertad en Chiapas. Esta área ha permanecido inactiva por el tiempo más o menos largo aunque en la actualidad presenta actividad fuerte.

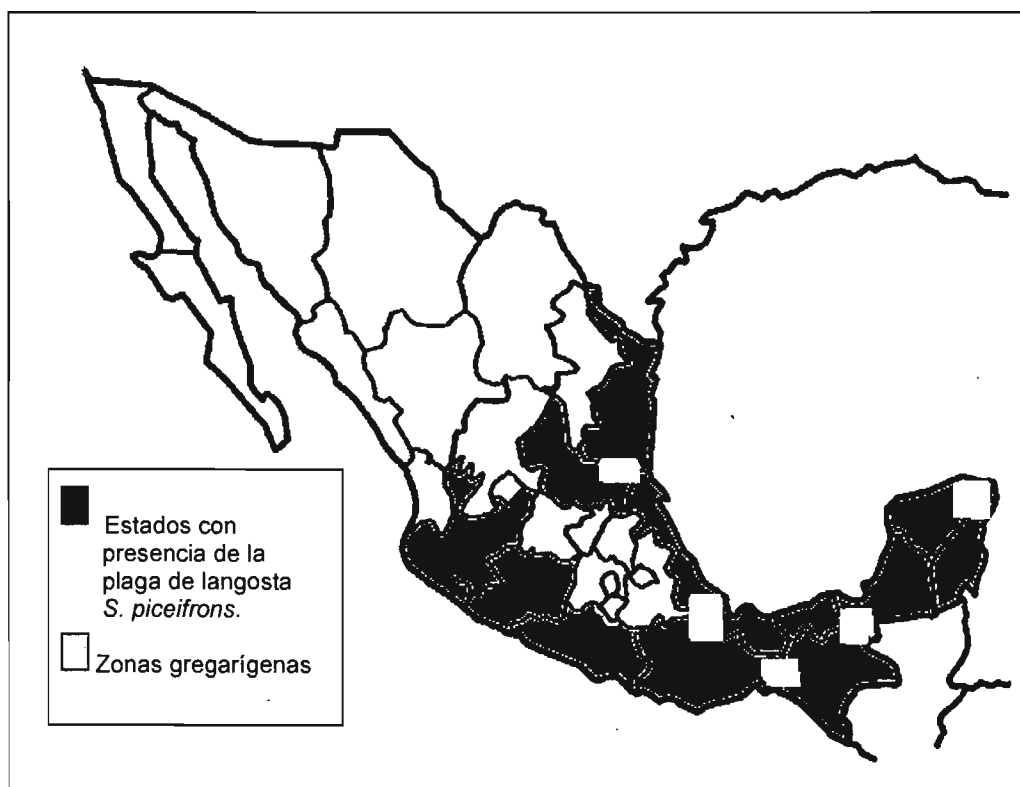


Figura 2. Distribución y zonas gregarígenas de la langosta *Schistocerca piceifrons* en México.

Schistocerca piceifrons tiene capacidad para cambiar sus hábitos y conducta cuando se encuentra en grandes números, llegando a formar lo que se llaman bandas (compuestas de ninfas o saltones) y mangas (grupo de adultos).

Las mangas pueden migrar a grandes distancias. Cuando la langosta se encuentra en bajas poblaciones, conocidas como fase solitaria, se comportan como chapulín y su coloración es diferente a la fase gregaria (Ramírez *et al.*, 2001).

Actualmente en México, el químico es el único medio de control de la langosta; 20 000 ha en promedio son tratadas, con alrededor de 500 toneladas de paratión metílico en polvo al 3%, con un costo de \$1 000 000 en insecticidas y \$3000 000 en mano de obra para la aplicación. Si se descuidan las actividades de vigilancia y control existe el riesgo de que la superficie se vea afectada 50 veces (SAGAR, 2000).

Desde que se inició el proyecto de control microbiano de la langosta *S. piceifrons* en México en 1991, el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), en conjunto con instituciones educativas, han dado las bases para que los programas de control biológico sean cada vez más adecuados a nuestro país.

A nivel mundial se han desarrollado estudios sobre la función de las quitinasas y proteasas y su participación en el proceso de infección (Tabla 3), pero los resultados propuestos no han aclarado completamente el papel de las enzimas en la degradación de la cutícula, por lo que se requiere de estudios enzimáticos de aislamientos de México. Para tratar de esclarecer el papel de dichas enzimas en el proceso de infección se han clonado los genes que codifican para las mismas, entre los cuales está el gen que codifica para la proteasa degradadora de la cutícula (*pr1*), el cual se encuentra en el genoma de *M. anisopliae* (St Leger *et al.*, 1996), y también de *Verticillium lecanii* (GenBank, número de acceso: AF059582). En otros estudios se han clonado genes para la quitinasa (Gen *chi1*) aislamiento s de *Metarhizium flavoviride* (GenBank, número de acceso: MFL243014), y para una serin proteasa Pr1A (Gen *pr1A*) de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (GenBank, número de acceso: MAN251925).

Otra parte fundamental para el estudio de agentes microbianos para el control biológico, es la diferencia en virulencia de aislamientos provenientes de diversas regiones geográficas (Bateman *et al.*, 1996). De ahí la relevancia de conocer la virulencia de aislamientos autóctonos de México.

Tabla 3. Participación de las quitinasas y proteasas de *M. anisopliae* en el mecanismo de ataque a insectos.

AUTOR Y AÑO	RESULTADOS REPORTADOS	CITADO POR
Huber, 1958	Señaló la capacidad de los hongos entomopatógenos para producir enzimas extracelulares, sin aclarar de qué tipo, como las responsables de la degradación de las capas cuticulares.	St. Leger <i>et al.</i> , 1986a
Mc. Cauley <i>et al.</i> , 1968	Observaron que la penetración del tubo de germinación va acompañada de la formación de una zona clara alrededor, que indica actividad enzimática.	Khachatourians, 1992
Hedlund y Pass, 1968 y Zacharuk-Ry, 1981	Observaron la degradación de tejidos de insectos después de la invasión por hifas.	Khachatourians, 1992
Zacharuk, 1970	Observaron la desaparición de la capa de cera en la cutícula del gusano barrenador, bajo los apresorios del hongo, lo que sugiere la participación de una lipasa en el mecanismo de penetración.	Khachatourians, 1992
Sosa-Gómez y Alves, 1983	Encontraron una correlación negativa entre la capacidad de producción de enzimas del hongo, con los procesos de patogénesis y virulencia, las enzimas probadas fueron proteasas y una amilasa.	Sosa-Gómez y Alves, 1983
Coudron <i>et al.</i> , 1986	Examinaron la producción de endo y exoquitinasa de aislamientos virulentos y avirulentos; los primeros tenían de 10 a 17 veces más actividad. No se hace mención de la manera en que se midieron las actividades enzimáticas.	Khachatourians, 1992
St. Leger <i>et al.</i> , 1986	Identificaron una endoproteasa, una quitinasa y una N-acetil- β -glucosaminidasa en diferentes aislamientos del hongo.	St. Leger <i>et al.</i> , 1986a
St. Leger <i>et al.</i> , 1986	Identificaron una serin-proteasa con dos actividades: Pr1 y Pr2. Ambas intervenían en los procesos de melanización y virulencia hacia <i>Manduca sexta</i> .	St. Leger <i>et al.</i> , 1986b
St. Leger <i>et al.</i> , a partir de 1986	Encontraron que la proteasa del hongo participaba en la degradación de la cutícula, y en los procesos de infección hacia diferentes insectos como la langosta del desierto.	St. Leger <i>et al.</i> , 1986-1999
Pendland y Kucera, 1982 a 1987	Demostraron que durante la fase de invasión, el hongo producía proteasas, que eran inhibidas por compuestos presentes en la hemolinfa de los insectos.	Khachatourians, 1992
Clarkson y Charnley, 1996	Mencionaron las enzimas extracelulares, principalmente proteasas, como parte del mecanismo de penetración en la cutícula de los insectos.	Clarkson y Charnley, 1996
Goettel <i>et al.</i> , 1989	Reportaron la producción de la proteasa PR1 en los apresorios, durante el proceso de infección a <i>M. sexta</i> .	Goettel <i>et al.</i> , 1989

St. Leger <i>et al.</i> , 1991	Demostraron la producción de proteasas semejantes a la PR1 de <i>M. anisopliae</i> en todos los aislamientos ensayados, lo que sugiere una adaptación para ser patógenos de insectos.	St. Leger <i>et al.</i> , 1991
St. Leger <i>et al.</i> , 1994	Reportaron tres tipos de proteasas diferentes, durante el crecimiento en medios con cutícula de cucaracha. Cada enzima presentó varias isoformas, las cuales se caracterizaron de acuerdo a su especificidad hacia el sustrato y por sus patrones de inhibición. También mencionaron la presencia de una metaloproteasa.	St. Leger <i>et al.</i> , 1994
Paterson <i>et al.</i> , 1994	Demostraron la inducción de la síntesis de una proteasa, al agregarse cutícula molida de los insectos al medio de cultivo. Si se usaban otras fuentes de carbono y nitrógeno no ocurría la síntesis de dicha enzima.	Paterson <i>et al.</i> , 1994a y 1994b
Joshi <i>et al.</i> , 1997	Identificaron los genes que codifican para la actividad PR1 de una serin-proteasa.	Joshi <i>et al.</i> , 1997
Gillespie <i>et al.</i> , 1998	No encontraron correlación significativa entre la capacidad de las proteasas para degradar un sustrato cromogénico, y el TL ₅₀ en ensayos en langosta.	Gillespie <i>et al.</i> , 1998
Chul-Kang <i>et al.</i> , 1998	Llevaron a cabo el aislamiento de un gen que codifica una quitinasa.	Kang <i>et al.</i> , 1998
Chul-Kang <i>et al.</i> , 1999	Reportaron las actividades de una endo y una exoquitinasa.	Kang <i>et al.</i> , 1999
St. Leger <i>et al.</i> , 1999	Observaron la modificación del pH del medio al liberarse compuestos alcalinos de carácter proteico. Esto podría crear un ambiente óptimo para la acción de las proteasas.	St. Leger <i>et al.</i> , 1999

Modificado de Castellanos-Moguel MJ. 2002.

3. JUSTIFICACIÓN

En México no se cuenta con un producto biológico para el control de la langosta. Para el desarrollo de un agente microbiano se requieren pruebas geno y fenotípicas para seleccionar los aislamientos que sean los más adecuados para el control de la langosta en el país. Conociendo que las principales enzimas relacionadas con la virulencia son las proteasas y las quitinasas en el proceso de infección de los hongos entomopatógenos se propone el presente trabajo para determinar las actividades enzimáticas de proteasas y quitinasas en aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum* de México, en relación con la virulencia del hongo en la langosta *S. piceifrons piceifrons*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* de México presentarán resultados variables en la actividad de la quitinasa y la proteasa, así como en su virulencia contra la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las actividades de las quitinasas y las proteasas de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* y analizar su relación con la virulencia del hongo contra la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad de quitinasas y proteasas en cultivo sumergido de aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum* de México.
2. Evaluar la virulencia del hongo hacia adultos de langosta *S. piceifrons piceifrons*, a través del tiempo letal medio (TLM).
3. Analizar los resultados de las actividades enzimáticas en los aislamientos del hongo estudiado y determinar si existe relación con la virulencia del entomopatógeno hacia la langosta.

4. METODOLOGÍA

4.1. Aislamientos fúngicos

En la presente investigación se trabajó con 16 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* procedentes de Colima e Isla Socorro (Tabla 4) proporcionados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), de Tecomán, Colima y depositados en la colección del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se realizaron cultivos monospóricos de los aislamientos originales (Cano *et al.*, 2002) y éstos fueron utilizados para todas las pruebas. Los aislamientos fueron mantenidos en agar de glucosa-Sabouraud.

Tabla 4. Características de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* de *Schistocerca piceifrons* estudiados.

Aislamientos originales CNRCB	Cultivo		Origen
	monospórico UNAM	Cultivo agricola	
MaPL5	EH-483/8 ¹	Pastos	Colima
MaPL8	EH-484/6	Pastos	Colima
MaPL13	EH-486/7	Pastos	Colima
MaPL14	EH-487/4	Pastos	Colima
MaPL15	EH-488/7	Pastos	Colima
MaPL16	EH-489/1	Pastos	Colima
MaPL18	EH-490/1	Pastos	Colima
MaPL20	EH-491/8	Pastos	Colima
MaPL22	EH-493/1	Pastos	Colima
MaPL26	EH-494/4	Pastos	Colima
MaPL29	EH-497/7	Pastos	Colima
MaPL31	EH-498/8	Pastos	Colima
MaPL37	EH-499/10	-----	Isla Socorro
MaPL38	EH-500/2	-----	Isla Socorro
MaPL40	EH-502/8	-----	Isla Socorro
MaPL32	EH-531/8	Pastos	Colima

¹ cultivo monospórico seleccionado (Cano *et al.*, 2002).

4.1.1. Preparación de la suspensión fúngica

La preparación del hongo para los estudios de determinación enzimática se realizó mediante conteo directo de los conidios. Para esto, los conidios fueron colectados a partir de colonias esporuladas sembradas en agar de glucosa-Sabouraud (en g/ml: glucosa 20, peptona 10, agar 15, agua destilada 1000 ml) 15 días a 28 °C, agregando tween 80 al 0.05 % estéril, y raspando la superficie de la colonia con ayuda de un asa de siembra. Se contaron los conidios en cámara de Neubauer, el conteo fue válido cuando la desviación estándar fue de 10-15 % de la media (Goettel e Inglis, 1997).

4.2. Determinación de quitinasas

Para la determinación de la actividad quitinolítica se utilizó un medio con sustrato quitinoso, en este caso quitina coloidal (Sigma, México). El método se basa en la liberación del colorante unido a la quitina, cuando ésta es hidrolizada por la quitinasa extracelular del hongo.

