



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Química

**ENZIMAS FÚNGICAS INVOLUCRADAS EN EL CATABOLISMO
DE HIDROCARBUROS. SU APLICACIÓN A LA OPTIMIZACIÓN
DE BIOINSECTICIDAS**

Bioq. Nicolás Pedrini

Director: Dra. M. Patricia Juárez

Codirector: Dr. Lázaro F. R. Cafferata

TESIS DOCTORAL

2006



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Química

**ENZIMAS FÚNGICAS INVOLUCRADAS EN EL CATABOLISMO
DE HIDROCARBUROS. SU APLICACIÓN A LA OPTIMIZACIÓN
DE BIOINSECTICIDAS**

Bioq. Nicolás Pedrini

Director: Dra. M. Patricia Juárez

Codirector: Dr. Lázaro F. R. Cafferata

TESIS DOCTORAL

2006

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. M. Patricia Juárez y la codirección del Dr. Lázaro F. R. Cafferata.

A mis padres, a quienes les debo todo lo que soy.

A mi hermano.

Mi reconocimiento:

al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, en la persona de su antiguo Director, Dr. Rodolfo R. Brenner y de su actual Directora Dra. María J. Tacconi de Alaniz, por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas que me otorgaron oportunamente.

a las siguientes entidades que mediante los subsidios otorgados han financiado gran parte de este trabajo: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2000 08-09653 y PICT 2003 01-14174; Organización Mundial de la Salud, Programa especial para la investigación y entrenamiento en enfermedades tropicales (TDR) A20036; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, PIP 5172; Red Latinoamericana sobre Genética Poblacional y Control de Triatomíneos (ECLAT- Comunidad Europea).

Mi agradecimiento:

a la Dra. Patricia Juárez por la calidez, paciencia y gran dedicación con los que dirigiendo este trabajo moldeó mi pensamiento científico.

al Dr. Lázaro F. R. Cafferata quien en forma desinteresada aceptó codirigir esta tesis y facilitó las instalaciones del LADECOR para la realización de los experimentos de CGC-MS.

al Ing. Agr. Gustavo Dal Bello, por la provisión de la cepa Bb ARSEF 5500 y a la Ing. Agr. Susana B. Padín por la provisión de los insectos utilizados. A ambos por su gran ayuda en la realización de los bioensayos.

al Dr. Omar Rimoldi y al Bioq. Mauro Montanaro quienes me aconsejaron y me ayudaron de forma decisiva en la realización de los experimentos de biología molecular.

al Dr. Eugen S. Gander y todo su equipo del Laboratorio de Expresión Génica de EMBRAPA-Recursos Genéticos y Biotecnología, Brasilia, por haberme recibido y guiado en la pasantía que realicé en ese laboratorio.

a Laura Hernández, por su valiosa colaboración en los ensayos de electroforesis y purificación de proteínas.

a la Dra. Nora Eyler (Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro, Olavarría) y al Dr. Gary Blomquist (Department of Biochemistry, University of Reno, USA) por facilitar el uso de las respectivas instalaciones de espectrometría de masa.

a mis compañeros del Laboratorio 12 por haber compartido conmigo tantas horas de trabajo y ayudarme en muchos experimentos de esta tesis. Y por ser mis amigos.

a mis amigos Cultores del vino, por todas las reuniones testigos de buenas noticias.

a Ele, por quererme tanto. Porque como dicen que dijo San Pablo a los Corintios: sin amor no soy nada.

Hermana duda,
pasarán los años,
cambiarán las modas,
vendrán otras guerras,
perderán los mismos
y ojalá que tú
sigas teniéndome a tiro...

Jorge Drexler (2006)

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Manejo Integrado de Plagas. Control Microbiano.....	2
I.2. Generalidades de los hongos.....	3
I.3. Los hongos entomopatógenos.....	5
I.3.a. Aspectos históricos.....	5
I.3.b. Los hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano.....	6
I.3.c. <i>Beauveria bassiana</i>	6
I.3.c.1. Características generales.....	6
I.3.c.2. Clasificación taxonómica.....	7
I.3.d. Utilización de <i>B. bassiana</i> para el control de plagas de granos almacenados.....	8
I.4. Cutícula de insectos.....	9
I.4.a. Hidrocarburos epicuticulares de insecto.....	10
I.5. Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos.....	10
I.6. Interacción entre la cutícula de insectos y los hongos entomopatógenos.....	13
I.7. Bioquímica de la degradación de los componentes cuticulares por hongos entomopatógenos.....	16
I.7.a. Degradación de quitina y proteínas cuticulares.....	16
I.7.b. Degradación de hidrocarburos epicuticulares.....	18
I.7.b.1. Citocromo P450 monooxigenasas	19
I.7.b.1.i. Citocromo P450 monooxigenasas degradadoras de alcanos (P450alk).....	22
I.7.b.2. Catalasas	22
I.8. Mejoramiento genético de micoinsecticidas.....	24
CAPÍTULO II: OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	26
II.1. Objetivos generales.....	27
II.2. Objetivos específicos.....	27

