

Importancia en la patogenicidad de la acción enzimática del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café

Importance of the enzymatic action of *Beauveria bassiana* on its pathogenicity toward the reel

Oscar Fernando Castellanos Domínguez¹

Resumen

Durante los últimos siete años en Colombia el ataque de la broca al café se ha convertido en un grave problema para la economía nacional. Los métodos usados para su erradicación no han ofrecido resultados contundentes, aunque entre ellos el más efectivo lo constituye el empleo de un bioinsecticida obtenido del hongo *Beauveria bassiana*. Actualmente es necesario plantear el mejoramiento de las propiedades patogénicas del bioinsecticida a partir de investigaciones más profundas que permitan a su vez visualizar todos los componentes de la acción del hongo sobre el insecto. Una de las etapas cruciales en la infección es la acción enzimática del hongo sobre la cutícula del insecto. La patogenicidad entonces puede depender en gran medida de ésta. El conocimiento de las particularidades de esta etapa permitirá elaborar un mejor producto contra la broca. En este artículo se hace un justificación detallada de la necesidad de profundizar en la investigación de la acción enzimática. Es importante tener en cuenta ciertas consideraciones para no caer en falsas interpretaciones del verdadero papel de las enzimas en la patogenicidad, entre las cuales encontramos: 1. Algunas partes de la cutícula son más susceptibles al ataque enzimático que otras, o sea que no solamente es importante la actividad catalítica del complejo enzimático producido por el hongo sino, además, el sitio específico de la acción de estas enzimas en la cutícula; 2. La actividad de las algunas enzimas (proteasas) es un factor determinante sobre todo en los estados iniciales de la infección, mientras otras (quitinasas) se manifiestan principalmente en los estados tardíos de ésta. 3. Aún registrándose buena actividad enzimática, puede ser posible que la patogenicidad sea baja debido a la poca agresividad

de las toxinas; 4. La acción enzimática es bastante compleja y para la descomposición de cada uno de los componentes de la cutícula interactúan varias enzimas. Por ello se debe realizar un estudio detallado del mayor número de actividades específicas para entender cual de ellas determina principalmente la capacidad infecciosa del agente patógeno, para luego poder relacionarla con la patogenicidad.

Palabras claves: Cutícula, Infección, Virulencia, Proteasas, Quitinasa, Feniloxidasas, Lipasa, *Hypothenemus hampei*, Bioinsecticida, Enzimas.

Summary

During the last seven years in Colombia the assault of the insect *Hypothenemus hampei*, called the "reel" to the coffee, has been converted into a serious problem for the national economy. The methods used for its eradication have not offered forceful results, though between them the most effective constitutes the employment of a bioinsecticide obtained from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Currently it is necessary to outline the improvement of the pathogenic properties of the bioinsecticide as of deepest investigations that permit at the same time to visualize all the components of the action of the fungus on the insect. One of the crucial stages in the infection is the enzymatic action of this fungus on the cuticle of the insect. The pathogenicity then can depend to a large extent on this. The knowledge of the particularities of this stage will permit to elaborate a better product against the reel. In this article is made a detailed justification of the need of deepening in the investigation of the enzymatic action. It is important to take into account certain considerations so as not to fall in untruthful interpretations of the real paper of the enzymes in the pathogenicity, between those which we find: 1. Some parts of the cuticle are more susceptible on enzymatic assault than others, or rather that not only it is important the catalytic activity of the enzymatic complex produced by the fungus or but, furthermore, the specific site of the action of

these enzymes in the cuticle; 2. The activity of some enzymes (proteases) is a determinant factor above all in the initial states of the infection, while others (chitinases) are expressed mainly in the late states of it. 3. Yet it being registered good enzymatic activity, it can be possible that the pathogenicity will be decreased due to the few aggressiveness of the toxins; 4. The action of enzymes is quite complex and for the decomposition of each one of the components of the cuticle take part several enzymes. Because of this it should be to accomplish a detailed study of the greater number of specific activities to understand which one determines mainly the infectious capacity of the pathogenic agent, for then be able to relate it to the pathogenicity.

Key words: Cuticle, infection, virulence, Protease, Chitinase, Feniloxidasas, Lipase, *Hypothenemus hampei*, Bioinsecticide, Enzymes, *Beauveria bassiana*.

Introducción

El cultivo del café en Colombia se remonta desde finales del siglo pasado. Desde entonces y hasta hoy el café se ha convertido en el producto bandera de la economía nacional y su exportación se constituyó en el 25.1% de la exportaciones totales en 1994 (Rev. Banco de la República 1995). La economía nacional ha llegado a depender de una manera significativa de este producto, así, por ejemplo, en los años de bonanza cafetera de 1980-1981 se generó un "boom" de la economía colombiana. De otro lado, a mediados de la década de los 80 el ataque de la roya que desbastó miles de hectáreas de cafetales afectó gravemente la economía nacional.

En 1988 proveniente del Ecuador y del Brasil incursionó al territorio de nuestro país un pequeño insecto coleóptero, el *Hypothenemus hampei*, conocido como la broca del café, el cual ataca directamente el grano y deposita allí sus huevos (Asocia 1994). Se reproduce con gran facilidad a temperaturas cercanas a 25°C y su ciclo de desarrollo dura aproximadamente un mes, que varía de acuerdo con la altitud y las condiciones climáticas, especialmente de humedad. En estos diez años ha originado un verdadero problema económico expresado en la disminución de la producción del café y de las exportaciones de este producto. Hacia el año de 1992, aproximadamente 150 mil hectáreas de café se hallaban infectadas por broca en nuestro país. En la actualidad se estima que unas 600 mil hectáreas cultivadas de café pueden estar infestadas (Calderón y Cortés 1993).

En estudios recientes de la Federación Nacional de Cafeteros y los Comités Departamentales de Caficultores se han hecho análisis estadísticos relacionados con el grado de infestación, la frecuencia en el control y el mé-

¹ Profesor del Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. I.Q., M.Sc., Ph.D en Biotecnología y Cinética Enzimática. e-mail: ocastell@colciencias.gov.co

todo empleado contra la broca (Asocia 1994). La presencia de la broca en la zona cafetera, presentó los siguientes registros:

- El 25 % de los productores tienen en sus propiedades un nivel de infestación menor del 10%.
- El 19 % de los productores tienen un nivel de infestación mayor del 10 % (28 % en promedio).