4.2.1. Preparación de quitina coloidal

Se utilizó quitina comercial (Sigma) la cual se molió en un molino Wiley con luz de malla de 40. Para hacerla coloidal, por cada 10 g de quitina se agregaron 100 ml de H₃PO₄ al 85 % agitando manualmente, y se guardó en refrigeración durante 24 h. Posteriormente, se añadió agua en exceso para propiciar la formación de la quitina coloidal. Se filtró a través de gasa y se lavó con agua hasta eliminar la acidez. La pasta gelatinosa obtenida se colocó en un frasco de boca ancha, se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C y se guardó en refrigeración hasta su uso (Chávez-Camarillo y Cruz- Camarillo, 1984).

La quitina coloidal preparada se tiñó con azul brillante de remazol (Sigma) colocando en un vaso de precipitados 7 g de quitina coloidal y 0.23 g del colorante previamente disuelto en agua. La mezcla se calentó a ebullición durante 1 h, luego se filtró y se lavó con agua fría y después con agua caliente hasta que ya no se observó desprendimiento de color. Se dejó escurrir y se colocó nuevamente en un vaso de precipitados. Para favorecer la fijación de color, se agregó 0.075 g de dicromato de sodio y 0.075 g de

tartrato de sodio y potasio por cada 5 g de quitina coloidal teñida. La mezcla se dejó hervir por 10 min y después se repitió el proceso de lavado, se escurrió y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C. Se conservó en refrigeración hasta su uso (Gómez-Ramírez, 2000).

4.2.2. Producción de quitinasas en cultivo sumergido

Se probó el medio sintético de Castañeda (Chávez–Camarillo y Cruz Camarillo, 1984) (g/ml: citrato diamónico 0.625, cloruro de sodio 0.25, fosfato monobásico de potasio 0.375, carbonato de sodio 0.375, sulfato de magnesio 0.275, glicerol 6.25 ml, agua destilada 1000 ml) sin citrato ni glicerol, se agregó quitina coloidal teñida al 2 % (peso/volumen). En matraces Erlenmeyer de 250 ml se agregaron 70 ml de cada medio, los matraces se esterilizaron en autoclave 15 min a 121 °C, y después se sembraron con una suspensión de 1×10^7 conidios/ml. Una vez sembrados fueron incubados en agitación orbital a 150 rpm y 28 °C durante 13 días. Esta prueba se realizó por triplicado y se colocó otro matraz sin hongo como testigo. Cada 48 h se colectó una muestra (por triplicado) de 1.5 ml de todos los aislamientos y el testigo, la cual se centrifugó a 4500 rpm durante 30 min. El sobrenadante se utilizó de inmediato para la determinación de la actividad quitinolítica, leyendo la absorbancia a 595 nm.

La actividad se expresó en unidades, siendo una unidad igual a la cantidad de enzima que origina un cambio de 0.010 en la absorbancia a 595 nm (Gómez-Ramírez, 2000).

4.2.3. Pruebas preliminares

Se realizaron con siete de los 16 aislamientos estudiados para comprobar que los medios seleccionados fueran adecuados para las pruebas.

En el caso de las quitinasas se probó primero el medio sintético de Castañeda (Chávez–Camarillo y Cruz Camarillo, 1984) sin citrato ni glicerol con 2 % de quitina coloidal, no se observó actividad enzimática. Se realizaron pruebas de viabilidad de los conidios, de los mismos inóculos de la cinética en medio de Sabouraud y sí se observó crecimiento, por lo que se descartó la posibilidad de que los conidios estuvieran inactivos.

Por lo tanto se realizaron pruebas en diferentes medios de cultivo. Para observar la hidrólisis de la quitina, se utilizaron placas de Petri con quitina coloidal como única fuente de nitrógeno y carbono. Los medios probados fueron: quitina con agua y medio de Castañeda (Chávez–Camarillo y Cruz Camarillo, 1984) con 2 % de quitina coloidal con glicerol como una fuente adicional de nitrógeno y carbono.

Las cajas de Petri con los medios fueron perforadas en el centro para obtener un pozo de 4 mm de diámetro. Cada caja se sembró con 100 µl de la suspensión de conidios previamente preparada. Todos los medios se incubaron a 26 °C hasta observar el crecimiento de la colonia y la aparición del halo.

Posteriormente se probó el medio de sales según Kang *et al.* (1999) (en g/ml: fosfato monobásico de potasio 0.375, sulfato de magnesio 0.275, agua destilada 1000 ml) con la quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol. Se procedió con la metodología antes descrita.

4.3. Determinación de proteasas

El método de las proteasas se basa en la hidrólisis de la azocaseína (Sigma) que libera péptidos coloreados de bajo peso molecular, los cuales alcanzan su máxima absorbancia a 440 nm.

4.3.1. Producción de proteasas en cultivo sumergido

Para la producción de proteasas se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 70 ml de medio H (en g/ml: sacarosa 10, dextrosa 5, peptona 0.5, extracto de levadura 5, agua destilada 1000 ml) con caseína al 1 %.

Los matraces se esterilizaron en autoclave 15 min a 121 °C y después se sembraron con una suspensión de 1×10^7 conidios/ml. Luego se incubaron en agitación orbital a 150 rpm y 28 °C durante 13 días. Cada 48 h se colectó una muestra de 1.5 ml (por triplicado), la cual se centrifugó a 4500 rpm a 4 °C durante 30 min.

El sobrenadante se congeló a -20 °C hasta el momento de realizar la cinética. El testigo consistió de medio H sin sembrar al que se le realizó el mismo procedimiento que las muestras.

4.3.2. Determinación de la actividad proteolítica

Para la determinación de la actividad enzimática se disolvió azocaseína (Sigma) al 2 % en regulador de fosfatos pH 7, eliminando por centrifugación los grumos insolubles que pudieran haberse formado.

Para el ensayo, se utilizaron 150 µl del sobrenadante tomados cada 48 h (descrito en el párrafo anterior) y se les agregó 250 µl de azocaseína al 2 %. Las muestras se incubaron a 25 °C por una 1 h. Luego se agregaron 1.2 ml de ácido tricloroacético (ATC) al 10 %, se dejó reposar durante 15 min, y se centrifugó a 4500 rpm a 4 °C durante 30 min. Se tomaron 1.2 ml de sobrenadante y se agregaron 1.4 ml de hidróxido de sodio 1.0 M y se leyó la absorbancia a 440 nm.

Los testigos se prepararon de la misma manera que los problemas, pero el ATC se agregó antes que la enzima. La actividad de proteasas se expresó en unidades, siendo una unidad la cantidad de enzima que origina un cambio de 0.010 en la absorbancia a 440 nm (Sarath *et al.*, 1989).

4.4. Bioensayos de virulencia en langosta

El bioensayo de virulencia se realizó en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, bajo la asesoría del Dr. Víctor Manuel Hernández Velásquez (Hernández-Velázquez *et al.*, 2000). Los insectos utilizados fueron adultos de langosta (*S. piceifrons*). El primer bioensayo se llevó a cabo en noviembre de 2001, y el segundo en noviembre de 2002.

Las langostas utilizadas en el bioensayo se mantuvieron en el laboratorio de entomopatógenos del CNRCB en donde se conservaron en jaulas de cría de 60 x 60 x 60 cm, utilizando como dieta hojas de yuca (*Manihot esculenta*) ya que es un vegetal abundante en la zona.

Se obtuvieron conidios a partir de los aislamientos a evaluar, cultivados en agar papa dextrosa (en g/ml: infusión de papa 300, dextrosa, 20, agua 1000 ml) incubados durante dos semanas a 28 °C. Se realizó una suspensión de los conidios en citrolina y se realizó un conteo en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) obteniendo una concentración de 3.7×10^7 conidios /ml.

Se inocularon veinte insectos por aislamiento. Para cada tratamiento, con tres réplicas. Los insectos fueron inoculados individualmente con 2 µl de la suspensión de conidios en el pronoto y se colocaron en botes de plástico cubiertos con tela de muselina, distribuyendo 4 insectos por bote, identificándolos adecuadamente. Los botes se conservaron en el laboratorio a 26 °C.

Las langostas se alimentaron diariamente con hojas de yuca. La mortalidad se registró diariamente, los insectos muertos se colocaron en cajas plásticas de Petri con papel filtro en el fondo de las cajas.

Las variables registradas durante el experimento fueron: mortalidad, fecha de emergencia de micelio, área del insecto de emergencia del micelio (antenas, alas, patas) y fecha de esporulación. Los datos se analizaron con la mortalidad acumulada, corregida con la fórmula de Abbot cuando fue necesario. La virulencia se calculó con el tiempo letal medio (TLM) de acuerdo a la siguiente fórmula (Bateman *et al.* 1993):

$$TLM = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

Donde: X = sobrevivencia en testigo

Y = sobrevivencia en tratamiento

4.5. Análisis estadístico

A todos los datos obtenidos se les aplicó análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) para detectar significancias. En los parámetros con significancia, se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Se realizó un análisis de clasificación por medio de agrupamiento jerárquico, por medio de una matriz de distancias euclidianas que se definió a través de la concentración enzimática. Los datos se codificaron con base en la concentración enzimática y la virulencia de cada aislamiento. Todos los análisis se llevaron a cabo con los programas estadísticos SYSTAT versión 9.0 (1999) y S.P.S.S. versión 11.0 (2001).

5. RESULTADOS

En las pruebas preliminares con el hongo *M. anisopliae* var. *acridum*, el medio de Castañeda (Chávez–Camarillo y Cruz Camarillo, 1984) sin citrato ni glicerol con 2 % de quitina coloidal, no produjo quitinasas. Al realizar pruebas en placa ninguno de los dos medios propuestos (quitina con agua y medio de Castañeda con glicerol y 2 % de quitina) resultó eficiente, por lo que se probó el medio de sales de Kang en donde se apreciaron cantidades significativas de quitinasa. Por esto, se eligió este medio para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas de quitinasas de los 16 aislamientos estudiados.

En el caso de las proteasas se utilizó el medio H con caseína para todas las determinaciones ya que todos los aislamientos estudiados crecieron en este medio.

5.1. Quitinasas

Se observa una tendencia similar entre los aislamientos, respecto a la producción de quitinasas. La producción enzimática empieza en las primeras 72 h y continúa incrementándose hasta las 312 h donde cada aislamiento obtiene su máxima producción. Los aislamientos EH-483/8 y EH-499/10 presentaron las máximas producciones de quitinasas con 43.1 y 43.7 UQ/ml, mientras que los aislamientos EH-497/7 y EH-500/2 tuvieron la mínima producción de quitinasa con 5.9 y 5.5 UQ/ml, respectivamente a las 312 h. En la Tabla 5 se muestran los resultados ($X \pm DS$) de todos los aislamientos a las 24, 72, 120, 168, 216, 264 y 312 h del experimento.

En la Figura 3 a y b se muestra la cinética de producción de quitinasas de los 16 aislamientos estudiados. La tendencia de producción enzimática de todos los aislamientos es similar con la excepción de EH-497/7, EH-500/2 y EH-502/8 (Figura 3 b) en las cuales la actividad de quitinasas se mantiene en un rango de 1.7 a 7.4 UQ/ml durante las 312 h del ensayo.

El análisis estadístico de los datos de la producción de quitinasas mostró diferencias significativas entre los diferentes aislamientos en cada uno de los tiempos estudiados (Tabla 5). Al realizar la prueba de comparación múltiple de medias, se

observó que a las 24 h, se formaron dos grupos; a las 72 h, siete grupos; a las 120 h, seis grupos; a las 168 h, ocho grupos; a las 216 h, cinco grupos; a las 264 h, cuatro grupos y a las 312 h, se formaron seis grupos diferentes en cuanto a la producción de quitinasa. Los árboles correspondientes a las agrupaciones jerárquicas de las 24, 72, 120, 168, 216 y 264 h se incluyen en el anexo 1, y en todos se muestra la diferencia de producción de quitinasas entre aislamiento s.

Los aislamientos EH-497/7, EH-500/2 y EH-502/8 se mantienen en el mismo grupo de producción menor de quitinasas durante todos los tiempos del ensayo.

Tabla 5. Producción de quitinasa de 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*.