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS.....	28
<i>A) Enzimas fúngicas involucradas en el catabolismo de hidrocarburos.....</i>	<i>29</i>
III.A.1. Solventes, reactivos, enzimas y oligonucleótidos utilizados.....	30
III.A.2. Kits comerciales empleados.....	30
III.A.3. Hongos entomopatógenos.....	31
III.A.4. Cultivo de microorganismos.....	31
III.A.4.a. <i>Beauveria bassiana</i>	31
III.A.4.b. <i>Escherichia coli</i>	32
III.A.5. Obtención de fracciones subcelulares fúngicas.....	32
III.A.6. Actividad de acil-CoA oxidasa.....	32
III.A.7. Actividad de catalasa.....	33
III.A.8. Purificación de catalasas.....	33
III.A.9. Caracterización de catalasas.....	34
III.A.9.a. Electroforesis.....	34
III.A.9.b. Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática.....	35
III.A.9.c. Propiedades catalíticas.....	35
III.A.10. Oxidación microsomal de hidrocarburos.....	35
III.A.11. Extracción de ARN.....	36
III.A.12. Obtención de ADNc.....	36
III.A.13. Amplificación de los ADNc por reacción en cadena de la polimerasa de larga distancia (LD-PCR).....	37
III.A.14. Software utilizado.....	38
III.A.15. Diseño de <i>primers</i>	38
III.A.16. Amplificación por PCR.....	40
III.A.17. Clonado de los segmentos génicos.....	41
III.A.18. Análisis de las secuencias.....	43
III.A.19. Expresión diferencial de los genes.....	43
III.A.19.a. <i>Northern blot</i>	43
III.A.19.b. PCR cuantitativa a tiempo real (RTi-PCR).....	44

<i>B) Interacción hongo entomopatógeno – cutícula del insecto hospedador.....</i>	<i>47</i>
III.B.1. Solventes, estándares y accesorios utilizados.....	48
III.B.2. Insectos.....	48
III.B.3. Análisis de lípidos de insecto.....	49
III.B.3.a. Extracción.....	49
III.B.3.b. Cromatografía en capa fina (TLC).....	49
III.B.4. Análisis de hidrocarburos de insecto.....	50
III.B.4.a. Extracción y purificación.....	50
III.B.4.b. Cromatografía en capa fina (TLC).....	50
III.B.4.c. Cromatografía gaseosa capilar (CGC).....	50
III.B.4.d. Cromatografía gaseosa capilar (CGC) acoplada a espectrometría de masa (MS).....	51
III.B.5. Bioensayos.....	52
III.B.6. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos por los insectos en presencia y ausencia de infección fúngica.....	52
III.B.6.a. Micro extracción en fase sólida (SPME) acoplada a CGC.....	52
III.B.7. Microscopía electrónica de barrido.....	54
III.B.8. Ensayo de zona de inhibición.....	55
CAPÍTULO IV: LOS RESULTADOS.....	56
<i>A) Enzimas fúngicas involucradas en el catabolismo de hidrocarburos.....</i>	<i>57</i>
<i>Estudios bioquímicos.....</i>	<i>58</i>
IV.A.1. Actividad acil-CoA oxidasa.....	58
IV.A.2. Actividad catalasa.....	58
IV.A.3. Purificación de catalasas.....	59
IV.A.4. Caracterización de catalasas.....	60
IV.A.5. Oxidación microsomal de hidrocarburos.....	62

<i>Estudios moleculares</i>	63
IV.A.6. Extracción de ARN.....	63
IV.A.7. Obtención de ADNc.....	63
IV.A.8. PCR.....	64
IV.A.9. Clonado.....	65
IV.A.10. Secuencias.....	66
IV.A.11. Análisis de las secuencias.....	67
IV.A.12. Expresión diferencial.....	75
 B) <i>Interacción hongo entomopatógeno – cutícula del insecto hospedador</i>	78
 IV.B.1. Análisis de lípidos de insecto.....	79
IV.B.2. Análisis de hidrocarburos de insecto.....	80
IV.B.3. Bioensayos.....	87
IV.B.4. Microscopía electrónica de barrido.....	91
IV.B.5. Efecto de la infección fúngica sobre la liberación de compuestos orgánicos volátiles por <i>Ulomoides dermestoides</i>	91
IV.B.6. Efecto de las sustancias volátiles de tenebriónidos sobre el crecimiento fúngico.....	94
 CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	97
 V.1. Enzimas fúngicas involucradas en la degradación de componentes cuticulares.....	98
V.1.a. Caracterización bioquímica y rol de las catalasas en la degradación de hidrocarburos.....	98
V.1.b. Enzimas pertenecientes a la fase I de oxidación: Citocromo P450 monooxigenasas y epóxido hidrolasa.....	99
V.1.b.1. Expresión diferencial.....	101
V.2. Hidrocarburos cuticulares y secreciones volátiles de insectos plaga de granos almacenados.....	104

V.3. Mejoramiento de micoinsecticidas.....	108
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES DEL TRABAJO.....	113
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	116
APÉNDICE.....	135