Con relación a las prácticas de control, los productores utilizan las siguientes técnicas (Cenicafé 1993):

- El 95 % recurre al RE-RE (recolección oportuna y repase)
- El 49 % de los caficultores utiliza el hongo *B. bassiana* como medio de control en forma de bioinsecticida.
- El 37 % maneja la pulpa del café controlando químicamente con insecticidas supremamente tóxicos (ej. ondofosfato - Thiodan 35 CE) (Castro 1990).
- El 1 % recurre al uso de la avispa.

En la actualidad el bioinsecticida contra la broca del café está basado en el uso del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, el cual ataca directamente al insecto. La forma como infecta el hongo *B. bassiana* a la broca del café es la siguiente (Rodríguez 1992): La infección se inicia por la adherencia de las conidias de este hongo a la cutícula del insecto y la germinación de la espora en la superficie de la misma. La hifa invasora penetra en los tejidos del hospedero (a menudo el cuerpo grueso es el primero en ser atacado) y se ramifica a través del hemocelo, o sea los cuerpos hifales o segmentos de hifa se quiebran y circulan en el hemocelo del huésped durante los primeros estados de infección, distribuyéndose ampliamente. Después de llenar el cuerpo del insecto agonizante o muerto con micelio, las hifas emergen, crecen a través del integumento del insecto y producen esporas sobre la superficie externa del hospedero. Estas esporas son dispersadas por el viento y la lluvia o por los insectos infectados durante la alimentación o la cópula. La patogenicidad y la habilidad para sobreponerse a los mecanismos de defensa de sus huéspedes se debe en gran parte a la producción de toxinas. *B. bassiana* produce un depsipéptido cíclico conocido como beauvericin (Roberts 1981), que es de alto peso molecular y soluble en agua. Esta sustancia se libera después de la invasión al hospedero.

Estado actual de la producción del bioinsecticida contra la broca

La necesidad de desarrollar una tecnología para la obtención de un mejor bioinsecticida a

partir del *B. bassiana* en contra de la broca del café, entendiéndose la complejidad del problema, exige analizar detenidamente los mecanismos de la patogenicidad con ayuda de métodos serológicos (Shimizu y Aizawa 1988), inmunoquímicos (Yingchun y Ekramodoullan 1991), inmunológicos y bioquímicos (Fargues y otros 1981) y quimiotaxonómicos (Bridge *et al.* 1990). De los métodos anteriormente mencionados cabe resaltar el desarrollado por Bridge para el estudio de 16 cepas diferentes de *B. bassiana*, aisladas en 10 países productores de café, las cuales fueron estudiadas específicamente en su acción contra la broca del café. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos el autor llega a la conclusión que para el desarrollo de un insecticida biológico a nivel industrial es recomendable llevar a cabo el análisis quimiotaxonómico, el cual consiste en realizar un estudio profundo de la variación fisiológica y la capacidad enzimática en dependencia a las condiciones naturales y artificiales en la cuales el hongo crece. En un estudio de las actividades catalíticas de los complejos enzimáticos producidos por las diferentes cepas, mediante la determinación en medios de cultivo tratados con diferentes substratos selectivos, se determinó cualitativamente usando métodos colorimétricos la presencia de diferentes actividades enzimáticas (Lester 1975). Son también usados los métodos electroforéticos, en los cuales el gel es tratado en soluciones de substratos específicos, que permiten, después de una coloración indicada, cualitativa y en algunos casos semicuantitativa determinar la actividad catalítica (Lawrence y Melnick 1960; Shaw y Prasad 1974; Woodbury *et al.* 1971; Leger y otros 1986). De los métodos cualitativos usados hoy en día sobresale el desarrollado por Leger y su grupo (1986), el cual permite específicamente determinar para los entomopatógenos 15 diferentes actividades, usando un método adaptado de una técnica rápida, conocida comercialmente como APIZYM.

El uso de bioinsecticida a partir de *B. bassiana* es el método más efectivo para el control biológico de la broca del café, pero su potencial tiene que ser aun desarrollado. Aunque las bioinsecticidas obtenidas con el principio biológico de este hongo son producidas con éxito a nivel industrial en Brasil y Rusia, éstos no son de gran cobertura comercial en la actualidad. Las razones de su poca aplicabilidad universal radican en las particularidades de cada insecto que se quiera atacar y las condiciones medio ambientales de la interacción específica patógeno-huésped (Ferron, 1981). Charnley (1989), analizando el presente y futuro de los microinsecticidas, planteó la necesidad de relacionar en el proceso de producción de cepas con mayor virulencia los siguientes

factores: 1. Evaluación de los determinantes de la patogenicidad (producción de toxinas); 2. Adhesión de la espora a la cutícula; 3. Germinación de la espora; 4. Diferencias en las estructuras de la cutícula penetrable por el tubo germinal; 5. Mecanismos (mecánicos y enzimáticos) de penetración de la espora en el hospedero; 6. Defensa del hospedero.

Mecanismo bioquímico de la patogenicidad

Teniendo en cuenta estas consideraciones y los registros de trabajos anteriores, el mecanismo bioquímico del ataque del hongo a la broca del café puede ser representado fundamentalmente en tres etapas (Roberts 1981; Smith *et al.* 1981; Charnley y Leger 1986; Butt, 1990; Lecuona *et al.* 1990):

1. La adherencia de las esporas del hongo en la cutícula del insecto.
2. La acción enzimática del hongo sobre la cutícula del insecto que termina por destruirla permitiendo la entrada del tubo germinal de la espora en el cuerpo del insecto.
3. La acción de las toxinas producidas por la espora, las cuales finalmente matan al insecto.

La patogenicidad clásicamente se define como la capacidad de un agente externo de causar una enfermedad (Bustillo 1987), la cual es medida por la virulencia (Dulbecco *et al.* 1985). La virulencia se emplea para comprender dos rasgos de un organismo patógeno: su infectividad (la capacidad para colonizar a un huésped, representada numéricamente por la dosis infecciosa media - DI50) y la gravedad de la enfermedad producida (representada por la dosis letal media DL50) (Tortuva y Funke 1993; Dulbecco *et al.* 1985).

En el caso de la patogenicidad del hongo *B. bassiana* la adherencia y la acción enzimática sobre los componentes de la cutícula influyen principalmente en la infectividad del hongo sobre la broca, y sus toxinas determinan principalmente la gravedad de la enfermedad producida o la capacidad del hongo para matar al insecto.