Aislamiento	24 h	72 h	UQ/ml ¹ ($\bar{X} \pm DS$) ² 120 h	168 h	216 h	264 h	312 h
EH-483/8	4.8 ± 0.68 b ³	7.8 ± 0.35 def	10.9 ± 0.70cde	16.7 ± 0.71 def	20.9 ± 0.64 cd	32.5 ± 0.56 d	43.1 ± 0.13 f
EH-484/6	0.1 ± 0.18 a	3.5 ± 0.52 b	9.3 ± 0.40 bc	16.1 ± 0.83 cde	14.2 ± 0.12 b	20.3 ± 0.03 b	21.5 ± 0.09 b
EH-486/7	4.1 ± 0.10 b	5.4 ± 0.25 def	8.6 ± 0.20 b	13.9 ± 0.50 bcd	18.3 ± 0.85 bc	27.9 ± 0.47 cd	30.9 ± 0.48 de
EH-487/4	5.5 ± 0.51 b	5.0 ± 0.36 def	9.3 ± 0.03 bcd	12.8 ± 0.75 b	18.5 ± 0.79 bc	25.5 ± 0.22 bc	28.2 ± 0.47 cde
EH-488/7	0.1 ± 0.17 a	5.7 ± 0.36 f	12.3 ± 0.13e	19.3 ± 0.36 fg	20.8 ± 0.94 cd	27.8 ± 0.33 cd	28.3 ± 0.79 cde
EH-489/1	0.0 ± 0.06 a	4.9 ± 0.36 def	11.5 ± 0.27 de	18.8 ± 0.24 efg	17.5 ± 0.26 bc	22.8 ± 0.65 bc	24.5 ± 0.88 bc
EH-490/1	3.8 ± 0.89 b	4.7 ± 0.36 cdef	8.5 ± 0.16 b	13.3 ± 0.94 bc	16.4 ± 0.42 bc	26.9 ± 0.48 c	33.9 ± 0.07 e
EH-491/8	0.2 ± 0.17 a	5.9 ± 0.35 f	11.0 ± 0.35cde	19.6 ± 0.46 fg	17.3 ± 0.57 bc	21.1 ± 0.27 b	27.3 ± 0.86 cd
EH-493/1	0.6 ± 0.31 a	8.7 ± 0.15 g	17.1 ± 0.31 f	24.6 ± 0.45 h	24.5 ± 0.91 d	23.0 ± 0.30 bc	29.1 ± 0.95 cde
EH-494/4	4.9 ± 0.67 b	5.5 ± 0.26 f	8.1 ± 0.09 b	12.9 ± 0.42 b	16.2 ± 0.80 bc	23.9 ± 0.94 bc	29.9 ± 0.83 cde
EH-497/7	4.1 ± 0.19 b	4.0 ± 0.50 bcd	2.3 ± 0.29 a	2.4 ± 0.65 a	2.3 ± 0.90 a	4.0 ± 0.55 a	5.9 ± 0.04 a
EH-498/8	0.5 ± 0.54 a	5.9 ± 0.77 f	11.9 ± 0.71 e	20.4 ± 0.57 g	16.9 ± 0.24 bc	23.9 ± 0.24 bc	26.0 ± 0.25 bcd
EH-499/10	1.1 ± 0.21 a	2.0 ± 0.80 a	12.9 ± 0.86 e	17.9 ± 0.07 efg	31.9 ± 0.42 e	32.6 ± 0.34 d	43.7 ± 0.46 f
EH-500/2	4.0 ± 0.07 b	3.9 ± 0.14 bcd	1.9 ± 0.11 a	1.7 ± 0.40 a	2.1 ± 0.35 a	4.7 ± 0.96 a	5.5 ± 0.52 a
EH-502/8	5.0 ± 0.80 b	3.5 ± 0.42 bc	2.1 ± 0.18 a	2.2 ± 0.14 a	2.3 ± 0.70 a	6.2 ± 0.17 a	7.4 ± 0.64 a
EH-531/8	0.5 ± 0.83 a	4.3 ± 0.89bcd	11.4 ± 0.46 cde	18.7 ± 0.91efg	16.0 ± 0.09 bc	23.5 ± 0.35 bc	25.7 ± 0.65 bcd

¹Una unidad es equivalente a la cantidad de enzima que origina un cambio de 0.010 en la absorbancia a 595 nm (Gómez-Ramírez, 2000).

²El experimento se llevó a cabo por triplicado con tres muestras cada 48 h.

³Las letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellas (prueba de comparación múltiple de medias de Tukey).

En la figura 4 se muestra la agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados en cuanto a la producción de quitinasas a las 312 h en donde se puede observar la diferencia evidente entre los aislamientos de baja (EH-497/7, EH-500/2 y EH-502/8), mediana (EH-484/6, EH-486/7, EH-487/4, EH-488/7, EH-489/1, EH-490/1, EH-491/8, EH-493/1, EH-494/4, EH-498/8 y EH-531/8) y alta (EH-483/8 y EH-499/10) producción enzimática.

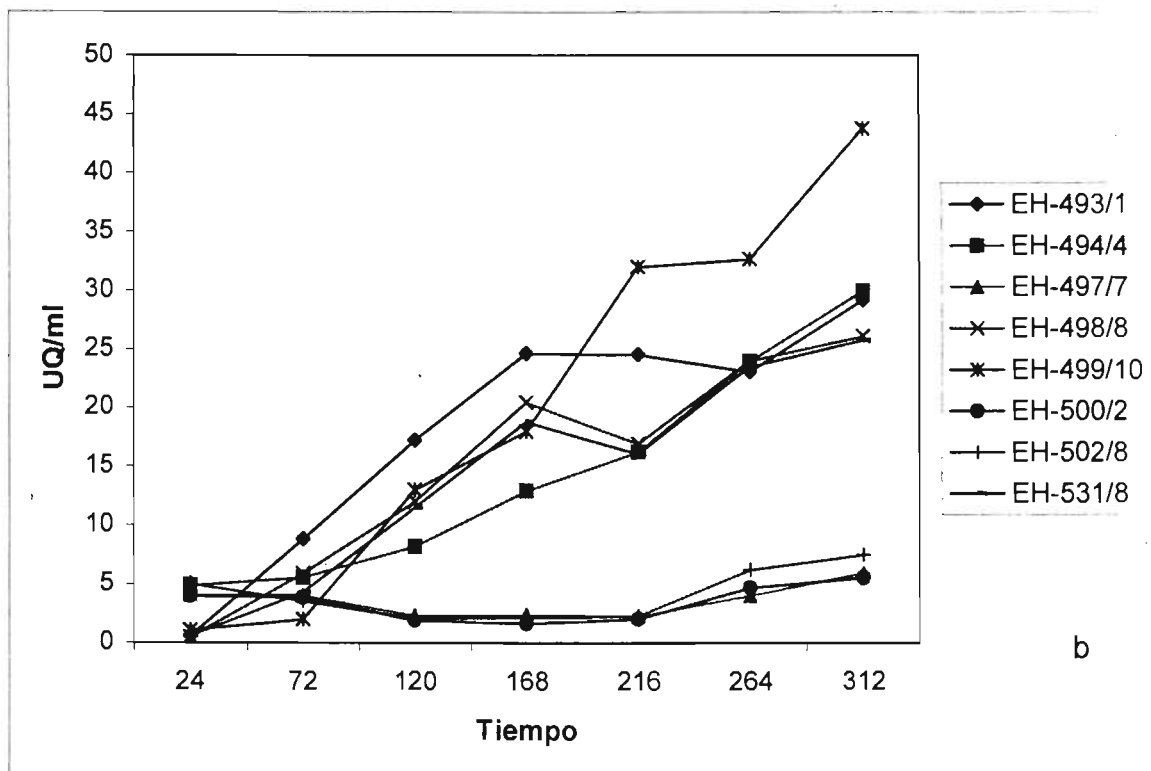
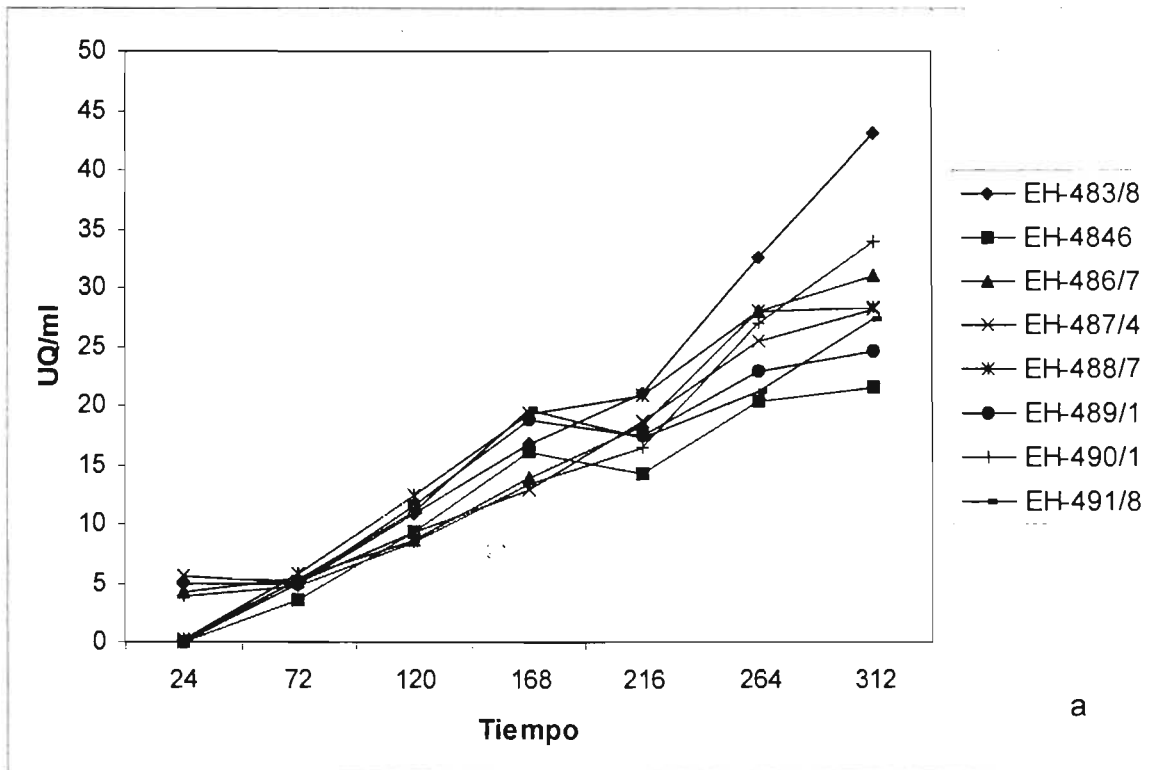


Figura 3. Cinética de producción de quitinasas de 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* en medio de sales según Kang *et al.*, (1999) con quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol (absorbancia a 595 nm).

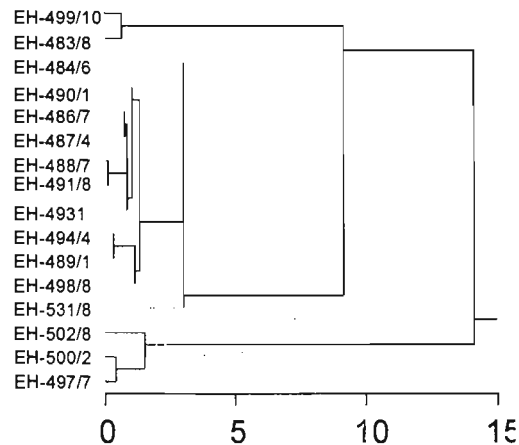


Figura 4. Agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados en cuanto a la producción de quitinasas a las 312 h.

5.2. Proteasas

Se puede observar una tendencia similar en el comportamiento de los aislamientos respecto a la producción de proteasas. Para algunos aislamientos la producción enzimática empieza a las 120 h y continúa incrementándose hasta el final del experimento. Para los aislamientos EH-484/6, EH-487/4 y EH-493/1 el máximo de producción de proteasas fue a las 264 h con 102.9, 159.2 y 119.9 UP/ml, respectivamente. Mientras que el aislamiento EH-499/10 tuvo la mínima producción de proteasas a las 264 h del ensayo con 9.3 UP/ml. Para el resto de los aislamientos la máxima producción fue hasta las 312 h de duración del ensayo.

En la tabla 6 se muestran los resultados ($X \pm DS$) de la actividad enzimática de todos los aislamientos de las 24 a las 312 h del experimento.

La Figura 5 a y b muestra la cinética de la producción enzimática de los 16 aislamientos estudiados. Los aislamientos EH-484/6 y EH-502/8 presentaron un leve incremento en la producción de proteasas a las 120 h (18.7 y 25.5 UP/ml, respectivamente), a las 168 h disminuye y la producción vuelve a incrementarse a las

216 h. Los aislamientos EH-483/8, EH-487/4 y EH-493/1 presentaron la producción a partir de las 120 h. El resto de los aislamientos aumentan su actividad de proteasas a partir de las 216 h.

Tabla 6. Producción de proteasas de 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum*

Aislamiento	24 h	72 h	120 h	UP/ml ¹ ($\bar{X} \pm DS$) ² 168 h	216 h	264 h	312 h
EH-483/8	2.5 ± 0.40 abc ³	3.4 ± 0.97 cd	7.4 ± 0.76 ab	31.7 ± 0.66 c	105.6 ± 0.86 d	108.9 ± 0.82 gh	124.7 ± 0.31 g
EH-484/6	4.2 ± 0.45 f	4.6 ± 0.77 e	18.7 ± 0.28 bc	9.7 ± 0.7 ab	34.0 ± 0.83 c	102.9 ± 0.20 fgh	86.3 ± 0.23 ef
EH-486/7	2.4 ± 0.56 a	2.4 ± 0.57 ab	5.3 ± 0.28 ab	5.8 ± 0.80 a	7.5 ± 0.07 a	70.0 ± 0.61 cde	106.1 ± 0.52 fg
EH-487/4	3.9 ± 0.37 ef	4.0 ± 0.60 de	3.5 ± 0.73 a	42.2 ± 0.94 d	109.5 ± 0.30 d	159.2 ± 0.54 i	126.3 ± 0.86 g
EH-488/7	3.7 ± 0.22 ef	4.2 ± 0.68 de	3.9 ± 0.31 ab	5.9 ± 0.04 a	7.7 ± 0.63 a	67.9 ± 0.48 def	76.0 ± 0.41 def
EH-489/1	2.6 ± 0.64 abc	2.2 ± 0.66 a	5.4 ± 0.87 ab	4.7 ± 0.69 a	6.4 ± 0.94 a	48.6 ± 0.05 bcde	96.2 ± 0.51 f
EH-490/1	2.3 ± 0.30 a	2.3 ± 0.55 a	4.7 ± 0.92 ab	5.2 ± 0.92 a	5.7 ± 0.98 a	45.6 ± 0.85 bcde	52.7 ± 0.64 bcd
EH-491/8	2.1 ± 0.48 a	2.5 ± 0.53 abc	5.8 ± 0.04 ab	5.3 ± 0.64 a	11.5 ± 0.82 ab	67.5 ± 0.39 def	104.3 ± 0.21 fg
EH-493/1	3.5 ± 0.21 def	3.8 ± 0.24 de	6.0 ± 0.69 ab	17.2 ± 0.38 b	26.9 ± 8.77 bc	119.9 ± 0.73 h	105.6 ± 0.66 fg
EH-494/4	2.5 ± 0.53 abc	2.5 ± 0.60 abc	4.6 ± 0.31 ab	4.6 ± 0.33 a	4.9 ± 0.69 a	13.9 ± 0.74 ab	28.0 ± 0.19 a
EH-497/7	3.2 ± 0.68 bcdf	3.3 ± 0.29 bcd	3.7 ± 0.93 a	5.3 ± 0.49 a	6.2 ± 0.45 a	38.7 ± 0.45 abcd	38.1 ± 0.06 abc
EH-498/8	2.8 ± 0.60abcd	2.4 ± 0.46 ab	4.2 ± 0.71 ab	4.1 ± 0.48 a	4.2 ± 0.79 a	13.2 ± 0.45 ab	11.4 ± 0.32 a
EH-499/10	3.5 ± 0.61 def	3.3 ± 0.52 bcd	3.9 ± 0.74 ab	5.5 ± 0.50 a	6.4 ± 0.02 a	9.3 ± 0.26 a	29.8 ± 0.85 a
EH-500/2	3.3 ± 0.50 cde	3.6 ± 0.53 de	4.1 ± 0.97 ab	5.7 ± 0.28 a	5.6 ± 0.70 a	26.3 ± 0.67 abc	60.5 ± 0.57 cde
EH-502/8	3.5 ± 0.47 def	3.6 ± 0.62 de	25.5 ± 0.87 c	16.5 ± 0.72 b	28.2 ± 1.65 c	103.6 ± 0.66 efg	84.6 ± 0.25 ef
EH-531/8	2.5 ± 0.51 ab	2.1 ± 0.49 d	5.8 ± 0.56 ab	4.6 ± 0.52 a	5.9 ± 0.69 a	30.8 ± 0.73 abc	50.0 ± 0.28 bcd

¹ Una unidad es equivalente a la cantidad de enzima que origina un cambio de 0.010 en la absorbancia a 440 nm (Sarath *et al.*, 1989).