TABLAS

Tabla I.1: Hidrocarburos epicuticulares de insecto y susceptibilidad a los hongos entomopatógenos.....	14-16
Tabla III.A.1: Citocromos P450alk de levaduras empleadas para el diseño de <i>primers</i> degenerados.....	37
Tabla III.A.2: Secuencias de los <i>primers</i> degenerados diseñados con el algoritmo CODEHOP.....	40
Tabla III.A.3: Secuencias de los <i>primers</i> específicos diseñados con el programa Gene Runner.....	40
Tabla III.A.4: Secuencias de los <i>primers</i> utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real.....	45
Tabla IV.A.1: Purificación de catalasas de <i>Beauveria bassiana</i>	59
Tabla IV.B.1: Composición porcentual de los hidrocarburos de <i>Acanthoscelides obtectus</i>	83/84
Tabla IV.B.2: Composición porcentual de los hidrocarburos epicuticulares de <i>Ulomoides dermestoides</i>	86/87
Tabla IV.B.3: Cuantificación de las secreciones volátiles emitidas por <i>Ulomoides dermestoides</i> en presencia y ausencia de infección fúngica.....	93
Tabla IV.B.4: Radios de inhibición del crecimiento de Bb GHA en medio agarizado completo en presencia de extractos lipídicos epicuticulares de <i>U. dermestoides</i> y <i>T. castaneum</i> y solución de 1,4-benzoquinona.....	96

FIGURAS

Figura I.1: <i>Beauveria bassiana</i> crecida en placa de Petri conteniendo medio de cultivo completo y esquema del conidióforo.....	7
Figura I.2: Diagrama de un corte transversal del integumento de insectos, donde se ilustran las capas principales de la cutícula.....	9
Figura I.3: Ruta metabólica propuesta para la degradación de	

	hidrocarburos por <i>Beauveria bassiana</i>	19
Figura I.4:	Esquema del traspaso de electrones desde el NADPH a la citocromo P450, catalizado por la enzima de membrana microsomal NADPH citocromo P450 reductasa.....	20
Figura I.5:	Mecanismo de reacción de la citocromo P450.....	20
Figura III.A.1:	Esquema del método de obtención de ADNc de doble cadena utilizando la estrategia SMART.....	37
Figura III.A.2:	Mapa de restricción del plásmido pGEM® Easy utilizado para el clonado de los productos de PCR.....	41
Figura III.A.3:	Esquema del clonado de productos de PCR.....	42
Figura III.B.1:	Ejemplares adultos de <i>Acanthoscelides obtectus</i> y <i>Ulomoides dermestoides</i>	49
Figura III.B.2:	Fotografía del dispositivo (holder) para análisis de micro extracción en fase sólida (SPME).....	53
Figura IV.A.1:	Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad catalasa en las fracciones peroxisomal y citosólica de <i>Beauveria bassiana</i>	58
Figura IV.A.2:	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las catalasas purificadas de <i>Beauveria bassiana</i>	60
Figura IV.A.3:	Efecto del pH, temperatura, concentración de sustrato y 3-amino-1,2,4 triazol (3-AT) sobre la actividad de las catalasas purificadas de <i>Beauveria bassiana</i>	61
Figura IV.A.4:	Oxidación del [¹⁴ C] <i>n</i> -hexadecano por proteínas microsomales.....	62
Figura IV.A.5:	ARN total de <i>Beauveria bassiana</i> y ADNc sintetizado a partir de éste.....	64
Figura IV.A.6:	Geles de agarosa 1% de los fragmentos amplificados por PCR.....	65
Figura IV.A.7:	Geles de agarosa 1 % de los segmentos amplificados y clonados en pGEM T, luego de cortar con Eco RI.....	66
Figura IV.A.8:	Alineamiento entre la secuencias obtenidas con los primers AJf/AJr y CNf/CNr y las que se utilizaron para diseñar los respectivos primers	68/69
Figura IV.A.9:	Análisis filogenético de la familia CYP53 donde	