Hace poco menos de tres décadas que los procesos bioquímicos antes mencionados de la patogenicidad del hongo *B. bassiana* empezaron a ser estudiados. Los investigadores fijaron su atención en un principio básicamente en la forma de acción de las toxinas y sus particularidades específicas. Paralelamente en la entomología el estudio de los procesos de adherencia también tomaban auge. Algunos de los resultados más importantes de dichas investigaciones sobre la adherencia y las toxinas, realizados desde entonces hasta hoy, son los siguientes:

Sobre los mecanismos de adherencia de las conidias del *B. Bassiana* en la cutícula de la broca del café se encuentran pocos registros en la literatura de los últimos años. Sin embargo, es sabido que casi todos los patógenos poseen mecanismos que facilitan su unión a los tejidos del hospedero (Tortuva y Funke 1993; Dulbecco *et al.* 1985). Para la mayor parte ellos, como en el caso del hongo *B. Bassiana*, la adherencia es un paso previo necesario para su acción patogénica. La adhesión entre el patógeno y el hospedero tiene lugar por medio de moléculas de superficie del patógeno, llamadas adhesinas, que se unen a receptores superficiales complementarios que existen en las células del hospedero. La mayor parte de adhesinas estudiadas hasta el momento son glucoproteínas o lipoproteínas, mientras los receptores de las células del hospedero son generalmente azúcares como la manosa. Las adhesinas de diferentes cepas de la misma especie pueden variar en su estructura. Diferentes tipos de células del hospedero pueden tener diferentes tipos de receptores. Si se logra alterar las adhesinas, los receptores o ambos, así como sus mecanismos de interacción se puede inducir o inhibir la adhesión de un patógeno al hospedero. El entendimiento de las particularidades de los mecanismos de adhesión y los factores influyentes en este proceso son fundamentales para determinar que tipo de formulantes deberán ser usados en la producción industrial de un bioinsecticida, por ejemplo, a partir de un hongo como el *B. bassiana* (Pereira y Roberts 1990). Lecuona y sus colaboradores (1990) estudiando las alteraciones de la epicutícula del insecto al ser infectado por 147 cepas diferentes de *B. bassiana* y 6 cepas de *B. brongniartii*, con ayuda de la microscopía electrónica, encontraron que las conidias se adhieren específicamente a los receptores de naturaleza polisacárida del hospedero por intermedio de una particular segregación azucarada del hongo. Simultáneamente en la cutícula se modifica la distribución de sus componentes. Así, por ejemplo, seis horas después de la aplicación de los hongos sobre el *Ostrinia nubilalis* aproximadamente el 85 % de los carbohidratos de la cutícula desaparecen. De otra parte según Boucias y sus colaboradores (1988) la infección por el hongo *B. bassiana* es iniciada cuando la conidia entra en contacto con la cutícula del insecto y se adhiere por mecanismos hidrofóbicos.

Después de cruzar la cutícula del insecto la espora se transporta por el hemocelo hasta el momento de la muerte, desarrollándose en presencia de sustancias producidas por el insecto para su defensa. Como parte de la reacción de defensa cerca de las esporas son producidos por el insecto unos pseudotegidos o granulomas (Vey *et al.* 1975). Los hongos entomopatogénicos como la *Beauveria* producen toxinas que son capaces de destruir los

granulomas, las cuales permiten a las blastoesporas invadir el hemocelo, aunque la patocitosis no siempre es observada (Vey *et al.* 1975). El hongo *B. bassiana* al producir una toxina depsipéptida cíclica tiene un mecanismo de acción similar a las toxinas de este tipo del hongo *Metarhizium*, como las destruxinas reportadas por Ferron (1985). Estudios realizados con toxinas producidas por diferentes cepas de *B. bassiana* demostró que existe una correlación entre la cantidad de toxina producida y la virulencia contra la *Galleria mellonella* (Sikura y Bevzenko 1972). Vey y colaboradores (1973) realizaron los primeros estudios citológicos *in vitro* de los efectos del beauvericín. Estudios histopatológicos de tejidos infectados con toxinas depsipéptidas cíclicas sugieren que estas matan al huésped creando una degeneración progresiva de los tejidos del huésped por cambios estructurales de las membranas, lo cual genera la deshidratación de las células (Zacharuk 1971). También son observados cambios en la actividad eléctrica de los nervios (Evlakhova y Rakitin 1968), causada por el incremento del consumo de oxígeno en un intento del insecto por restablecerse. Recientemente Zizka y Weiser (1993) estudiando el efecto de beauvericina sobre la ultraestructura de la larva de *Culex pipiens* establecieron que con concentraciones de hasta 0,1 mg/ml de toxina se obtiene una mortalidad del 44 % en 48 horas. El principal síntoma de la intoxicación fue la vacuolización generalizada. El efecto tóxico se concentró en las mitocondrias, las cuales se inflaron y tomaron aspecto de vacuolas esféricas. La cromatina de los núcleos se concentró en forma de gránulos alargados a lo largo de la membrana nuclear. El más afectado fue el epitelio de las moscas en donde la membrana basal se rompió y su contenido se disolvió lentamente.

Aunque la información obtenida sobre estos dos factores: la adherencia y las toxinas ha servido para entender más detalladamente los procesos involucrados en la patogenicidad, ésta no es suficiente para correlacionar estrictamente estos factores en dependencia de variables, tales como las condiciones del medio de crecimiento del hongo, que permitan la manipulación de procesos, tendientes a la obtención a gran escala de bioinsecticidas a partir del *B. bassiana*. Evidentemente se hace necesario entender también la forma de penetración de la conidia en el insecto, o sea investigar los procesos enzimáticos por los cuales la cutícula es deshecha y el tubo germinal llega hasta el hemocelo. Por ello en años recientes, se ha dirigido el interés de las investigaciones hacia el conocimiento de la producción de enzimas extracelulares, el análisis de isoenzimas, la caracterización de DNA, el estudio de las características de crecimiento influyentes en la producción de enzimas.

Varios investigadores han establecido que este hongo produce diferentes tipos de enzimas extracelulares, incluyendo: proteasas (Bidochka y Khachatourians 1990), quitinasas (Pegg y Young 1982; Leger *et al.* 1991), amilasas (Ozino *et al.* 1992), beta-glucanasa (Zaykina *et al.* 1983), lipasas (Hegedus y Khachatourians 1988), fenoloxidasas (Bidochka 1989), esterasas (Patente 94-14644, 1994).