² El experimento se llevo a cabo por triplicado con tres muestras cada 48 h.

³ Las letras iguales en la columna indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellas (prueba de comparación múltiple de medias de Tukey).

El análisis estadístico de los datos de la producción de proteasas mostró diferencias significativas entre todos los aislamientos en cada tiempo estudiado (Tabla 6). Al aplicar la prueba de comparación múltiple de medias a los datos obtenidos, se observó que a las 24 h se forman seis grupos, a las 72 h se forman cinco grupos, a las 120 h se forman tres grupos, a las 168 h cuatro grupos, a las 216 h cuatro grupos, a las 264 h nueve grupos y finalmente a las 312 h siete grupos diferentes en cuanto a la producción de proteasas (Anexo 2).

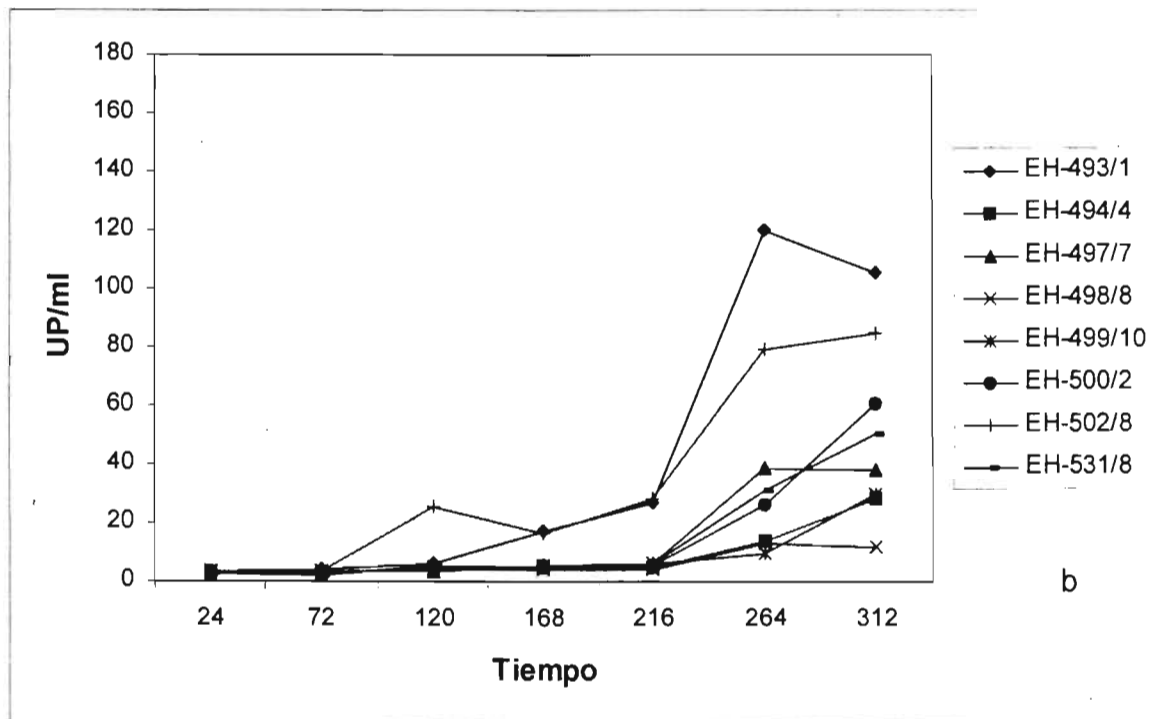
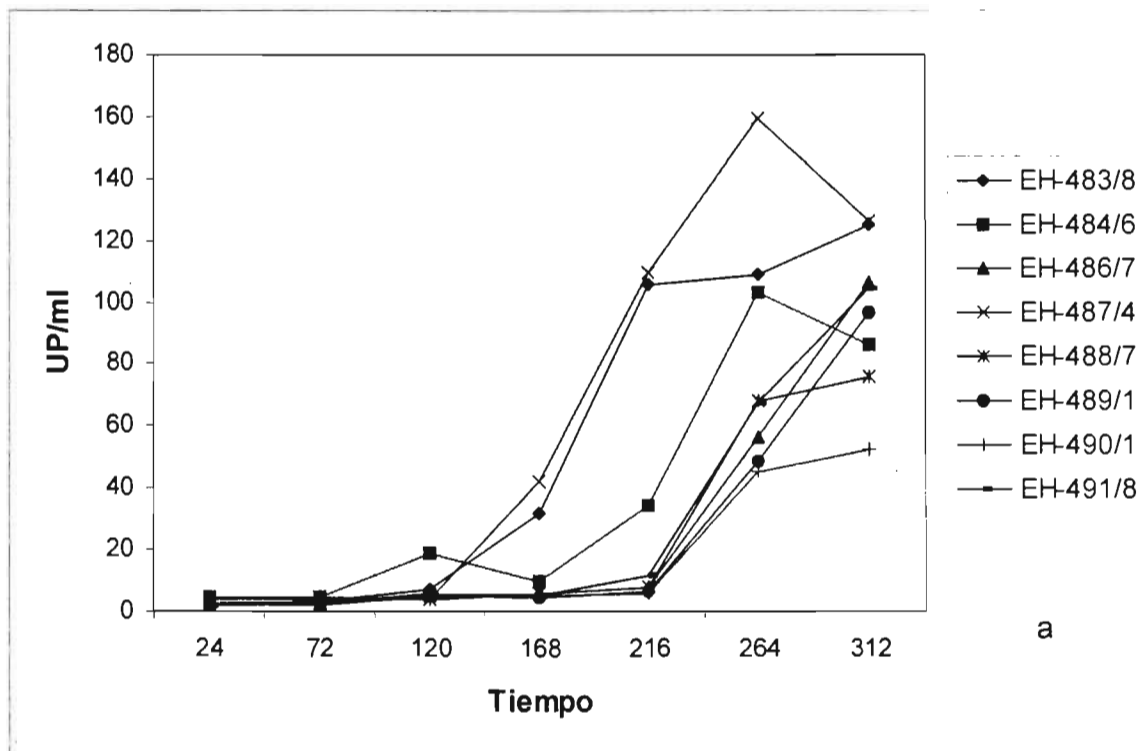


Figura 5. Cinética de producción de proteasas de 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* en medio H con caseína al 1%, y determinada con azocaseína (absorbancia a 440nm).

En la figura 6 se muestra la agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados en cuanto a la producción de proteasas a las 312 h en donde se muestra a los aislamientos de baja (EH-494/4, EH-498/8 y EH-499/9), mediana (EH-484/6, EH-486/7, EH-488/7, EH-489/1, EH-490/1, EH-491/8, EH-493/1, EH-497/7, EH-500/2, EH-502/8 y EH-531/8) y alta (EH-483/8 y EH-487/4) producción enzimática. Los árboles correspondientes a las agrupaciones jerárquicas de las 120, 168, 216 y 264 h se incluyen en el anexo 2, y en todos se muestra la diferencia en la producción de proteasas entre los aislamientos.

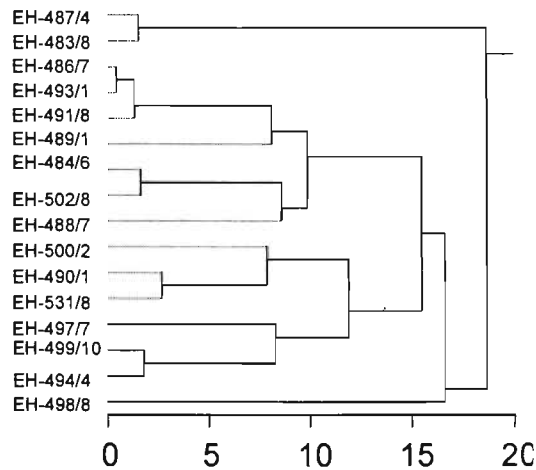


Figura 6. Agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados en cuanto a la producción de proteasas a las 312 h .

5.3. Bioensayos de virulencia en langosta

Al principio del bioensayo las langostas (*S. piceifrons*) mostraron un comportamiento inquieto pero a medida que transcurría el tiempo postinoculatorio éstas se fueron aletargando. Los insectos comenzaron a morir a los 5 días de la inoculación con el hongo, presentaron una coloración roja y disminuyeron su consumo de alimento. Los insectos que fueron muriendo se conservaron en cajas de Petri con papel de filtro para constatar que efectivamente la muerte se debía a la infección del hongo.

Las primeras zonas donde se observó esporulación del hongo fueron las patas y las antenas, posteriormente todo el insecto quedó cubierto por el crecimiento fúngico. En la Figura 7 se muestra una langosta testigo sin hongo (superior) en comparación con el insecto infectado cubierto de hongo (inferior).

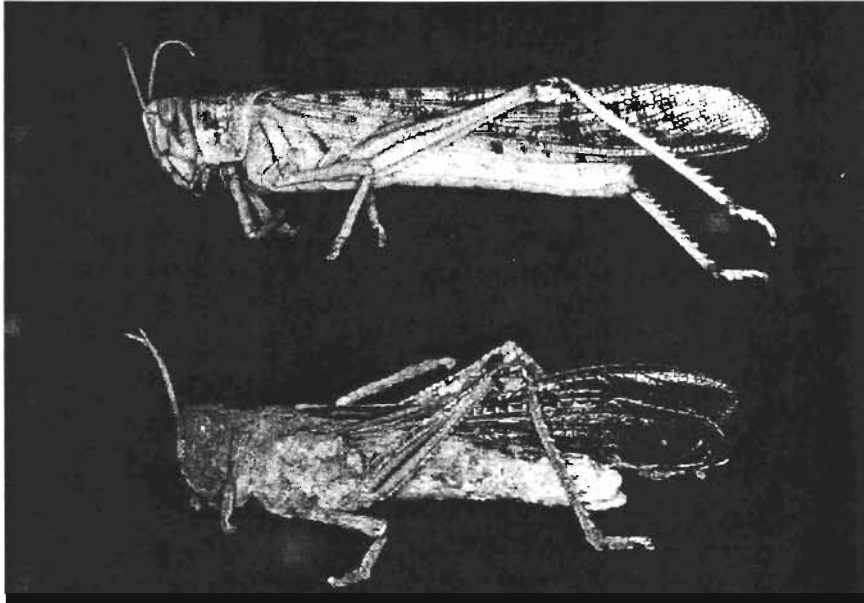
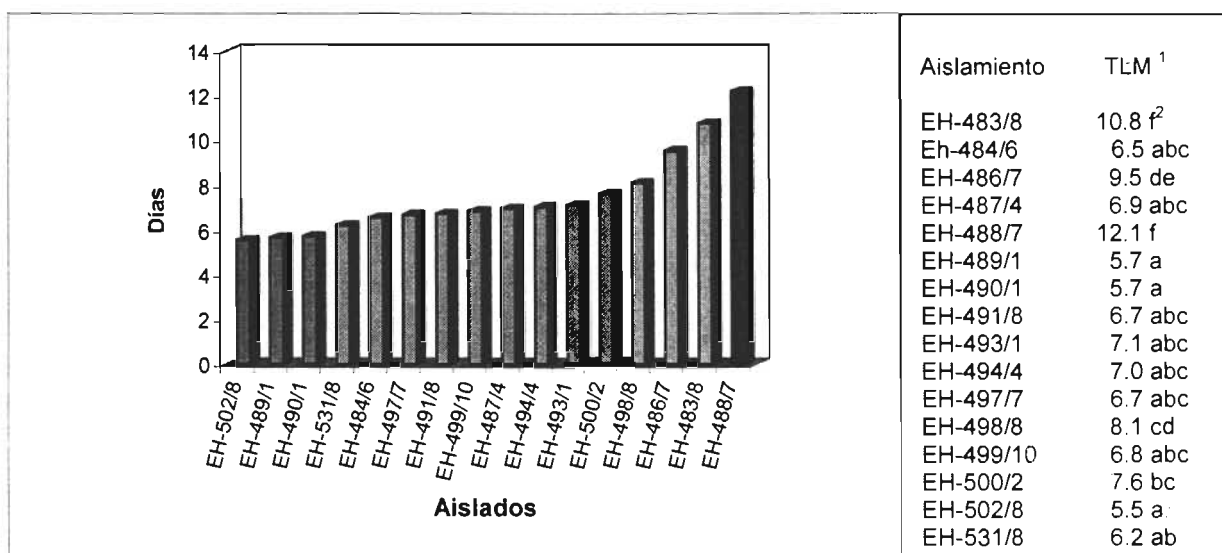


Figura 7. Comparación de un insecto testigo (arriba) con la langosta infectada (abajo) con *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* a los 10 días de la inoculación.