se incluye a la secuencia clonada de <i>B. bassiana</i>	71
Figura IV.A.10: Comparación entre la secuencia clonada de <i>Beauveria bassiana</i> (P450C1/E-1) y las secuencias de ADNc de los miembros de la familia <i>CYP53</i>	72/73
Figura IV.A.11: Alineamiento entre la secuencia P450C1/E-1 de <i>Beauveria bassiana</i> y el gen <i>CYP53A1</i> de <i>Aspergillus niger</i> (GenBank X52521).....	74
Figura IV.A.12: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR amplificados a partir de ADNc con los <i>primers</i> indicados.....	75
Figura IV.A.13: Curvas de RTi-PCR (unidades de fluorescencia vs. número de ciclos) y curvas estándar (Ct vs. log transcriptos iniciales (pg)) para los genes 18S y EH.....	76
Figura IV.A.14: Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los genes <i>53like</i> , P450 y EH de <i>Beauveria bassiana</i>	77
Figura IV.B.1: Cromatografía en capa fina de los lípidos totales de <i>Ulomoides dermestoides</i> y <i>Acanthoscelides obtectus</i>	79
Figura IV.B.2: Cromatografía en capa fina de los hidrocarburos epicuticulares de <i>Acanthoscelides obtectus</i> y <i>Ulomoides dermestoides</i>	80
Figura IV.B.3: Perfil cromatográfico de los hidrocarburos epicuticulares de <i>Acanthoscelides obtectus</i>	82
Figura IV.B.4: Perfil cromatográfico de los hidrocarburos epicuticulares de <i>Ulomoides dermestoides</i>	85
Figura IV.B.5: Ejemplares adultos de <i>A. obtectus</i> y <i>U. dermestoides</i> muertos por <i>B. bassiana</i>	87
Figura IV.B.6: Porcentajes de mortalidad de <i>Acanthoscelides obtectus</i> y <i>Ryzopertha dominica</i> tratados con <i>B. bassiana</i> cepa Bb ARSEF 5500.....	89
Figura IV.B.7: Porcentajes de mortalidad de <i>Acanthoscelides obtectus</i> y <i>Ulomoides dermestoides</i> tratados con Bb GHA.....	90
Figura IV.B.8: Microscopía electrónica de barrido de <i>B. bassiana</i> GHA sobre cutícula de <i>A. obtectus</i>	92

Figura IV.B.9: Perfil de SPME-CGC de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos por <i>Ulomoides dermestoides</i>	93
Figura IV.B.10: Ensayo de inhibición del crecimiento de Bb GHA en placas de Petri conteniendo medio agarizado completo.....	95

ABREVIATURAS

3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
BQ	benzoquinona
C15:1	1-pentadeceno
CGC	cromatografía gaseosa capilar
cpm	cuentas por minuto
Ct	ciclo umbral
CYP	genes codificantes para citocromo P450
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DTE	ditioeritritol
DTT	ditiotreitol
DVB	divinil benceno
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EH	epóxido hidrolasa
EST	<i>expressed sequence tag</i> (identificador de una secuencia expresada)
FAD	flavina adenina dinucleótido
FMN	flavina mononucleótido
FID	detector de ionización por llama
HC	hidrocarburos
HPTLC	cromatografía en placa fina de alta resolución
HQ	hidrobenzoquinona
IK	índice de Kovats
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopirano
LD-PCR	reacción en cadena de la polimerasa de larga distancia
LB	medio Luria-Bertani
MC	medio completo
MIP	manejo integrado de plagas
MM	medio mínimo
MS	espectrometría de masa
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

<i>n</i> -C16	<i>n</i> -hexadecano
<i>n</i> -C28	<i>n</i> -octacosano
P450	citocromo P450 monooxigenasa
P450alk	citocromo P450 monooxigenasa degradadora de alcanos
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDMS	polidimetil siloxano
PMSF	fluoruro de fenilmetil sulfonilo
RTi-PCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
SDS	dodecil sulfato de sodio
SPME	microextracción en fase sólida
SSC	buffer cloruro de sodio-citrato de sodio
TD	tierra de diatomeas
TLC	cromatografía en placa fina
TLM	tiempo letal medio
VOC	compuestos orgánicos volátiles
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I.1. Manejo Integrado de Plagas. Control Microbiano

El cultivo y explotación de cereales constituye uno de los principales soportes de la economía de nuestro país, cuyo éxito está relacionado estrechamente con la preservación de la calidad del producto durante el transporte y almacenamiento. Anualmente, según estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), entre 10 y 30% de la producción agrícola mundial se pierde durante la última etapa de la comercialización por la acción de las plagas insectiles. Además de la pérdida de peso de los granos, estas plagas facilitan la infección fúngica secundaria, con la consecuente reducción en la calidad, propiedades nutricionales, valor comercial y viabilidad de las semillas. Un riesgo adicional a la severidad de los daños mencionados es la aparición de poblaciones de insectos resistentes a los insecticidas químico-sintéticos, utilizados masivamente en los depósitos de granos. Toda estrategia tendiente a contrarrestar la incidencia de los insectos perjudiciales se reflejará en un incremento en el rendimiento de las cosechas.

En la agricultura convencional el control químico ha sido el método más difundido, con las consecuencias negativas que su empleo produce sobre el hombre y el medio ambiente. En la actualidad, la tendencia es utilizar productos químicos más selectivos, menos tóxicos, aplicándolos en dosis mínimas y complementándolos con otras estrategias de control ecológicamente aceptables. Este sistema alternativo al uso excluyente de pesticidas se denomina "manejo integrado de plagas" (MIP). Entre sus tácticas se destaca el control biológico, basado en el empleo de bioplaguicidas: productos derivados de animales, plantas y microorganismos (entomopatógenos) para prevenir, repeler, eliminar o reducir los daños causados por las plagas (Lecuona, 1996).