Acción enzimática del hongo sobre la cutícula del insecto y su influencia en la patogenicidad

En la actualidad la necesidad de investigar las particularidades de la acción enzimática para el desarrollo de un proceso tecnológico, tendiente a producir bioinsecticidas a gran escala, está relacionada con la posibilidad de mejorar las cualidades patogénicas del producto final en dependencia de las condiciones del proceso (como posteriormente se mostrará), así como también con la optimización de las pruebas de control de calidad del producto final. Esta última parte se lleva a cabo por medio del bioensayo (González y otros 1993), el cual toma para su ejecución de 3 hasta 11 días. Si se considera que para el bioensayo se deben tomar insectos adultos de 3 o 4 días, los cuales para llegar a este estado requieren de 20 a 25 días de desarrollo [desde la penetración del insecto padre en el grano de café pasan tres días para colocar los huevos, los cuales toman 7 días para llegar a ser larvas, 12 días más para convertirse en la prepupa, y 7 días adicionales para llegar a adulto (ASOCIA 1994)], esto quiere significar que el bioensayo y su estado preliminar de preparación tarda no menos de 30-35 días. Lo anterior implica retardo en los procesos de investigación y desarrollo de la tecnología antes mencionada. Por ello, se hace indispensable desarrollar un método analítico que permita, en condiciones de laboratorio, en tiempos mucho más cortos, tener datos aproximados, correlacionables con la patogenicidad. Evidentemente modelar 100 % todos los procesos implicados en la patogenicidad es prácticamente imposible, haciendo insustituible totalmente el bioensayo como control de calidad de la patogenicidad. Se trata de buscar, entonces, controles que permitan reducir sensiblemente la cantidad de bioensayos y dejar esta prueba para momentos prioritarios.

Para lograr este objetivo se requiere entender detalladamente los procesos enzimáticos y eventualmente la acción de las toxinas, los cuales se modifican en dependencia de las condiciones de interacción patógeno-huésped. Sin embargo, la evaluación de la actividad catalítica de las enzimas producidas, en este caso por el hongo, es inicialmente escogida por ser pruebas de laboratorio de rápida ejecución (1-3 horas), por tener estrecha relación

con la capacidad de infectar del hongo y ser un factor determinante de la patogenicidad del mismo.

Las enzimas producidas por los hongos entomopatógenos actúan sobre los componentes de la cutícula de los insectos. Para entender mejor qué tipo de enzimas y cuáles pueden ser sus mecanismos de acción se requiere saber la composición de la cutícula.

Los insectos crecen mediante una serie de mudas, volviendo a formar de vez en cuando todo el exoesqueleto y reabsorbiendo gran parte de la cutícula vieja antes de desprenderse de ella. La cutícula de los insectos en su desarrollo contiene dos capas, una fina epicutícula de proteína y lípido y en su parte exterior una procutícula más gruesa de proteína y quitina. Después de la muda la región exterior de la procutícula se endurece hasta cierto grado, diferenciándose, entonces, la procutícula en dos capas, la exterior más dura o exocutícula y la interior más blanda o endocutícula (Gilmour 1968). El endurecimiento va acompañado por un oscurecimiento del color.

El componente predominante de la cutícula es la proteína (Hepburn 1985). El principio básico del endurecimiento de la cutícula es el resultado del curtido de la proteína cuticular mediante la acción de quinonas (en este proceso se incluye la formación de compuestos, tales como: ácido protocatético, ácido dihidroxifenilacético, la dihidroxifenilalanina - DOPA, dopamina, N-acetildopamina, N-acetildopaminquinona, melanina) derivadas de la tirosina, siguiendo complejos mecanismos de oxidación enzimática (Aso *et al.* 1984). Es evidente que en este mecanismo el insecto usa diferentes enzimas de tipo fenolasa. Estas enzimas contienen cobre y catalizan la orto-hidroxilación de los monofenoles y la deshidrogenación de los o-fenoles. La proteína curtida y oscurecida que se forma por la acción de las quinonas, las cuales sirven para crear enlaces cruzados, es llamada esclerotina.

La presencia de componentes fenólicos (provenientes de la tirosina por oxidación) y tirosinasas, en el integumento de los artrópodos generan procesos de melanización de la cutícula (Neville 1975), los cuales pueden acentuarse en el momento del ataque de los agentes patógenos alterando su capacidad de penetración. Las sustancias que actúan en este proceso generalmente afectan las enzimas producidas por los hongos patógenos o como repelente de los mismos (Travland 1979). Existen cinco mecanismos, por los cuales los fenoles y sus derivados pueden ejercer un efecto repelente contra la acción de los hongos entomopatógenos (Leger *et al.* 1988): 1. Los fenoles y los productos de sus oxidaciones, como las quinonas y la melanina, pueden ser

tóxicos para el hongo o pueden inactivar las enzimas producidas por él; 2. La cutícula melanizada puede ser más resistente a la acción mecánica de penetración; 3. La cutícula melanizada puede ser muy resistente a la acción de las enzimas; 4. La melanina puede dificultar la difusión de las enzimas; 5. Las paredes de las conidias pueden sufrir un proceso de inducción por la melanina presente del insecto, lo cual conlleva a la pérdida de plasticidad de la pared celular dificultando los procesos de crecimiento. La posible influencia de la melanización en las enzimas extracelulares del hongo *B. bassiana* quedó cuestionado desde los años 60 con el hallazgo sobre la capacidad de este hongo de sintetizar las fenoloxidasas a partir de arilaminas *in vitro*, lo cual sugiere que la pigmentación de la cutícula del insecto no debe afectar negativamente a las enzimas de la *B. bassiana* (Ferron 1981).

El segundo componente constitutivo de la cutícula es la quitina, que consta de unidades N-acetilglucosamina ligadas mediante enlaces 1,4-beta-. La quitina se la considera como el polisacárido característico de los artrópodos, aunque también se encuentra en otros animales y en la pared celular de los hongos. En los insectos la quitina es uno de los constituyentes principales del exoesqueleto, y la producen la mayoría de las células ectodérmicas (Gilmour 1968). Es probable que gran parte de la quitina de la cutícula esté unida a la proteína por enlaces covalentes, lo cual sugiere que el material básico de la cutícula de los insectos debe ser una glucoproteína. Aunque en los productos de la hidrólisis de la quitina de los insectos toda la muestra revelan la preponderancia de N-acetilglucosamina, también hay un porcentaje pequeño de glucosamina y algunos grupos pequeños libres. Estos últimos son principalmente radicales aspartilo e histidilo, y probablemente representan algunos de los puntos de enlace de la proteína. Parte de la cutícula puede estar dispuesta en láminas, alternando capas de quitina y proteína. Esta disposición podría originarse por "cristalización" de glucoproteínas preexistentes durante la deshidratación de la nueva cutícula, sin embargo, su existencia puede también sugerir que la proteína y la quitina se segregan según determinadas pautas, y que los enlaces cruzados se realizan después de depositarse.