Los aislamientos EH-489/1, EH-490/1 y EH-502/8 presentaron el TLM más bajo de 5.7, 5.7 y 5.5 días respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos ($P>0.05$), siendo, por lo tanto, los más virulentos de todos los estudiados. El aislamiento EH-488/7 mostró un TLM de 12.1 días siendo el menos virulento de todos los aislamientos ensayados (Figura 8). Los aislamientos EH-484/6, EH-487/4, EH-489/1, EH-490/1, EH-491/8, EH-493/1, EH-494/4, EH-497/7, EH-499/10, EH-500/2 y EH-531/8 mostraron un TLM entre 6.2 y 7.6 días. En la figura 9 se muestra la agrupación jerárquica del TLM donde se distinguen seis grupos de virulencia.



¹ Tiempo Letal Medio.

² Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre ellas (prueba de comparación de medias de Tukey)

Figura 8. Tiempo letal medio (TLM) en días de 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*.

5.4. Relación entre concentración de enzimas y virulencia

No se observó una relación directa entre las actividades enzimáticas de quitinasas y proteasas y la virulencia del hongo. No hubo coincidencia entre las máximas producciones de proteasas y quitinasas y los aislamientos de mayor virulencia. Los tres aislamientos de mayor virulencia EH-489/1, EH-490/1 y EH-502/8 mostraron una baja y mediana producción de quitinasas de 24.5, 33.9 y 7.4 UQ/ml respectivamente y presentaron valores intermedios de producción de proteasas de 96.2, 52.6 y 84.6 UP/ml, respectivamente. Los aislamientos de menor virulencia EH-483/8, EH-486/7 y EH-488/7 mostraron valores altos e intermedios de quitinasas de 43.1, 30.9 y 28.3 UQ/ml respectivamente y presentaron valores altos e intermedios de proteasas de 108.9, 70.0 y 67.9 respectivamente (Tabla 7).

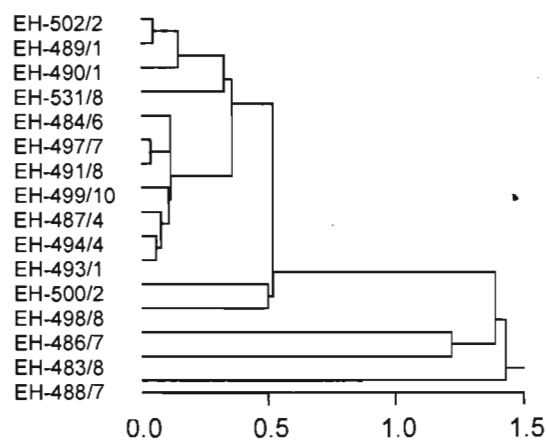


Figura 9. Agrupación jerárquica de los aislamientos estudiados de acuerdo al tiempo letal medio (TLM).

Tabla 7. Virulencia (TLM) y concentración de quitinasas y proteasas de los aislamientos estudiados.

ASLAMIENTOS	QUITINASAS ¹ UQ/ml	PROTEASAS ² UP/ml	TIEMPO LETAL MEDIO (días)
EH-483/8	43.1 a ³	124.7 g	10.8 ef
EH-484/6	21.5 f	86.3 ef	6.5 abc
EH-486/7	30.9 bc	106.1 fg	9.5 de
EH-487/4	28.2 cde	126.3 g	6.9 abc
EH-488/7	28.3 cde	76.0 def	12.1 f
EH-489/1	24.5 ef	96.2 f	5.7 a
EH-490/1	33.9 b	52.6 bcd	5.7 a
EH-491/8	27.3 cde	104.3 fg	6.7 abc
EH-493/1	29.1 bcde	105.6 fg	7.1 abc
EH-494/4	29.9 bcd	28.0 a	7.0 abc
EH-497/7	5.9 g	38.1 abc	6.7 abc
EH-498/8	26.0 cdef	11.4 a	8.1 cd
EH-499/10	43.7 a	29.8 a	6.8 abc
EH-500/2	5.5 g	60.5 cde	7.6 bc
EH-502/8	7.4 g	84.6 ef	5.5a
EH-531/8	25.7 def	50.0 bcd	6.2 ab

¹ Producción de quitinasas a las 312 h del experimento.

² Producción de proteasas a las 312 h del experimento.

³ Las letras iguales en la columna indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellas (prueba de comparación múltiple de medias de Tukey).

6. DISCUSIÓN

Metarhizium anisopliae utiliza una combinación de enzimas y fuerzas mecánicas para penetrar la cutícula del hospedante y acceder a la hemolinfa rica en nutrientes (Charnley y St. Leger, 1991). Los principales componentes de la cutícula de los insectos son las proteínas, quitina y lípidos (Andersen, 1979), por lo que los hongos entomopatógenos deben producir al menos proteasas, quitinasas y lipasas para poder penetrar al hospedante (Bidochka y Khachatourians, 1994, Samuels y Patterson, 1995). De ahí que diversas investigaciones hayan mostrado que las actividades altas de proteasa y quitinasa son características de las cepas infectivas y virulentas (Bertholdo-Vargas *et al.*, 2003; Barranco-Florido *et al.*, 2002; Bidochka *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 1994).

Tomando en consideración la importancia de las actividades enzimáticas en la virulencia, en este trabajo se llevó a cabo una comparación de las actividades de quitinasas y proteasas de *M. anisopliae* var. *acridum* aislados de la langosta *S. piceifrons* en México con el objetivo de corroborar si los aislamientos más virulentos son los que poseen las actividades más altas de estas enzimas. Esta comparación se hizo para tener mayores parámetros en la selección de un candidato idóneo de este hongo como agente microbiano para el control biológico de la langosta, plaga relevante en el país por el daño a cultivos y pastos de diversas regiones (Ramírez *et al.*, 2001).

En el presente trabajo se observó una gran variabilidad entre aislamientos en cuanto a la producción enzimática tanto de quitinasas como de proteasas lo que confirma la diferencia fenotípica entre aislamientos de una misma especie fúngica, como se reporta por diversos autores (Rosato *et al.*, 1981; Bidochka y Melzer, 2000; St. Leger *et al.*, 1994).

Esta variabilidad que presentan los aislamientos fúngicos hace necesario el estudio entre varios de ellos para seleccionar aquellos que posean las mejores características para ser utilizados como agentes microbianos.

Las enzimas consideradas como determinantes principales de virulencia en hongos entomopatógenos son las proteasas, ya que se han detectado durante el curso de la infección en el insecto (Kucera, 1981; St. Leger, 1996a), inician la degradación cuticular y permiten que el hongo penetre al hospedante. En este proceso la especie

más estudiada ha sido *M. anisopliae*, del cual se ha caracterizado su sistema proteolítico. En este estudio los aislamientos más virulentos de *M. anisopliae* presentaron una concentración media de proteasas.

En nuestro estudio se determinaron las proteasas totales por el método de la azocaseína (Sarath *et al.*, 1989), sustrato cromogénico que fue usado por Tiago *et al.* (2004) para detectar proteasas en aislamientos de Brasil de *M. anisopliae* var. *acidum* y *Paecilomyces fumosoroseus*. En el último hongo, este método fue el único que evitó que las toxinas fúngicas que absorben a 280 nm interfirieran en la detección de las proteasas totales extracelulares (Castellanos-Moguel, 2002).

La habilidad de las enzimas de *M. anisopliae* para hidrolizar la cutícula del insecto está dada por la acción combinada de las proteasas de tipo subtilisina (PR1) y una tripsina (Pr2), que actúan dependiendo de las características fisicoquímicas de la cutícula del insecto. Se han clonado a la fecha once genes que codifican para isoformas de Pr1 (Pr1A -Pr1K) (Freimoser *et al.*, 2003). Estas isoformas podrían habilitar a un patógeno para explotar un amplio espectro de sustratos y poder estar involucrados en el cambio de una fase patógena a una saprobia, constituyendo así, un factor de virulencia preformada (Bidochka y Melzer, 2000).

Las enzimas extracelulares aparecen secuencialmente en cultivos de *Metarhizium* y *Beauveria* cuando crecen en cultivo sumergido con inductores específicos (Deshpande 1999). Las enzimas proteolíticas como las esterasas, endopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas son producidas dentro de las primeras 24 h del crecimiento fúngico; las endoquitinasas, las cuales atacan polímeros de quitina al azar, es producida en cantidades significativas después de 4 días (96 h) (Deshpande 1999). Este orden de producción de enzimas degradadoras extracelulares es paralela a la secuencia de constituyentes de la cutícula del insecto (Charnley 1989). En nuestro estudio comenzó a observarse un aumento de actividad quitinolítica hasta las 120 h, lo que coincide con lo reportado, en cuanto que las proteasas actúan en primer lugar y luego las quitinasas.

Por otro lado, St. Leger *et al.* (1996) mencionan que la quitinasa es producida a niveles muy bajos por las estructuras de infección (conidios) en la cutícula y durante la penetración inicial del hongo y los niveles de quitina se elevan cuando el sustrato deviene accesible, al acumularse en las zonas de degradación proteolítica. Esto sugiere

que la presencia de la quitinasa es dependiente de la accesibilidad al sustrato (St. Leger, 1987, Charnley y St. Leger, 1991, Andersen, 1979).

En este estudio el inductor utilizado para la determinación de la actividad de quitinasas fue quitina extraída de cangrejo, utilizada también por Kang *et al.* (1999) para determinar quitinasa en *M. anisopliae*. Ellos obtuvieron una quitinasa de 60 kDa con alta actividad quitinolítica contra la quitina coloidal de cangrejo. En nuestro estudio también se encontró quitinasa con el mismo inductor de quitina coloidal en medio mínimo de sales.

Se han caracterizado al menos seis quitinasas diferentes de *M. anisopliae*, y se han clonado cuatro genes: *chit1*, *chit2*, *chit3* y *chit11* (Reis-Bogo *et al.*, 1998). El resultado de estas investigaciones muestran la posibilidad de que estos genes expresen quitinasas que no solo actúan en el proceso de penetración sino también tengan un papel en los procesos de nutrición y crecimiento celular del hongo (Baratto *et al.*, 2003). En nuestro estudio, la cantidad total producida de quitinasas es baja ya que el método utilizado detecta sólo la cantidad de quitinasa liberada en el medio de cultivo utilizado.

Otra parte fundamental en la selección adecuada de candidatos como agentes microbianos son los bioensayos en el insecto blanco. Por ésto, se llevaron a cabo bioensayos del hongo *M. anisopliae* var. *acridum* en la langosta *S. piceifrons*. Los TLM más bajos (mayor virulencia) obtenidos en este trabajo fueron de 5.5 a 5.7 días de los aislamientos EH-502/8, EH-489/1 y EH-490/1, respectivamente, lo que coincide con las observaciones de Bateman (1993) quien señala que *M. anisopliae* var. *acridum* mata al insecto en cuatro o cinco días, después de la colonización de la hemolinfa. Hernández-Velázquez *et al.* (2000) usaron el aislamiento MaPL40 (en este estudio EH-502/8) y obtuvieron resultados similares en el TLM (de 5 días). En un estudio realizado por Magalhães *et al.* (2000), probaron la virulencia de *M. anisopliae* var. *acridum* y *B. bassiana* en adultos de chapulín *Rhammatocerus schistocercoides* con una concentración de 5000 conidios/insecto y obtuvieron una mortalidad acumulativa de 50 % entre 5 y 6 días. En otro estudio donde prueban diferentes medios de cultivo para *M. flavoviride* (= *M. anisopliae* var. *acridum*) aislamiento de ortóptero y ensayado en *Schistocerca gregaria* en una concentración de 10^7 propagulos/ml se encontró una mortalidad acumulativa del 50% entre 5 y 6 días (Fargues *et al.*, 2001). Ambos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio.

La variación natural entre aislamientos podría ser usada para desarrollar micoinsecticidas más efectivos dentro del Manejo Integrado de Plagas. Aunque los resultados de enzimas obtenidos en este trabajo no correlacionaron directamente con la virulencia, es indudable que el estudio de cada una de éstas características entre un número adecuado de hongos, nos permitirá seleccionar con una mayor objetividad la cepa más adecuada como un agente microbiano para el control biológico de la langosta.

7. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo sitúan a los aislamientos EH-484/6 (quitinasas medias, 21.5 UQ/ml y proteasas alta, 102.9 UP/ml), EH-487/4 (quitinasas media, 28.2 UQ/ml y proteasas alta, 159.2 UP/ml), EH-493/1 (quitinasas media, 29.1 UQ/ml y proteasas alta, 119.9 UP/ml), EH-502/8 (quitinasas baja, 7.4 UQ/ml y proteasas alta, 103.6 UP/ml) y EH-531/8 (quitinasas media, 25.7 UQ/ml y proteasas baja, 30.8 UP/ml) entre los más virulentos de todos aquellos estudiados, y con virulencia similar a la de aislamientos de otras partes del mundo.

7. BIBLIOGRAFIA

- Andersen SO. 1979. Biochemistry of insect cuticle. **Ann Rev Entomol** **24**: 29-61.
- Baratto CM, Da Silva MV, Santi L, Passaglia L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A. 2003. Expression and characterization of the 42kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. **Can J Microbiol** **49**: 723-726.
- Barranco-Flrido JE, Alatorre-Rosas R, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Saucedo-Castañeda G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. **Enzym Microb Technol** **30**: 910-915.
- Bateman RP, Carey M, Moore D, Prior C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Ann App Biol** **122**:145-152.
- Bateman RP. 1992. Controlled droplet application of mycopesticides to locusts, pp. 249-254. En: Lomer C J y Prior C (eds.), **Biological control of locust and grasshoppers**. Cab International Wallingford, England.
- Bateman RP, Carey M, Batt D, Prior C, Abraham Y, Moore D, Jenkins N, Fenlon J. 1996. Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). **Bio Sci Techn** **6**:549-560.
- Beker GL, Capinera JL. 1997. Nematodes and nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. **Mem Entomol Soc Can** **171**:157-211.
- Bertholdo-Vargas LRM, Rossato RT, Riberio da Silva, Montero de Barros N. 2003. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. **Braz Arch Biol Technol** **46**(1):13-18.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. **J Inv Path** **64**:26-32.
- Bidochka MJ, Melzer MJ. 2000. Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B y Pr1C) from *Metarhizium* strains. **Can J Microbiol** **46**:1138-1144.
- Bidochka MJ, St. Leger RJ, Stuart A, Gowanloch K. 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. **Microbiology** **145**:955-963.
- Butt TM, Jackson CW, Magan N. 2001. **Fungi as biocontrol agents**. CABI publishing, Wallingford, UK.