El empleo de entomopatógenos constituye el control microbiano, una rama del control biológico. Los microorganismos más utilizados son bacterias, hongos, virus y nematodos (Roberts, 1989; Lecuona, 1996). El 80 % de las enfermedades de los insectos son micosis, por lo cual las especies fúngicas representan al grupo principal de entomopatógenos. Las ventajas de los agentes de control biológico, comparados con los insecticidas químicos, consisten en que no contaminan el ambiente ni son tóxicos para el hombre, así como su extremadamente baja probabilidad de generar

resistencia entre los insectos. Además, al multiplicarse y dispersarse dentro del agroecosistema, se puede lograr un efecto a largo plazo una vez que logran introducirse y colonizar el mismo. La variada especificidad de hospedadores hace posible que se puedan seleccionar cepas que presenten selectividad o baja mortalidad para otros enemigos naturales como parasitoides o predadores. En ciertos casos, el microorganismo no ocasiona la muerte directa del insecto pero provoca alteraciones en su ciclo biológico, tales como la disminución de su capacidad de oviposición o el aumento de la sensibilidad a otros agentes de control. Las desventajas del control microbiano son menos que las ventajas, aunque importantes desde el punto de vista operativo. En este sentido, el tiempo requerido para producir el efecto insecticida es mucho mayor que en el caso de los pesticidas químicos, que tienen un efecto de "volteo" rápido. En el caso de los hongos entomopatógenos este tiempo varía entre algunos días o semanas, dependiendo de la dosis usada y la virulencia de la cepa (Roberts, 1989). Otro aspecto importante es que al tratarse de organismos vivos, son sensibles a las condiciones climáticas (temperatura, humedad relativa, luminosidad, etc.) y requieren mayores cuidados durante el almacenamiento para evitar pérdidas de su patogenicidad o disminución de su virulencia. Algunos de estos inconvenientes pueden ser superados optimizando el tipo de formulación mediante la incorporación de protectores, medios de vehiculización y emulsionantes que garanticen la estabilidad y viabilidad del producto (Wraight et al., 2001). Es por esto que para un resultado exitoso, no es suficiente la detección y aplicación de cepas virulentas, sino que es esencial utilizar herramientas biotecnológicas que optimicen su funcionamiento.

1.2. Generalidades de los hongos

Los hongos pueden definirse como organismos eucarióticos, aclorófilos, con nutrición heterófila y/o absorptiva, saprófitos, parásitos o simbioses, de distribución cosmopolita (Alexopoulos et al., 1996). Son organismos provistos, al menos durante la fase de reproducción, de una pared celular de quitina y/o celulosa.

El cuerpo fúngico se denomina talo o micelio, no presenta diferenciación de tejidos ni órganos verdaderos, y es generalmente inmóvil. Está conformado por

estructuras plasmodiales, ameboidales, pseudoameboidales, unicelulares o multicelulares filamentosas. El micelio puede ser septado o no septado (cenocítico), uninucleado, binucleado o multinucleado con núcleos genéticamente idénticos (homocarióticos) o distintos (heterocarióticos), haploides, dicarióticos (con dos núcleos haploides diferentes), o diploides. De acuerdo a su función, el micelio puede ser vegetativo o reproductivo. La fase vegetativa es la primera fase del desarrollo, crece con estructuras filamentosas llamadas hifas, células levaduriformes u otras unidades vegetativas. Este micelio cumple con las funciones de nutrición, sostén, propagación y resistencia. En una segunda fase del desarrollo se origina el micelio reproductivo a partir del anterior, con la función de generar hifas fértiles, importantes en la reproducción sexual, asexual o parasexual del hongo. Los hongos de los cuales se desconoce su fase sexual (teleomorfos) se incluyen taxonómicamente dentro de un grupo artificial denominado imperfectos o mitosporicos: los Fungi Imperfecti (antes denominados Deuteromycetes), al que pertenecen la mayoría de las especies fúngicas utilizadas en biocontrol. La mayoría de estos hongos contienen estructuras fúngicas similares a las descritas en el estado asexual de los Ascomycetes, por lo que podrían considerarse pertenecientes a este grupo pero con una fase sexual que no ha evolucionado o que aún no ha sido descubierta. Los Deuteromycetes se multiplican a través de propágulos (fragmentos miceliales) y esporas de origen asexual (conidios, blastosporas y clamidosporas).

Los conidios son células que se generan en hifas especializadas denominadas conidióforos. Los conidióforos pueden formarse a partir de hifas somáticas sin ninguna organización evidente o bien pueden organizarse en cuerpos fructíferos definidos (conidiomas). Estas esporas son estructuras sin movimiento propio que intervienen en la propagación de los hongos por aire, agua, animales, etc. Tienen un nivel metabólico bajo y se producen como respuesta primaria al deterioro físico y químico del ambiente. Presentan una pared celular cuya composición físico-química proporciona al protoplasma protección contra varios factores de estrés ambiental como la radiación ultravioleta, lisis enzimática, solventes orgánicos, compuestos tóxicos y desecación. La misma se compone principalmente de quitina, glucanos, proteínas y glicoproteínas. La superficie de los conidios contiene una capa rica en proteínas hidrofóbicas (Boucias y Pendland, 1991). Las hidrofobinas constituyen un grupo importante de estas proteínas,

que incrementan la resistencia de los conidios a la desecación, e intervienen en los procesos de adhesión de las estructuras fúngicas a las superficies hidrofóbicas (Bidochka et al., 1995).