Sobre el tercer componente de la cutícula, los lípidos, se sabe que la mayor parte de las grasas de los insectos (incluyendo la cuticular) están compuestas por ácidos saturados palmítico y estárico, con dieciséis y dieciocho átomos de carbono, respectivamente, así como ácidos no saturados, como el oléico, con un doble enlace. Eventualmente la cantidad de los ácidos grasos menos saturados, pueden ser

mayor en dependencia de la dieta alimenticia del insecto y de su medio ambiente (Gilmour 1968).

La acción de las enzimas sobre los componentes de la cutícula ha sido ampliamente investigada en los últimos 15 años. Las proteínas llegan a hacer parte hasta del 65 % de la misma en el caso del saltamontes *Melanoplus sanguinipes* (Bidochka 1989). Esto supone que el papel de las proteasas producidas por el hongo *B. bassiana* al atacar la broca del café es determinante para la hidrólisis de la cutícula. Muchas investigaciones de la actividad proteolítica del complejo segregado por *B. bassiana* se han realizado. Bidochka y Khachatourians (1990) estudiando la proteasa extracelular purificada producida por este hongo encontraron que en las cepas en las cuales la actividad proteolítica fue sobresaliente el tiempo letal medio (TL50) del saltamontes *M. sanguinipes* fue más bajo (TL50 5,7-6,8 días) que en aquellos casos en los cuales esta actividad fue poco significativa (TL50 11,3 días), corroborando de esta manera que la actividad de las proteasas es un factor determinante de la virulencia del hongo. Estos mismos autores aceptan que en la literatura aún no es clara una relación directa entre la actividad enzimática de la proteasa de diferentes microorganismos entomopatógenos y su virulencia, por cuanto en algunos casos la virulencia es indiferente a la actividad proteolítica (Champlin y otros 1981; Pekrul y Gula 1979). Sin embargo Bidochka y Khachatourians concluyen que la actividad proteolítica debe ser tomada como un factor de la virulencia teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: 1. Algunas partes de la cutícula son más susceptibles al ataque enzimático que otras, o sea que no solamente es importante la actividad catalítica del complejo enzimático producido por el hongo sino, además, el sitio específico de la acción de estas enzimas en la cutícula; 2. La actividad de las proteasas es un factor determinante sobre todo en los estados iniciales de la patogenicidad. Por consiguiente al no tener en cuenta estas consideraciones pueden surgir errores en el estudio de la influencia de la actividad de las enzimas en la patogenicidad. En otro trabajo de estos mismos autores (1987) sobre la purificación y las propiedades de una proteasa extracelular producida por el hongo *B. bassiana* implicada en los procesos de patogenicidad, fue caracterizada esta enzima con un peso molecular de aproximadamente 35 kDa, pH óptimo de 8,5, temperatura óptima para la actividad catalítica de 37°C, estable a 27°C, además, esta proteasa pierde el 40 % de la actividad a los 30 minutos de incubación a esta temperatura.

En los últimos cinco años los estudios de las proteasas producidas por el hongo *B. bassiana* se han aumentado y tienden a resolver, entre

otros, el interrogante de cómo inducir la producción de una proteasa determinada que permita su mejor incidencia en el efecto patogénico del hongo sobre el insecto. La utilización de métodos de inducción de las enzimas ha encontrado resultados positivos que permitieron obtener el gen (1080 bp) de una proteasa (Poly A, MM 37,4 kDa) altamente activa para la degradación de la cutícula en medios de cultivos adaptados con 0,2 % de cutícula pretratada y 0,2 % de quitina (Joshi *et al.* 1995). Los autores de este trabajo compararon el gen obtenido con el gen de la proteasa-K del hongo saprófito *Tritirachium album*, encontrando que, a similitud de éste, el gen de Poly A es determinante de la patogenicidad del hongo.

La existencia de una misma enzima, como la proteasa encontrada en diferentes microorganismos: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia* y *Verticillium spp*, hace suponer que los hongos entomopatógenos que atacan un determinado insecto puedan tener componentes de sus complejos enzimáticos iguales o con características muy similares, entre las cuales se incluya el tener un papel determinante en la patogenicidad (Patente Ja. 90-02335, 1989). En el caso de esta proteasa, caracterizada por ser altamente específica hacia Bz-Phe-Val-Arg-NA; con MM de 25-30 kDa y pH óptimo de 8,0; y estable a temperaturas hasta de 50°C y pH de 6-9; prácticamente no manifiesta actividad hacia proteínas azufradas, cutícula de langosta y elastina o sea probablemente no actúa como factor en la patogenicidad.

Luego de hidrolizarse el componente proteínico, la quitina, que se encuentra cerca de las subunidades proteínicas, queda más expuesta y es entonces atacada por las quitinasas. Por ello la acción de la quitinasa en el medio de reacción del complejo enzimático del *B. bassiana* con la cutícula del insecto es más tardía que la proteasa (Leger *et al.* 1987). Recientemente este mismo investigador y sus colaboradores (Leger y otros 1996) demostraron la veracidad del mecanismo tardío de acción de la quitinasa usando anticuerpos policlonales (45 kDa) y la inmunocitoquímica estructural, lo cual les permitió registrar con considerable precisión la segregación de la quitinasa durante la penetración al huésped. Ha sido demostrado que la hidrólisis de quitina se lleva a cabo mediante un mecanismo de reacciones paralelas y consecutivas, en el cual actúan enzimas con diferente especificidad: las quitinasas y las quitinobiosas y la N-acetilglucosamidasa (Pegg y Young 1982; Leger *et al.* 1991). Unos años antes Cooper *et al.* (1978) habían propuesto un mecanismo más sencillo de la hidrólisis de la quitina, mediante el cual la N-acetilglucosamina se produce debido a un ataque progresivo de la exoquitinasa en los extremos de este polímero. Es probable que como en el caso de otros

polisacáridos, el mecanismo cinético de la descomposición de la quitina incluya este par de propuestas, así fue demostrado para la hidrólisis de la celulosa (Lutzen y otros 1983; Castellanos y otros 1994). La actividad de las quitinasas en numerosos casos ha sido correlacionada a la virulencia de la *B. bassiana* contra los lepidópteros (Yanagita 1980; Samsinikova y Misiskova 1973; El-Sayed y otros 1989), *Galleria mellonella* (Samsinikova *et al.* 1971; Bajan *et al.* 1979).