Cano C, García K, Hernández VM, Berlanga A, Toriello C. 2002. Diferencia de cultivos monospóricos de aislamientos de México de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons*. **Estudios sobre los hongos latinoamericanos, Nonacatepec. IV Congreso Latinoamericano de Micología, Xalapa, Veracruz, Mayo 13-17, 2002.** p. 401.

Castellanos Moguel MJ. 2002. Relación entre los niveles de proteasa y quitinasa en aislamientos de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith y su patogenicidad hacia la mosquita blanca. Tesis de Maestría en CQB. ENCB-IPN.

Charnley AK, St Leger RJ. 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.

Charnley AK. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. En: Whipps JM, Lumsden (Eds.). **The Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth.** Cambridge University London, pp. 85-125.

Chávez-Camarillo G, Cruz-Camarillo R. 1984. El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. **Rev Lat Microbiol 26:**203-215.

Cherry AJ, Jenkins NE, Hewviefó G, Bateman R, Lomer CJ. 1999. Operational and economic analysis of a West African Pilot-Scale Production Plant for aerial conidia of *Metarhizium* spp. for use as mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. **Bio Sci Techn 9:**35 –51.

Clarkson JM, Charnley AK. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiol 4(5):** 197-202.

Deshpande MV. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potencial and challenges. **Crit Rev Microbiol 25(3):**229-243.

Driver F, Milner RJ, Trueman JW. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol Res 104(1):** 1-17.

Fargues J, Smits N, Vidal C, Vey A, Vega F, Mercadier G, Quimby P. 2001. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production and pathogenic activity of the hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. **Mycopathologia 154:** 127-138.

Feng MG, Paprawski TJ, Khachatourians GG. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Bio Sci Techn 4:**3-34.

- Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G, St Leger RJ. 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.
- Gillespie J, Bateman PR, Charnley K. 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. For the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **J Inv Pathol** **71**:128-137.
- Glare TR, Milner RJ. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. En Arora DK, Ajello L, Mukerji KG, Eds. **Handbook of Applied Mycology, Vol. 2 Humans, Animals and Insects**. Ed. Marcel Dekker. New York, pp. 547-612.
- Goettel MS, St Leger RJ, Rizzo NW, Staples RC, Roberts DW. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. **J Gen Microbiol** **135**:2233-2239.
- Goettel MS, Inglis SD. 1997. Fungi: Hyphomycetes. En: **Manual of techniques in insect pathology**. Lacey LA(Ed.). Academic Press, London. pp. 213-249.
- Goettel MS, Jaronski ST. 1997. Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. **Mem Entomol Soc Can** **171**:83-99.
- Goettel MS, Johnson DL. 1992. Environmental impact and safety of the fungal biocontrol Agents. En: Lomer CJ y Prior C (Eds.). **Biological control of locusts and grasshoppers**. CAB International. Redwood Press Ltd, Melkshan, pp. 356-351.
- Gómez-Ramírez M. 2000. Selección y caracterización de una cepa quitinolítica de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de maestría en CQB. ENCB-IPN.
- Greathead DJ. 1992. Natural enemies of tropical locusts and grasshoppers: their impact and potential as biological control agents. En: Lomer CJ y Prior C (Eds.). **Biological control of locusts and grasshoppers**. Cab International, Redwood Press Ltd, Melkshan, pp. 105-121.
- Greathead D, Prior C. 1989. Biological control of locust : the potential for the exploitation of pathogens. **FAO Plant Prot Bull** **37**: 37-48.
- Gupta S, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. **J Inv Pathol** **63**: 13-17.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. Ainsworth & Bisby's **Dictionary of the fungi**. International Mycological Institute. Cab International, Cambridge.

Henry JE, Oma EA. 1981. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. En: Burges HD (Ed.). **Microbial control of pest and plant disease 1970-1980**. Academic Press, New York, pp. 573-584.

Hernández-Velázquez VM. 1995. Epizootiología de hongos entomopatógenos. **Memoria del II Taller de producción masiva de hongos entomopatógenos**, CNRCB-SAGAR, DGSV, DCNRF, Tecomán Colima, pp 8-10.

Hernández-Velázquez, VM, Berlanga-Padilla AM, Barrientos-Lozano L. 2000. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* to the control the Central American locusts (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). **J Orth Res** 9: 223-227.

Hunter DM, Milner RJ, Scalan JC. 2000. Use of the fungus *Metarhizium anisopliae* to control locusts in Australia. En: **XXI International Congress of Entomology**. Foz de Iguazu, Brazil, p. 257.

Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H. 2001. Use of hyphomycetes fungi for managing insects pests. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N (Eds.) *Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential*. CABI publishing, Wallingford, pp 23-55.

Jenkins NE, Bateman R, Thomas MB. 1998. The LUBILOSA Programme development of a mycoinsecticide for locusts and grasshopper control, p. 8. En: Anónimo (Ed.). **Memoria del XXI Congreso Nacional de Control Biológico**. Sociedad mexicana de control biológico. Río Bravo, Tam. México.

Jenkins NE, Goettel MS. 1997. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. En: Anónimo (Ed.) **Mem Entomol Soc Can** 171:37-48.

Jenkins NE, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. 1998. Development of a mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol New Inf** 19(1):21N-31N.

Jenkins NE, Prior C. 1993. Growth and formulation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. **Mycol Res** 97(12):1489-1494.

Joshi L, St Leger RJ, Roberts DW. 1997. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using differential display RT-PCR. **Gene** 197:1-8.

Kang S, Park S, Gyu-Lee D. 1998. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol Lett** 165: 267-271.

Kang S, Park S, Gyu-Lee D. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **J Inv Path** 73: 276-281.

Khachatourians GC. 1992. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En: Arora DK, Ajello KG, Mukerji (Eds.) **Handbook of Applied Mycology, Vol 2. Humans, Animals and Insects**. Ed. Marcel Dekker, New York, pp. 613-663.

Kucera M. 1981. The production of toxic protease by the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. **J Inv Path** **38**: 33-38.

Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M. 2001. Biological Control of Locust and Grasshoppers. **Annu Rev Entomol** **46**:667-702.

LUBILOSA. 1998. The News Letter of Phase 3 of the LUBILOSA Programme. Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux. **The biological control of locusts and grasshoppers**, No. 6.

Magalhães BP, Goettel MS, Frazao HS. 2000. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Braz J Microbiol** **31**: 162-164.

Milner RJ, Rowland M. 1998. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* for control of black field crickets, *Teleogryllus commodus* (Walker) (Orthoptera: Gryllidae) in pastures. **J Orthop Res** **7**:125-128.

Milner RJ, Staples JA. 1998. The effect of formulation on field efficacy of *Metarhizium flavoviride* for control of wingless grasshopper, *Phaulacridum vittatum* (Sjostedt). **J Orthop Res** **7**:83-91.

Paterson IC, Charnley AK, Copper RM, Clarkson JM. 1994a. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology** **140**:3153-3159.

Paterson IC, Charnley AK, Copper RM, Clarkson JM. 1994b. Specific induction of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology** **140**:185-189.

Prior C, Greathead DJ. 1989. Biological control of locusts: the potential for the exploitation of pathogens. **FAO Plant Prot Bull** **37**(1): 37-48.

Prior C, Jollands P, Le Patourel G. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera:Curculionidae). **J Inv Pathol** **52**:66-72.

Raina SK, Rai MM, Khurad AM. 1987. Grasshopper and locusts control using microsporidian insecticides. En: Maramorosch K (Ed.). **Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture**. Academic Press, New York, pp. 345-365.

Ramírez Sagahon JC, Sánchez Anguiano HM, Rodríguez Quiroz M. 2001. Campaña contra la langosta en México. **Memoria Taller Internacional Transferencia en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker**. Mérida, Yucatán, México, pp. 9-15.

Reis-Bogo M, Agustín-Rota C, Pinto Jr H, Ocampos M, Correa CT, Henning Vainstein M, Schrank A. 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* Gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Curr Microbiol** **37**: 221-225.

Rombach MC, Humbert RA, Evans HC. 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers. **Trans Brit Mycol Soc** **88**:451-459.

Rombach MC, Humbert RA, Roberts DW. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. *nov.*, a pathogen of plant leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Island. **Mycotaxon** **27**:87-92.

Rosato YB, Messias CL, Azevedo JL. 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. **J Inv Pathol** **38**:1-3.

SAGAR. 2000. Manejo integrado de langosta y chapulín. SAGAR, México D.F.

Samson RA, Evans HC, Latgé JP. 1988. **Atlas of entomopathogenic fungi**. Springer-Verlag, Utrecht.

Samuels RI, Patterson IC. 1995. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. **Comp Biochem Physiol part B** **110**(4): 661-669.

Sarath G, De la Motte RS, Wagner FW. 1989. Protease assay methods. En: Benyon RJ y JS (Eds.). **Proteolytic enzymes, a practical approach**. IRL Press, Oxford, pp. 25-55.

Smith JE, Johnson DL, Lomer C. 1999. Pathological and physiological responses of ring-necked pheasant chicks following dietary exposure to the fungus *Metarhizium flavoviride*, a biocontrol agent for locusts in Africa. **J Wildl Dis** **35**:194-203.

Sosa-Gómez D, Alves SB. 1983. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. **CIRPON. Revista de investigación** **1**:83-102.

St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. 1986a. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **J Inv Path** **47**:295-302.

St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. 1986b. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degrading *in vitro* by enzymes from entomopathogens. **J Inv Path** **47**:167-177.

St Leger RJ. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Can J Bot** **73** (suppl.1):S1119-S1125.

St Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW. 1994. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Arch Biochem Biophys** **313**:1-7.

St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **J Inv Path** **253**:221-232.

St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. 1996a. Construction of an improved mycoinsecticide over-expressing a toxic protease. **Proc Natl Acad Sci USA** **93**: 6349-6354.

St Leger RJ, Staples RC, Roberts DW. 1991. Changes in translatable mRNA species associated with nutrient deprivation and protease synthesis in *Metarhizium anisopliae*. **J Gen Microbiol** **137**:807-815.

St Leger RJ, Nelson JO, Screen SE. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiology** **145**:2691-2699.

Streett DA, Woods SA, Erlandson MA. 1997. Entomopoxviruses of grasshoppers and locusts; biology and biological potential. **Mem Entomol Soc Can** **171**: 115-130.

Tiago P, Fungaro MH, de Faria M, Furlaneto M. 2004. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on proteases activities, conidia production, and virulence. **Can J Microbiol** **50**:335-339.

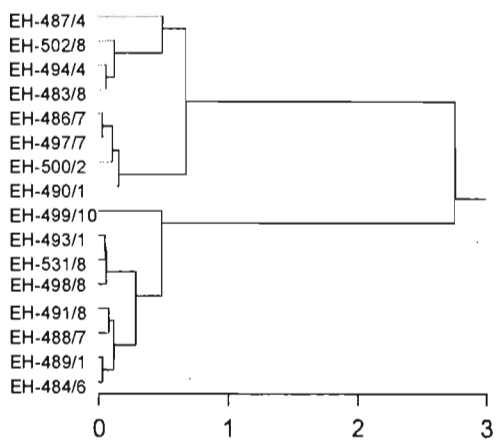
Tulloch M. 1976. The genus *Metarhizium*. **Trans Brit Mycol Soc** **66**:407-411.

Whipps JM, Lumsden RD. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. En: **Fungi as Biocontrol Agents**. Butt TM, Jackson CW, Magan N (Eds.). CABI publishing, Wallingford, pp. 9-22.