Las blastosporas son células de composición similar a los conidios que se desarrollan por gemación del micelio en medios sumergidos (hemocele de insectos, medios de cultivo líquidos). Son de mayor tamaño, de pared celular más delgada y con menor resistencia y viabilidad que los conidios (Boucias et al., 1988).

Las clamidosporas son estructuras de resistencia, formadas por hinchazón y engrosamiento de pequeñas células independientes ante condiciones ambientales adversas, como escasez de nutrientes, agua o temperaturas desfavorables para el desarrollo fúngico (Boucias et al., 1988). Están protegidas por una pared gruesa que contiene un citoplasma muy concentrado y según su posición en el micelio pueden ser apicales o intercalares.

I.3. Los hongos entomopatógenos

I.3.a. Aspectos históricos

Si bien las enfermedades en los insectos han sido observadas desde tiempos remotos (aproximadamente 2.700 a.C.), el inicio en forma sistemática del estudio de la patología de insectos puede remontarse al año 1835 en la ciudad italiana de Lodi, donde Agostino Bassi describió una enfermedad en el gusano de la seda provocada por el hongo conocido actualmente como *Beauveria bassiana*. En 1870 Louis Pasteur, estudiando una enfermedad en este mismo gusano producida por un protozoario, sugirió emplear las enfermedades en los insectos útiles como medidas de control en los insectos plaga. Poco tiempo después se publicó el primer trabajo formal proponiendo el control microbiano (LeConte, 1874). A finales del siglo XIX, el ucraniano Metchnikoff produjo por primera vez a gran escala el hongo *Metarhizium anisopliae*, utilizando como sustrato el mosto estéril preparado para la elaboración de la cerveza (Metchnikoff, 1921). Por razones no bien establecidas, a pesar de obtener altos rendimientos (55 kg de conidios en los primeros 4 meses de producción) y mortalidades del 55-80% contra el gorgojo de la remolacha azucarera en ensayos a

campo, su trabajo fue interrumpido. Sin embargo, sentó las bases para que en todo el mundo se comience a ensayar o recomendar el uso de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga (Lord, 2005a).

I.3.b. Los hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano

Los hongos entomopatógenos han sido exitosamente utilizados como enemigos naturales de varias especies de artrópodos (insectos y ácaros). La extensa lista de hospedadores incluye moscas, mosquitos, saltamontes, termitas, escarabajos, gorgojos, chinches, hormigas y mariposas. Entre las 750 especies de hongos patógenos de insectos conocidos, los más usados en estrategias de control biológico son Deuteromycetes debido a que poseen ciclo de vida simple, se producen a gran escala con relativa facilidad y poseen un amplio rango de insectos hospedadores (Charnley, 1991; Lacey et al., 2001). En los últimos años se ha producido un gran progreso en el mercado de los micoinsecticidas, actualmente existen más de 30 productos registrados o en vías de registrarse en todo el mundo (Wraight et al., 2001). Los principales productos desarrollados fueron Mycotrol®-GH OF, basado en conidios de *B. bassiana* cepa GH producido por Mycotech (Wraight y Carruthers, 1999) y Green Muscle®, basado en conidios de *M. anisopliae* var. *acridum* cepa IMI 330189 desarrollado por el proyecto LUBILOSA (LUtte Biologique contre les LOcustes et les SAuteriaux) para el control de langostas y saltamontes (Lomer et al., 1999; 2001).

I.3.c. *Beauveria bassiana*

I.3.c.1. Características generales

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin por su amplia distribución y rango de hospedantes, es la especie más utilizada entre los hongos entomopatógenos. En medios de cultivo agarizados desarrolla colonias blancas y algodonosas en forma rampante que pueden presentar un pigmento amarillo-anaranjado en el reverso de las colonias maduras (Fig. I.1A). Al microscopio óptico presentan un micelio ramificado y septado con conidiogénesis acrópeta (el conidio más joven en posición apical). Los

conidióforos tienen forma de botella con una parte basal globosa que genera un eje de crecimiento en zig-zag con los conidios ubicados en los vértices (Fig. 1.1B). Los conidios son hialinos, no pigmentados, esféricos y miden entre 1 y 5 μm (microconidios) (Hodge, 2003).

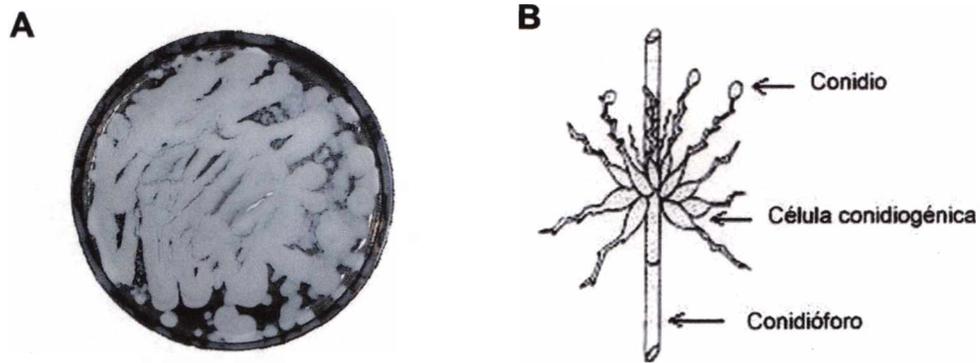


Figura 1.1: (A) *Beauveria bassiana* crecida en placa de Petri conteniendo medio de cultivo completo. (B) esquema del conidióforo (modificado de Lecuona, 1996).