Además de las quitinasas, existen ciertas carbohidrolasas producidas por *Beauveria*, las cuales, en menor grado, están relacionadas con la patogenicidad, y eventualmente han sido objeto de investigación. Es el caso de las amilasas (Ozino *et al.* 1992) y la 1,3- beta glucanasa (Zaykina *et al.* 1983), de las cuales su actividad fue registrada en el medio de cultivo del hongo y caracterizada su especificidad, aunque su papel en la patogenicidad no fue claramente determinado.

El papel de las lipasas en la ruptura de epicutícula de los insectos ha sido menos estudiada en comparación con las investigaciones realizadas con proteasas o quitinasa. Samsinikova y Misikova (1973) realizaron un análisis detallado de la relación existente entre la actividad lipolítica de algunas cepas de *B. bassiana* y su virulencia. La importancia de este tipo de enzimas en la patogenicidad fue discutido también por Hegedus y Khachatourians (1988). Ellos realizaron una investigación sobre la producción de una lipasa extracelular de *B. bassiana* GK 2116, encontrando que cuando este hongo es cultivado en medio con extracto de levadura, peptona y caldo de dextrosa, la segregación de las lipasas es moderada, pero añadiendo aceite de oliva (0,02-5 %) en calidad de inductor la producción de esta enzima es incrementada significativamente, registrándose en el medio de cultivo después del quinto día. Para la producción de lipasa no se recomienda usar medios con glucosa y sales minerales y es deseable retirar del medio de cultivo los posibles inhibidores de crecimiento y producción de la enzima, como los ácidos grasos. El efecto de la quitina como inductor de quitinasas y quitobiosas de hongos entomopatógenos fue demostrado por Ulhoa y Peberdy (1993) al estudiar la influencia de la fuentes de carbón en la producción de estas enzimas.

Un amplio estudio de la forma de inducir la producción de varias de las enzimas producidas por *B. bassiana*, que destruyen la cutícula, realizó Gupta *et al.* (1992), tomando cinco diferentes cepas en medios de cultivo con 1,0 % de gelatina, 1,0 % de glucosa y 0,6 % de nitrato de sodio, así como 0,5 % de cutícula pretratada y purificada de *Galleria mellonella* o *Trichoplusia ni*. Al registrar la producción

de proteasa, quitinasas y estererasas Gupta encontró que esta depende básicamente de los componentes del medio, así, por ejemplo, en aquellos casos en los cuales el medio era enriquecido con glucosa la producción de quimioesterasa fue significativamente mayor. Gupta y colaboradores concluyen que para el desarrollo de producción industrial de un bioinsecticida de *B. bassiana* es necesario conocer la variabilidad en la producción de las enzimas, participantes en la destrucción de la cutícula, en dependencia de los inductores que tomen parte en los medio de cultivo.

Sobre las estererasas producidas por el hongo *B. bassiana* fue realizado un estudio, analizando la hidrólisis del R-ketoprofen (ácido 2-(3-bezoilfenil) propiónico en presencia de S-enantiomeros (Patente 94-14644, 1994), encontrándose que las estererasas de este hongo pueden ser usadas para la transformación de S- a R-ketoprofen, bajo condiciones de pH 5,5-6,5 en un amplio intervalo de temperatura 10-40° C. En este trabajo también se reporta la metodología para purificar la estererasa de *B. bassiana*, aunque no se hace referencia de la relación de la actividad catalítica de esta enzima y la patogenicidad del hongo.

La fenoloxidasa de los insectos oxida fenoles y ortoquinonas, las cuales hacen enlaces cruzados con otras y con aminos terminales de proteínas para producir el pigmento negro, melanina. Las feniloxidasas ha sido implicada en el endurecimiento de la cutícula (Andersen 1985), en la reparación de heridas cuticulares (Bidochka 1989) y en la respuesta inmune de los insectos a la infección (Soderhall y Smith, 1986). Después de la infección o daño, la feniloxidasa es activada en el hemocelo por un complejo de cascada enzimático y otros factores a través de una proteólisis limitada del proprolipéptido fenoloxidasa (Soderhall y Smith 1986). Dada la complejidad del los substratos con los cuales está involucrada esta enzima, son varios los métodos desarrollados para cuantificar la actividad de la fenoloxidasa (Bidochka, 1989; Gillespie y otros 1991).

Consideraciones en la investigación de las actividades enzimáticas

Como fue señalado antes, la variación del medio de cultivo y de las condiciones de esporulación pueden afectar sensiblemente la composición del complejo extracelular producido por los hongos entomopatógenos, la actividad de las enzimas, así como la características de las toxinas, aunque es muy difícil regular la patogenicidad como tal modificando estos parámetros. Algunos trabajos registrados concluyen que entre la actividad de las enzimas, principalmente de las proteasa, las lipasas y las quitinasas no existe relación clara con la

patogenicidad del hongo (Pekrul y Grula 1979), independientemente de sus condiciones de cultivo o de la interacción del hongo con el insecto. Sin embargo, es necesario entender que las enzimas se pueden correlacionar con la capacidad de los hongos entomopatógenos de infectar al insecto, pero ellas no son las que lo matan directamente. Esta función es cumplida por las toxinas. Por ello, aún registrándose buena actividad enzimática, puede ser posible que la patogenicidad sea baja debido a la poca agresividad de las toxinas. Además, teniendo en cuenta que la acción enzimática es bastante compleja, y que para la descomposición de cada uno de los componentes de la cutícula interactúan varias enzimas, se debe realizar un estudio detallado del mayor número de actividades específicas para entender cual de ellas determina principalmente la capacidad infecciosa del agente patógeno, para luego poder relacionarla con la patogenicidad. En los trabajos de Pekrul y Grula fueron determinadas las actividades enzimáticas de las proteasas, lipasas y quitinasas usando metodologías generales de cuantificación total de actividad catalítica sin tener en cuenta la composición de cada uno de los complejos estudiados, y sus conclusiones fueron hechas sin tener en cuenta las consideraciones antes señaladas, planteadas por Bidochka y Khachatourians.