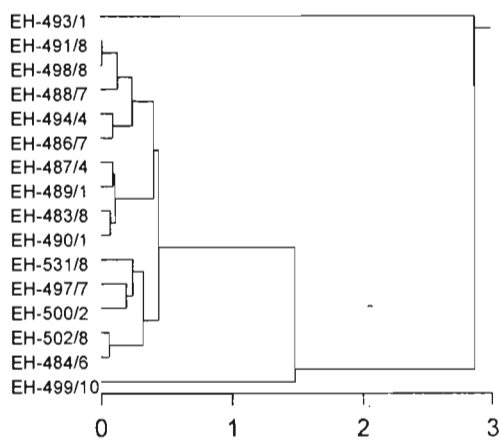
9. Anexos

Anexo 1. Árboles correspondientes a las agrupaciones jerárquicas de las 24, 72, 120, 168, 216 y 264 h de producción de quitinasa

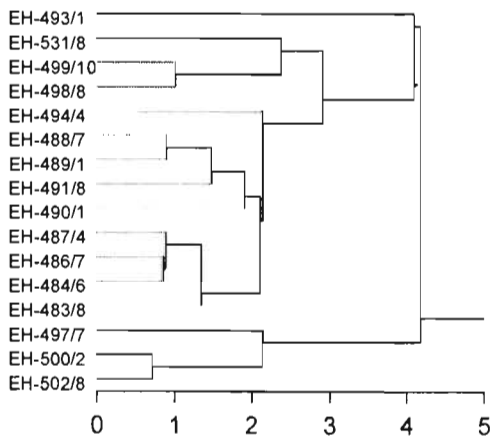
24 h



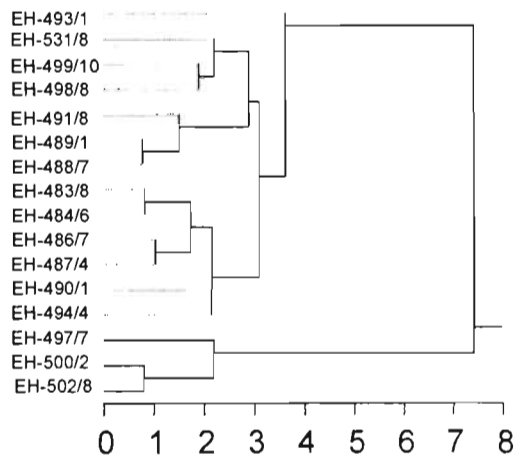
72 h



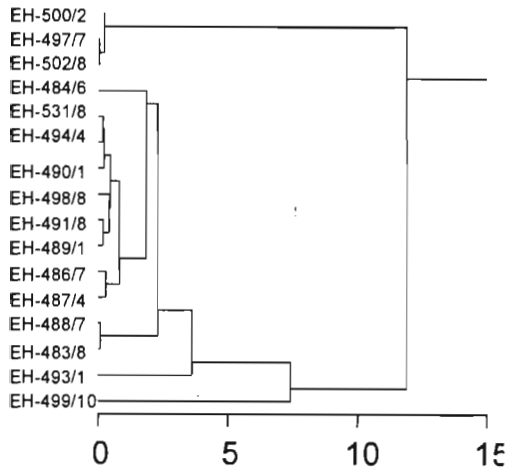
120 h



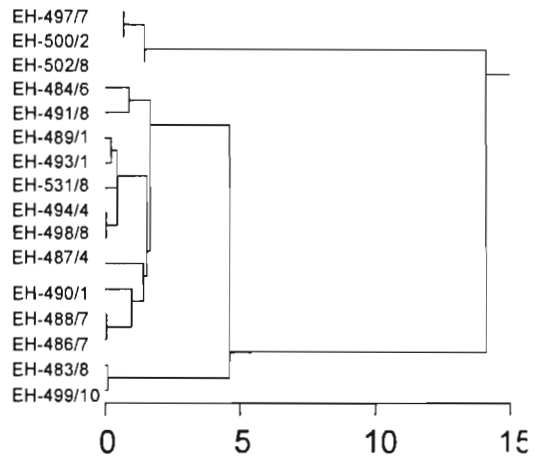
168 h



216 h



264 h



Anexo 2. Matrices de distancias euclidianas, método de unión simple (nearest neighbor) definida por la concentración de quitinasas a las 24, 72, 120, 168, 216, 264 y 312 hrs.

Quitinasas 24 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-497/7	EH-486/7	0.030	2
EH-489/1	EH-484/6	0.030	2
EH-531/8	EH-493/1	0.050	2
EH-494/4	EH-483/8	0.060	2
EH-498/8	EH-531/8	0.060	3
EH-491/8	EH-488/7	0.080	2
EH-497/7	EH-500/2	0.110	3
EH-489/1	EH-491/8	0.120	4
EH-494/4	EH-502/8	0.130	3
EH-490/1	EH-497/7	0.160	4
EH-489/1	EH-498/8	0.290	7
EH-489/1	EH-499/10	0.490	8
EH-487/4	EH-494/4	0.500	4
EH-487/4	EH-490/1	0.680	8
EH-487/4	EH-489/1	2.760	16

Quitinasas 72 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-498/8	EH-491/8	0.010	2
EH-502/8	EH-484/6	0.060	2
EH-490/1	EH-483/8	0.070	2
EH-494/4	EH-486/7	0.090	2
EH-489/1	EH-487/4	0.090	2
EH-489/1	EH-490/1	0.110	4
EH-488/7	EH-498/8	0.130	3
EH-500/2	EH-497/7	0.190	2
EH-494/4	EH-488/7	0.240	5
EH-531/8	EH-500/2	0.240	3
EH-502/8	EH-531/8	0.320	5
EH-494/4	EH-489/1	0.400	9
EH-502/8	EH-494/4	0.440	14
EH-502/8	EH-499/10	1.480	15
EH-493/1	EH-502/8	2.870	16

Quitinasas 120 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-491/8	EH-483/8	0.080	2
EH-487/4	EH-484/6	0.080	2
EH-502/8	EH-489/1	0.100	2
EH-490/1	EH-486/7	0.110	2
EH-502/8	EH-500/2	0.140	2
EH-497/7	EH-502/8	0.210	3
EH-490/1	EH-494/4	0.350	3
EH-498/8	EH-488/7	0.390	2
EH-498/8	EH-531/8	0.390	4
EH-491/8	EH-498/8	0.470	6
EH-491/8	EH-499/10	0.630	7
EH-490/1	EH-487/4	0.680	5
EH-491/8	EH-490/1	1.540	12
EH-491/8	EH-502/8	4.200	13
EH-497/7	EH-491/8	5.830	16

Quitinasas 168 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-494/4	EH-487/4	0.070	2
EH-531/8	EH-489/1	0.080	2
EH-531/8	EH-497/7	0.270	2
EH-491/8	EH-488/7	0.290	2
EH-490/1	EH-494/4	0.420	3
EH-531/8	EH-491/8	0.450	4
EH-500/2	EH-502/8	0.520	3
EH-490/1	EH-486/7	0.560	4
EH-484/6	EH-483/8	0.560	2
EH-499/10	EH-531/8	0.810	5
EH-498/8	EH-499/10	0.860	6
EH-498/8	EH-484/6	1.280	8
EH-498/8	EH-490/1	2.230	12
EH-498/8	EH-493/1	4.160	13
EH-498/8	EH-500/2	10.370	16

Quitinasas 216 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-502//8	EH-497/7	0.020	2
EH-488/7	EH-493/8	0.060	2
EH-491/8	EH-498/	0.160	2
EH-531/8	EH-494/4	0.170	2
EH-531/8	EH-490/1	0.210	3
EH-502/8	EH-500/2	0.220	3
EH-487/4	EH-486/7	0.280	2
EH-491/8	EH-498/8	0.420	3
EH-491/8	EH-531/8	0.470	6
EH-491/8	EH-487/4	0.800	8
EH-484/6	EH-491/8	1.840	9
EH-484/6	EH-488/7	2.300	11
EH-484/6	EH-493/1	3.610	12
EH-484/6	EH-499/10	7.430	13
EH-531/8	EH-484/6	11.890	16

Quitinasas 264 h

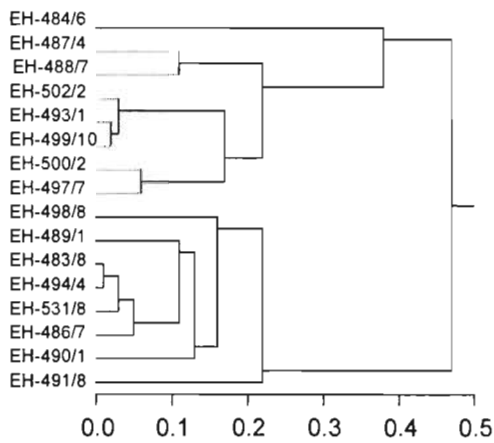
Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-498/8	EH-494/4	0.030	2
EH-488/7	EH-486/7	0.050	2
EH-499/10	EH-483/8	0.090	2
EH-493/1	EH-489/1	0.210	2
EH-531/8	EH-498/8	0.430	3
EH-493/1	EH-531/8	0.440	5
EH-500/2	EH-497/7	0.670	2
EH-491/8	EH-484/6	0.880	2
EH-488/7	EH-490/1	0.980	3
EH-487/4	EH-488/7	1.410	4
EH-500/2	EH-500/2	1.450	3
EH-493/1	EH-487/4	1.540	9
EH-491/8	EH-493/1	1.660	11
EH-491/8	EH-499/10	4.610	13
EH-500/2	EH-491/8	14.110	16

Quitinas 312 h

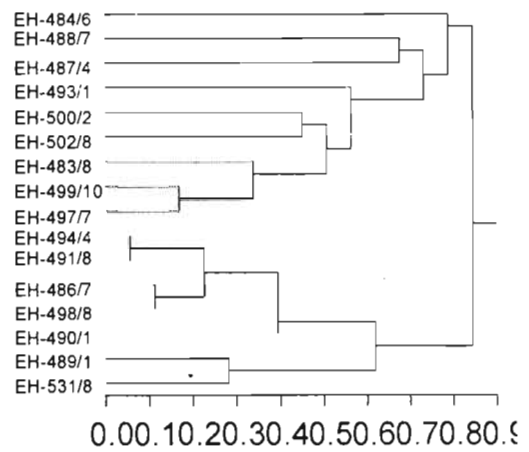
Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-488/7	EH-487/4	0.120	2
EH-531/8	EH-498/8	0.320	2
EH-500/2	EH-497/7	0.430	2
EH-499/10	EH-483/8	0.650	2
EH-494/4	EH-493/1	0.740	2
EH-488/7	EH-494/4	0.830	4
EH-491/8	EH-488/7	0.850	5
EH-491/8	EH-486/7	1.040	6
EH-489/1	EH-531/8	1.140	3
EH-489/1	EH-491/8	1.320	9
EH-502/8	EH-500/2	1.510	3
EH-489/1	EH-490/1	3.000	10
EH-489/1	EH-484/6	3.010	11
EH-489/1	EH-499/10	9.150	13
EH-502/8	EH-489/1	14.110	16

Anexo 3. Árboles correspondientes a las agrupaciones jerárquicas de las 24, 72, 120, 168, 216 y 264 h de producción de proteasa.

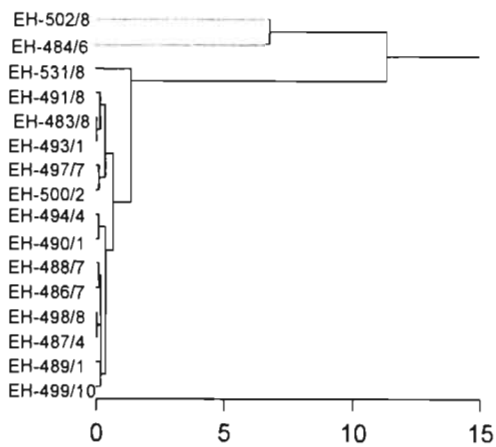
24 h



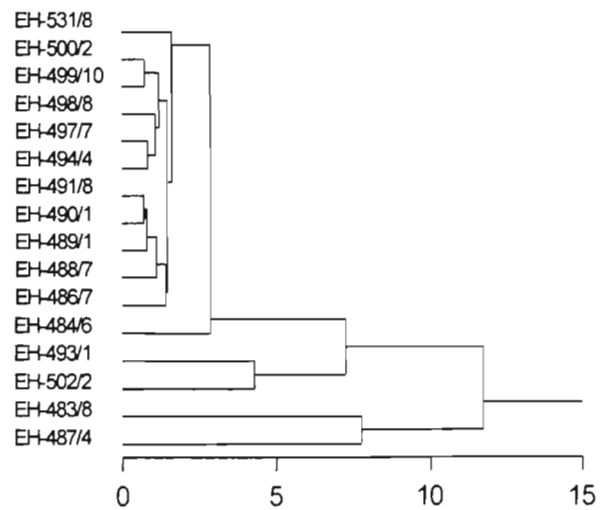
72 h



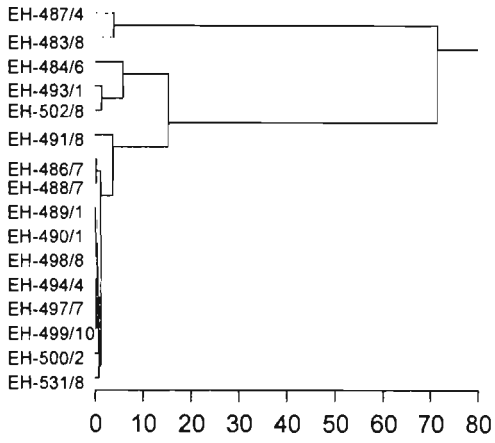
120 h



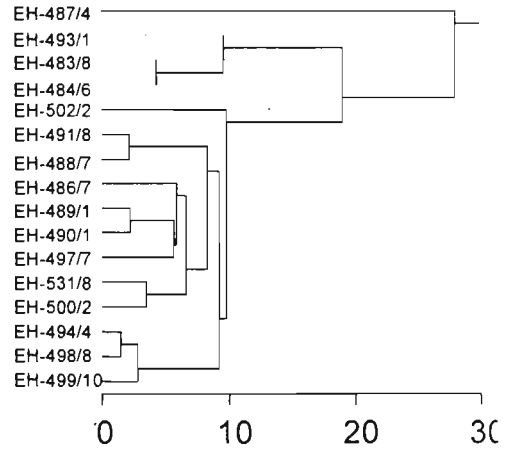
168 h



216 h



264 h



Anexo 4. Matrices de distancias euclidianas, método de unión simple (nearest neighbor) definida por la concentración de proteasas a las 24, 72, 120, 168, 216, 264 y 312 hrs.