Cuando crece sobre insectos u otros organismos vivos, desarrolla colonias que emergen de sus huéspedes generando manojos hifales blancos, aéreos y pulverulentos. Estas estructuras cubren completamente, a manera de manto blanco, a sus huéspedes; por lo que se denomina a la enfermedad muscardina blanca.

I.3.c.2. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *Beauveria bassiana*

Clasificación basada en Hodge (2003). El potencial estado perfecto o teleomorfo de *B. bassiana* ha sido recientemente identificado en China como *Cordyceps bassiana* Z.Z. Li, C.R. Li, B. Huang & M.Z. Fan (Huang et al., 2002).

I.3.d. Utilización de *B. bassiana* para el control de plagas de granos almacenados

La capacidad insecticida de *B. bassiana* ha sido demostrada sobre diferentes coleópteros plaga de granos almacenados (Adane et al., 1996; Padín et al., 1997; 2002; Hidalgo et al., 1998; Moino et al., 1998; Smith et al., 1998; Rice y Cogburn, 1999; Dal Bello et al., 2001; Crespo et al., 2002), siendo uno de los potenciales candidatos para el control biológico en este sector donde es evidente la necesidad de reducir la aplicación de pesticidas químicos a su mínima expresión. En este sentido, un formulado en polvo basado en conidios de *B. bassiana* llamado Boverosil fue registrado en la ex Checoslovaquia para el control de infestación residual de insectos plaga en depósitos de granos y silos (Brower et al., 1995). En la mayoría de los casos la infestación en depósitos de granos es mixta (involucra simultáneamente a varias especies de insectos), por lo que la selección de una cepa virulenta que pueda ser efectiva contra todos ellos es un prerrequisito esencial para el desarrollo de un programa de control microbiano en granos almacenados. Debido al inconveniente que muchas veces esto acarrea, las tendencias actuales del MIP se orientan al uso combinado de hongos entomopatógenos con otros productos naturales, como aceites esenciales derivados de plantas (Akbar et al., 2005) o tierras de diatomeas (TD) (Lord, 2001; 2005b). En este sentido, la reciente detección de depósitos de diatomitas locales en las cercanías de la localidad de Ingeniero Jaccobaci (Provincia de Río Negro) con capacidad insecticida, tanto en forma individual como combinadas con *B. bassiana* (Dal Bello et al., 2006), abre un importante campo de aplicación de este producto en el país. Hasta el momento, la totalidad de las TD usadas como bioplaguicidas se importan con un alto valor agregado.

I.4. Cutícula de insectos

Los insecticidas de contacto, sean químicos, físicos o biológicos, encuentran en la cutícula del insecto blanco la primera barrera a la penetración. La misma está formada por varias capas, de afuera hacia adentro: la epicutícula, la procutícula y la epidermis (Fig. 1.2). La epicutícula es muy fina (0,1-3 μm) y está constituida por varias laminas, cada una de las cuales posee diferente estructura y propiedades químicas (Juárez y Calderón Fernández, 2006).

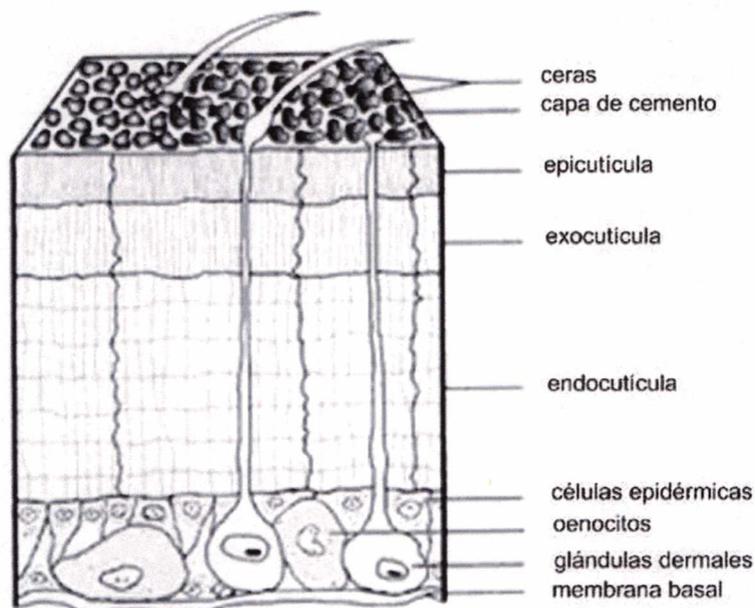


Figura 1.2: Diagrama de un corte transversal del integumento de insectos, donde se ilustran las capas principales de la cutícula. Modificado de Nation (2002).