Por último, es de señalar que la producción de las enzimas por el hongo *B. bassiana* no es un evento casual o motivado estrictamente por su acción patogénica al inducirse cuando la conidia hace contacto con la cutícula del huésped, jugando un papel importante en el metabolismo del microorganismo. Así lo demostró Ogarkov (1993), quien encontró una aplicación en la industria de la curtiembres de las proteasas neutras producidas por este hongo. De igual modo las quitinasas producidas por *B. bassiana* y por otros hongos entomopatógenos pueden ser usadas en el control biológico de agentes fitopatógenos y en los procesos de bioconversión de los residuos de la industria pesquera y de quesos (Zikakis 1989). En hongo *B. bassiana* ha sido también utilizado para las investigaciones de procesos de producción industrial de las lipasas. En la patente japonesa 87-04570 (1986) se registró un novedoso método para el cultivo de *Aspergillus*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Verticillium* y *Mucor* spp. propuesto para la producción a gran escala de lipasas: lipasa, lipoproteína lipasa y lisofosfolipasa de uso industrial.

Bibliografía

- ANDERSEN, S. 1985. Sclerotization and tanning of the cuticle. In: Kerkut G and Gilbert L. Eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. v. 3. Oxford. Pergamon Press. p. 59-74.
- ASO, Y.; KRAMER, K.; HOPKINS, T. 1984. Properties of tyrosinase and DOPA quinone imine conversion factor from pharate pupal cuticle of *Manduca sexta*. Insect Biochem. (Inglaterra). v. 14, p. 463-472.
- ASOCIA. 1994. La broca del café. Reto a la caficultura del futuro. 2. p. 3.
- BAJAN, C.; KALALOVA, S.; KIMITOWA, K.; SAMSINAKOVA, A.; WOJCIECHOWSKA, M. 1979. The relationship between infectious activities of entomophagous fungi and their production of enzymes. Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol. v. 27, p. 963-968.
- BIDOCHKA, M. 1989. Interaccion of the entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* with the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*: A systematic study of pathogenesis. "Ph.D. Thesis, University of Saskatchewan.
- _____; KHACHATOURIANS, G. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. v. 53 no. 7, p.1679-1684.
- _____; KHACHATOURIANS, G. 1990. Identifications of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. J. Invertebr. Pathol. v. 56, p. 362-370.
- _____; GILLESPIE, J.; KHACHATOURIANS, G. 1989. Phenoloxidase activity of acridid grasshoppers from the subfamilies *Melanoplinae* and *Oedipodinae*. Comp. Biochem. Physiol. (Inglaterra). v. 43 B, p. 117-125.
- BOUCIAS, D.; PENDLAN, J.; LATGE, J. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. v. 54, p. 1795-1805.
- BRIDGE, P.; ABRAHAM, Y.; CORNISH, M.; PCLOR, C.; MOORE, D. 1990. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Mycopathologia. v. 3, p. 85-90.
- BUSTILLO, A. 1987. Enfermedades de insectos y posibilidades de uso en programas de manejo integrado de plagas en Colombia. Concurso de Ciencias Alejandro A. Escobar.
- BUTT, T. 1990. Fungal infection processes - A. Minireview. Oxford. UK. p. 35.
- CALDERON, E.; CORTES, L. Tesis de grado "Producción de un bioinsecticida de uso en el control de la Broca del café". 1993. Fundación Universidad de América. Santafé de Bogotá.
- CASTELLANOS, O.; SINITSYN, A.; VLA-SENCO, E. 1994. The investigation of the properties of the cellulase system from *Penicillium* sp. Prik. Biokhim. Mikrobiol. v. 30, p. 799-811.
- CASTRO, M. 1990. El manejo integrado de la broca del fruto de caféto *Hypothenemus Hampei*. Manual técnico. ICA-PROMECAFE.
- CENICAFÉ. 1993. Manejo integrado de la broca. Boletín de extensión. Segunda. Edición.
- CHAMPLIN, F.; CHEUNG, P.; PEKLUR, S.; SMITH, R.; BURTON, R.; GRULA, E. 1981. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. J. Econ. Entomol. v. 74, p. 617-621.
- CHARNLEY, A. 1989. Mycoinsecticides: present use and futuro prospects. BCPC-mono. v. 43, p. 163-181.
- CHARNLEY, R.; LEGER, S. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. J. Invertebr. Pathol. v. 48, p. 82-95.
- COOPER, R.; RANKIN, B.; WOOD, R. 1978. Cell wall-degrading enzymes of vascular wilt fungi. Physiol. Plant Pathol. v. 13, p. 1010-134.
- DULBECCO, R.; DAVIS, B.; ELSIN, H.; GINSBERG H. 1985. Tratado de microbiología. Edic. 3. Salvat, Barcelona.
- EL-SAYED, G.; COUDRON, T.; IGNOFF, C. 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native mutant isolates of an entomopathogenic fungus *Nomuraea tileyi*. J. Invertebr. Pathol. v. 54, p. 394-403.
- EVLAKHOVA, A.; RAKITIN, A. 1968. Insecticidas biológicos y sus aplicaciones. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. v.178, p. 485-488.
- FARGUES, G.; DURIEZ-VAUCEL, T.; POPEYE, R. 1981. Immunological characterization of the entomopathogenic hyphomycetes *Beauveria* and *Metarhizium*. Mycopathologia. v. 75, p. 101-108.
- FERRON, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. En: Buerges H. Edit. Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980. London (Inglaterra), Acad. Press. p. 465-482.
- _____. 1985. Fungal control. En "Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Eds. Kerkut and Gilbert. Pergamo. Oxford. UK. v. 4, p. 314-346.
- GILMOUR, D. 1968. Metabolismo de los insectos. Edit. Alhambra. Madrid. p. 83-149.
- GILLESPIE, J.; BIDOCHKA, M.; KHACHATOURIANS, G. 1991. Separation of characterization of grasshopper hemolymph phenoloxidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Comp. Biochem. Physiol. v. 98c, p. 351-358.