Proteasa 24 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-494/4	EH-483/8	0.010	2
EH-499/10	EH-493/1	0.020	2
EH-494/4	EH-531/8	0.030	3
EH-531/8	EH-499/10	0.030	3
EH-486/7	EH-494/4	0.050	4
EH-500/2	EH-497/7	0.060	2
EH-486/7	EH-489/1	0.110	5
EH-488/7	EH-487/4	0.110	2
EH-490/1	EH-486/7	0.130	6
EH-498/8	EH-490/1	0.160	7
EH-500/2	EH-502/8	0.170	5
EH-488/7	EH-500/2	0.220	7
EH-498/8	EH-491/8	0.220	8
EH-488/7	EH-484/6	0.380	8
EH-488/7	EH-498/8	0.470	16

Proteasa 72 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-494/4	EH-491/8	0.000	2
EH-498/8	EH-486/7	0.010	2
EH-499/10	EH-497/7	0.020	2
EH-498/8	EH-494/4	0.040	4
EH-531/8	EH-489/1	0.050	2
EH-483/8	EH-499/10	0.090	3
EH-490/1	EH-498/8	0.090	5
EH-502/8	EH-500/2	0.090	2
EH-502/8	EH-483/8	0.120	5
EH-502/8	EH-493/1	0.120	6
EH-531/8	EH-490/1	0.150	7
EH-488/7	EH-487/4	0.160	2
EH-502/8	EH-488/7	0.240	8
EH-502/8	EH-484/6	0.440	9
EH-502/8	EH-531/8	0.850	16

Proteasa 120 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-493/1	EH-483/8	0.010	2
EH-498/8	EH-487/4	0.030	2
EH-488/7	EH-486/7	0.090	2
EH-494/4	EH-490/1	0.090	2
EH-500/2	EH-497/7	0.110	2
EH-493/1	EH-491/8	0.160	3
EH-498/8	EH-488/7	0.180	4
EH-498/8	EH-489/1	0.180	5
EH-499/10	EH-498/8	0.180	6
EH-493/1	EH-500/2	0.360	5
EH-499/10	EH-494/4	0.370	8
EH-493/1	EH-499/10	0.670	13
EH-531/8	EH-493/1	1.380	14
EH-502/8	EH-484/6	6.800	2
EH-502/8	EH-531/8	11.360	16

Proteasa 168 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-497/7	EH-491/8	0.010	2
EH-490/1	EH-497/7	0.010	3
EH-494/4	EH-489/1	0.080	2
EH-500/2	EH-486/7	0.080	2
EH-494/4	EH-531/8	0.090	3
EH-500/2	EH-488/7	0.190	3
EH-499/10	EH-500/2	0.190	4
EH-490/1	EH-499/10	0.220	7
EH-494/4	EH-498/8	0.450	4
EH-494/4	EH-490/1	0.520	11
EH-502/8	EH-493/1	0.670	2
EH-494/4	EH-484/6	3.750	12
EH-502/8	EH-494/4	6.800	14
EH-487/4	EH-483/8	10.530	2
EH-502/8	EH-487/4	14.530	16

Proteasa 216 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-499/10	EH-487/4	0.010	2
EH-502/8	EH-486/7	0.100	2
EH-494/4	EH-502/8	0.160	3
EH-497/7	EH-499/10	0.170	3
EH-500/2	EH-489/1	0.180	2
EH-497/7	EH-494/4	0.370	6
EH-497/7	EH-484/6	0.680	7
EH-497/7	EH-490/1	0.750	8
EH-497/7	EH-500/2	1.140	10
EH-498/8	EH-483/8	1.380	2
EH-491/8	EH-497/7	3.760	11
EH-531/8	EH-488/7	3.890	2
EH-498/8	EH-493/1	5.810	3
EH-498/8	EH-491/8	15.370	14
EH-531/8	EH-498/8	71.600	16

Proteasa 264 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-491/8	EH-488/7	0.430	2
EH-498/8	EH-494/4	0.670	2
EH-490/1	EH-489/1	3.020	2
EH-498/8	EH-499/10	3.870	3
EH-531/8	EH-500/2	4.500	2
EH-484/6	EH-483/8	6.000	2
EH-490/1	EH-497/7	6.900	3
EH-490/1	EH-486/7	7.750	4
EH-490/1	EH-531/8	7.900	6
EH-493/1	EH-484/6	11.000	3
EH-491/8	EH-490/1	1.120	8
EH-502/8	EH-491/8	11.510	9
EH-502/8	EH-498/8	12.380	12
EH-502/8	EH-493/1	23.510	15
EH-487/4	EH-502/8	39.250	16

Proteasa 312 h

Cluster (grupo)	Cluster (grupo)	Se unen a la distancia	No. de miembros en el nuevo cluster
EH-493/1	EH-486/7	0.450	2
EH-491/8	EH-493/1	1.340	3
EH-487/4	EH-483/8	1.560	2
EH-502/8	EH-484/6	1.660	2
EH-499/10	EH-494/4	1.800	2
EH-531/8	EH-490/1	2.680	2
EH-531/8	EH-500/2	7.870	3
EH-491/8	EH-489/1	8.120	4
EH-497/7	EH-499/10	8.300	3
EH-488/7	EH-502/8	8.600	3
EH-488/7	EH-491/8	9.890	7
EH-531/8	EH-497/7	11.900	6
EH-531/8	EH-488/7	15.480	13
EH-498/8	EH-531/8	16.620	14
EH-498/8	EH-487/4	18.670	16

Anexo 5. Prueba de Tukey y subconjuntos homogéneos correspondientes a las 24, 72, 120, 168, 216 y 312 h de producción de quitinasa

Q 24 h	a	b
EH-484/3	0.00	
EH-489/1	0.03	
EH-488/7	0.14	
EH-491/8	0.23	
EH-498/8	0.52	
EH-531/8	0.57	
EH-493/1	0.63	
EH-499/10	1.11	
EH-490/1		3.87
EH-500/2		4.04
EH-497/7		4.15
EH-486/7		4.18
EH-483/8		4.86
EH-494/4		4.92
EH-502/8		5.05
EH-487/4		5.54

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
 Usando media armónica simple
 Alfa=0.05

Q 72 h	a	b	c	d	e	f	g
EH-499/10	2.03						
EH-484/6		3.52					
EH-502/8		3.58	3.58				
EH-500/2		3.89	3.89	3.89			
EH-497/7		4.08	4.08	4.08			
EH-531/8		4.32	4.32	4.32	4.32		
EH-490/1			4.76	4.76	4.76	4.76	
EH-483/8				4.83	4.83	4.83	
EH-489/1				4.94	4.94	4.94	
EH-487/4				5.03	5.03	5.03	
EH-486/7					5.44	5.44	
EH-494/4						5.52	
EH-488/7						5.77	
EH-498/8						5.89	
EH-491/8						5.90	
EH-493/1							8.78

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
 Usando media armónica simple
 Alfa=0.05

Q 120 h	a	b	c	d	e	f
EH-500/2	1.99					
EH-502/8	2.13					
EH-497/7	2.34					
EH-494/4		8.17				
EH-490/1		8.52				
EH-486/7		8.62				
EH-484/6		9.31	9.31			
EH-487/4		9.39	9.39	9.39		
EH-483/8			10.93	10.93	10.93	
EH-491/8			11.00	11.00	11.00	
EH-531/8			11.48	11.48	11.48	
EH-489/1				11.58	11.58	
EH-498/8					11.97	
EH-488/7					12.36	
EH-499/10					12.99	
EH-493/1						17.19

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

Q 168 h	a	b	c	d	e	f	g	h
EH-500/2	1.69							
EH-502/8	2.21							
EH-497/7	2.49							
EH-487/4		12.86						
EH-494/4		12.93						
EH-490/1		13.34	13.34					
EH-486/7		13.90	13.90	13.90				
EH-484/6			16.44	16.44	16.44			
EH-483/8				16.70	16.70	16.70		
EH-499/10					17.98	17.98	17.98	
EH-531/8					18.79	18.79	18.79	
EH-489/1					18.87	18.87	18.87	
EH-488/7						19.31	19.31	
EH-491/8						19.61	19.61	
EH-498/8							20.47	
EH-493-1								24.62

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

Q 216 h	a	b	c	d	e
EH-500/2	2.09				
EH-497/7	2.31				
EH-502/8	2.34				
EH-484/6		14.22			
EH-531/8		16.07	16.07		
EH-494/4		16.24	16.24		
EH-490/1		16.44	16.44		
EH-498/8		16.92	16.92		
EH-491/8		17.34	17.34		
EH-498/1		17.50	17.50		
EH-486/7		18.30	18.30		
EH-487/4		18.57	18.57		
EH-488/7			20.88	20.88	
EH-483/8			20.93	20.93	
EH-493/1				24.54	
EH-499/10					31.98

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

Q 264 h	a	b	c	d
EH-497/7	4.08			
EH-500/2	4.75			
EH-502/8	6.20			
EH-484/6		20.30		
EH-491/8		21.19		
EH-489/1		22.84	22.84	
EH-493/1		23.05	23.05	
EH-531/8		23.49	23.49	
EH-494/4		23.92	23.92	
EH-498/8		23.95	23.95	
EH-487/4		25.49	25.49	
EH-490/1			26.90	
EH-488/7			27.89	27.89
EH-486/7			27.94	27.94
EH-483/8				32.54
EH-499/10				32.63

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

Q 312 h	a	b	c	d	e	f
EH-500/2	5.53					
EH-497/7	5.96					
EH-502/8	7.47					
EH-484/6		21.57				
EH-489/1		24.58				
EH-531/8		25.73	25.73	25.73		
EH-498/8		26.05	26.05	26.05		
EH-491/8			27.37	27.37		
EH-487/4			28.21	28.21	28.21	
EH-488/7			28.33	28.33	28.33	
EH-493/1			29.16	29.16	29.16	
EH-494/4			29.91	29.91	29.91	
EH-486/7				30.95	30.95	
EH-490/1					33.95	
EH-483/8						43.10
EH-499/10						43.75

Con base en la suma de cuadrados de tipo III

Usando media armónica simple

Alfa=0.05

Anexo 6. Prueba de Tukey y subconjuntos homogéneos correspondientes a las 24, 72, 120, 168, 216 y 312 h de producción de proteasas

P 24 h	a	b	c	d	e	f
EH-491/8	2.10					
EH-490/1	2.32					
EH-486/7	2.45					
EH-531/8	2.51	2.51				
EH-494/4	2.53	2.53	2.53			
EH-483/8	2.55	2.55	2.55			
EH-489/1	2.65	2.65	2.65			
EH-498/8	2.81	2.81	2.81	2.81		
EH-497/7		3.28	3.28	3.28	3.28	
EH-500/2			3.34	3.34	3.34	
EH-499/10				3.51	3.51	3.51
EH-493/1				3.54	3.54	3.54
EH-502/8				3.57	3.57	3.57
EH-488/7					3.78	3.78
EH-487/4					3.90	3.90
EH-484/6						4.28

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

P 72 h	a	b	c	d	e
EH-531/8	2.17				
EH-489/1	2.23				
EH-490/1	2.37				
EH-498/8	2.46	2.46			
EH-486/7	2.47	2.47			
EH-494/4	2.51	2.51	2.51		
EH-491/8	2.52	2.52	2.52		
EH-497/7		3.37	3.37	3.37	
EH-499/10		3.39	3.39	3.39	
EH-483/8			3.48	3.48	
EH-502/8				3.60	
EH-500/2				3.68	3.68
EH-493/1				3.81	3.81
EH-487/4				4.05	4.05
EH-488/7				4.21	4.21
EH-484/6					4.65

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

P 120 h	a	b	c
EH-487/4	3.58		
EH-497/7	3.77		
EH-499/10	3.94	3.94	
EH-488/7	3.97	3.97	
EH-500/2	4.16	4.16	
EH-498/8	4.24	4.24	
EH-494/4	4.62	4.62	
EH-490/1	4.70	4.70	
EH-486/7	5.38	5.38	
EH-489/1	5.48	5.48	
EH-491/8	5.84	5.84	
EH-531/8	5.85	5.85	
EH-493/1	6.02	6.02	
EH-483/8	7.40	7.40	
EH-484/6		18.75	18.75
EH-502/8			25.56

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

P 168 h	a	b	c	d
EH-498/8	4.14			
EH-531/8	4.60			
EH-494/4	4.68			
EH-489/1	4.77			
EH-490/1	5.28			
EH-497/7	5.30			
EH-491/8	5.31			
EH-499/10	5.52			
EH-500/2	5.72			
EH-486/7	5.80			
EH-488/7	5.98			
EH-484/6	9.74	9.74		
EH-502/8		16.54		
EH-493/1		17.20		
EH-483/8			31.73	
EH-487/4				42.27

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
Usando media armónica simple
Alfa=0.05

P 216 h	a	b	c	d
EH-498/8	4.21			
EH-494/4	4.96			
EH-500/2	5.63			
EH-490/1	5.73			
EH-531/8	5.89			
EH-497/7	6.27			
EH-499/10	6.44			
EH-489/1	6.44			
EH-486/7	7.59			
EH-488/7	7.76			
EH-491/8	11.53	11.53		
EH-493/1		26.90	26.90	
EH-502/8			28.28	
EH-484/6			34.09	
EH-483/8				105.69
EH-487/4				109.57

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
 Usando media armónica simple
 Alfa=0.05

P 264 h	a	b	c	d	e	f	g	h	i
EH-499/10	9.39								
EH-498/8	13.26								
EH-494/4	13.93								
EH-500/2	26.31	26.31	26.31						
EH-531/8	30.80	30.80	30.80						
EH-497/7	38.70	38.70	38.70	38.70					
EH-490/1		45.61	45.61	45.61	45.61				
EH-489/1		48.62	48.62	48.62	48.62				
EH-486/7			56.38	56.38	56.38				
EH-491/8				67.50	67.50	67.50			
EH-488/7				67.93	67.93	67.93			
EH-502/8					79.43	79.43	79.43		
EH-484/6						102.95	102.95	102.95	
EH-483/8							108.94	108.94	
EH-493/1								119.95	
EH-487/4									159.20

Con base en la suma de cuadrados de tipo III
 Usando media armónica simple
 Alfa=0.05

**ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA**

P 312 h	a	b	c	d	e	f	g
EH-498/8	11.39						
EH-494/4	28.02						
EH-499/10	29.81						
EH-497/7	38.11	38.11	38.11				
EH-531/8		50.01	50.01	50.01			
EH-490/1		52.69	52.69	52.69			
EH-500/2			60.56	60.56	60.56		
EH-488/7				76.05	76.05	76.05	
EH-502/8					84.64	84.64	
EH-484/6					86.30	86.30	
EH-489/1						96.20	
EH-491/8						104.32	104.32
EH-493/1						105.66	105.66
EH-486/7						106.11	106.11
EH-483/8							124.78
EH-487/4							126.33

Con base en la suma de cuadrados de tipo III

Usando media armónica simple

Alfa=0.05