- GONZÁLEZ, M.; POSADA, F.; BUSTILLO, P. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* (Colombia). v. 44 no. 3, p. 93-102.
- GUPTA, S.; LEATHERS, T.; EL-SAYET, G.; IGNOFFO, C. 1992. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogeneous fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* v. 16. no. 2, p. 132-137.
- HEGEDUS, D.; KHACHATOURIANS, G. 1988. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol. Lett.* v.10 no. 9, p. 637-642.
- HEPBURN, H. 1985. Structure of the integument. En "Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology". Oxford. v. 3, p.1-58.
- JOSHI, L.; LEGER, ST.; BIDOCHKA, M. 1995. Cloning of the cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol.lett.* v. 125. no. 2-3, p. 211-217.
- LAWRENCE, SH.; MELNICK, P. 1960. A comparison of serum proteins and enzymes by starch gel-electrophoresis. *Proc. Soc. Ex. Biol. Med.* v.105, p 572-577.
- LECUONA, R.; RIBA, G.; CASSIER, P.; CLEMENT, L. 1990. Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B.Brongniartii*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 58, p 10-18.
- LEGER, ST.; CHAERNLEY, A.; COOPER, R. 1986. Enzymatic characterization of entomopathogens with the APIZYM system. *J. Invertebr. Pathol.* v. 48, p. 375-376.
- LEGER, R.; COOPER, R.; CHARNLEY, A. 1987. Producción de la cutícula-degradando enzimas por el entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* durante la infección de cutículas de *Calliphora vomitoria* and *Mandisa sexta*. *J. Gen. Microbiol.* v. 13, p. 1371-1382.
- _____; COOPER, R.; CHARNLEY, A. 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium Anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 52, p. 459-470.
- _____; COPER, R.; CHARNLEY, A. 1991. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 58, p. 415-426.
- _____; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; RIZZO, M.; ROBERTS, D. 1996. Characterization and estructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. and Envirom.Microbiol.* v. 3, p. 907-912.
- LESTER, H.; ANAGNOSTAKIS, S. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia.* v. 67, p. 597-607.
- LUTZEN NIELSEN, M.; OXENBOELL, K. 1983. Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* p. 283-291.
- NEVILLE, A. 1975. Biology of the arthropod cuticle. Berlin. Springer Verlag.
- OGARKOV, B. 1993. *Beauveria bassiana* Protease. Patente Ru 94-05965.
- OZINO, O.; CRAVANZOLA, F.; LAMBERTI, A.; RINAUDO, M.; CURTO, M.; MARINO, C. 1992. Amylolytic activity in different strains of *Verticillium lecanii* and *Beauveria bassiana*. *Annali di Microbiol. de Enzimol.* v. 42 no. 2, p. 195-202.
- PATENTE JA 87-04570. 1986. Production of lipase.
- PATENTE JA 90-02335. 1989. Fungus enzyme.
- PATENTE WO - USA 94-14644. 1994. Production of R-ketoprofen and S-ketoprofer.
- PEGG, G.; YOUNG, D. 1982. Purification and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium alba-atrum*-infected tomato plants, and from *V. alb-atrum*. *Physiol. Plan Pathol.* v. 21, p. 384-409.
- PEKRUL, S.; GRULA, E. 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* by scanning electron microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* v. 34, p. 238-247.
- PEREIRA, R.; ROBERTS, D. 1990. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 56, p.39-46.
- REVISTA DEL BANCO DE LA REPUBLICA. 1995. v. 28 no. 806, p. 200.
- ROBERTS, D. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Microbial control of pest and plant disease. Edit. H. D. Burgues. Chap. 23. p. 441-464. New York.
- RODRIGUEZ, D. 1992. Control microbiano de insectos. Cenipalma. Santafé de Bogotá.
- SAMSINAKOVA, A.; MISIKOVA, S. 1973. *Ceska Mykol.* v. 27, p. 55-60.
- _____; MISIKOVA, S.; LEOPOLD, J. 1971. Accion of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). *J. Invertebr. Pathol.* v. 18, p. 322-330.
- SHAW, C.; PRASAD, R. 1974. Starch gel-electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem. gen.* v. 4, p. 297-320.
- SHIMIZU, S.; AIZAWA, K. 1988. Serological clasification of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 52, p.348-353.
- SIKURA, A.; BEVZENKO, T. 1972. *Vopr. Biol. Zatch. Rast. Kichinev.* p. 68-74.
- SMITH, R.; PEKRUL, S.; GRULA, E. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* v. 38, p. 335-344.
- SODERHALL, K.; SMITH, V. 1986. The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and role of its activation in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. In Brehelin M. Edit. Immunity in invertebrates: cell molecules and reference reactions. Berlin. Springer. p. 208-223.
- TORTUVA, A.; FUNKE, L. 1993. Introducción a la microbiología. Ed. Acibia. Madrid. p. 384.
- TRAVLAND, Y. 1979. Inicición of infection of mosquito larvae (*Cliseta inornata*) by *Coelomomyces psorophorae*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 33, p. 95-105.
- ULHOA, C.; PEBERDY, J. 1993. Effect of carbon sources on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Resear.* v. 97 no. 1, p. 45-48.
- VEY, A.; BOULETREAU, MN. 1975. Entomopathoga. v. 20, p. 337-351.
- _____; QUIOT, J.; VAGO, C. 1973. C.R. herd. séanc. Acad. Sci. Paris. D 271, p. 1489-2592.
- WOODBURY, W.; SPENCER, A.; STAHMAN, M. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catatalse isoenzymes. *Analyt Biochem.* v. 44, p. 301-305.
- YANAGITA, T. 1980. The formaldehyde resistance or *Aspergillus* fungi attacking silkworm larvae. *J. Seric. Sci. Jpn.* v. 49, p. 440-445.
- YINGCHUN, T.; EKRAMODOULLAN, A. 1991. Immunochemical characterization of the entomopathogenic fungus. *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 57, p. 269-276.
- ZACHARUK, R. 1971. *Can. J. Microbiol.* v. 17, p. 281-289.
- ZAYKINA, Y.; TIUNOVA, N.; BEZBORODOV, A. 1983. 1,3-beta glucanases of soil fungi and the conditions of their biosynthesis. *Mikrobiologiya.* v. 52 no. 6, p. 945-50.
- ZIKAKIS, T. 1989. Chitinolytic enzymes and their applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol. ACS Symp. Ser.* v. 389, p. 116-126.
- ZIZKA, J.; WEISER, J. 1993. Effect of beauvericin, a toxin metabolite of *Beauveria bassiana*, on the ultrastructure of *Culex pipiens autogenicus* larvae. *Cytobios.* v. 75, p. 13-19.