Si bien los componentes mayoritarios de la cutícula son proteínas y quitina (constituida por cadenas organizadas de N-glucosamina), la superficie más externa de la epicutícula está compuesta de una mezcla compleja de lípidos no polares. Predominan hidrocarburos alifáticos (HC) lineales y ramificados de muy largas cadenas (entre 20 y 40 átomos de carbono), alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres de variadas estructuras (Blomquist y Jackson, 1979; Blomquist y Dillwith, 1985; Blomquist et al. 1987; Lockey, 1988; Nelson y Blomquist, 1995). Su principal función es restringir la pérdida de agua, controlar la absorción de sustancias

químicas, la actividad de microorganismos y actuar en procesos de comunicación química (Blomquist et al., 1987; Juárez, 1994). Los lípidos cuticulares de insectos participan en muchos procesos dentro del campo de la comunicación química inter o intra especies (Howard, 1993; Blomquist, 2003). Dada la carencia de grupos reactivos y la alta estabilidad de los HC de insecto, se les atribuye un rol fundamental dentro de las propiedades de barrera de la cutícula antes mencionadas.

I.4.a. Hidrocarburos epicuticulares de insecto

Los HC son los constituyentes epicuticulares más ampliamente estudiados, se encuentran en todos los órdenes de insectos y en muchos casos es la fracción lipídica mayoritaria (Blomquist y Dillwith, 1985). Los *n*-alcanos se encuentran en casi la totalidad de los más de 100 órdenes analizados (Blomquist et al., 1987; Lockey, 1988; Nelson y Blomquist, 1995), representando más del 90% en algunos coleópteros (Baker et al., 1979; Lockey, 1985). La longitud de cadena oscila entre 21 y 35 átomos de carbono, predominando las cadenas impares. Los *n*-alquenos predominan fundamentalmente en los órdenes Coleoptera y Diptera, se encuentran como mezclas de isómeros y la posición del doble enlace es variable (Baker et al., 1979; Nelson et al., 1981; Caputo et al., 2005). Los HC poliinsaturados son más raros, aunque los dienos de 33, 35 y 37 átomos de carbono son los componentes mayoritarios en el gorgojo del arroz *Sitophilus* sp. (Baker et al., 1984). Los HC metil ramificados son característicos de insectos, siendo los mono y dimetil ramificados los más abundantes; mientras que los tri y tetrametil derivados se encuentran en cantidades importantes solo en la mosca tsetse y en algunos triatomíneos (Nelson and Carlson, 1986; Nelson et al., 1988; Juárez y Blomquist, 1993; Juárez et al., 2001; Juárez y Calderón Fernández, 2006).

I.5. Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos

La infección fúngica comienza por la germinación de conidios sobre la superficie cuticular del insecto blanco que cumple una función dual: sirve de sustrato para la adhesión de los conidios y también provee las señales químicas para la

producción de propágulos (Fargues, 1984). Previa a la penetración es necesario que el hongo se adhiera a la superficie cuticular. Esta etapa es crítica para la supervivencia del hongo, ya que pueden ocurrir procesos de desecación, fotodegradación, antibiosis, etc. Las etapas mediante las cuales se produce la infección fúngica son:

Adsorción de los hongos a la superficie cuticular

Se produce por interacciones inespecíficas de carácter físico-químico, principalmente hidrofóbicas, entre los lípidos cuticulares y las hidrofobinas fúngicas. Esta etapa es totalmente pasiva y no implica la liberación de sustancias por parte del hongo (Boucias y Latgé, 1988).

Adhesión o consolidación de la interfase entre los hongos y la cutícula

Es un proceso activo que requiere un estímulo específico del hospedador (Fargues, 1984) e implica la secreción de sustancias adhesivas fúngicas (mucílagos, envolturas, glicoproteínas, matrices) o alguna modificación en la cutícula producida por el hongo que genere una predigestión de esta capa con liberación de elementos de nutrición. Estos mecanismos degradativos iniciales son realizados por diversas enzimas como lipasas, quitinasas, proteasas y esterases localizadas en gránulos del extremo apical de los conidios previos a la formación del apresorio (Ratault y Vey, 1977; St Leger et al., 1986a).

Germinación del hongo y crecimiento en la superficie cuticular del insecto

Cuando las condiciones en el microambiente son apropiadas (alrededor del 90% de humedad), los conidios aumentan su tamaño y forman una o varias evaginaciones que se prolongan hasta generar tubos germinales. A partir de estas estructuras hifales, pueden originarse hifas laterales cortas y especializadas como órganos de fijación que se denominan apresorios. Estas estructuras proporcionan al hongo una sujeción mecánica frente a fuerzas opuestas generadas por las condiciones ambientales adversas, proporcionando el tiempo necesario para que ocurra la penetración. En la mayoría de los Deuteromycetes patógenos la producción del apresorio ocurre conjuntamente con la secreción de sustancias viscosas mucilaginosas.

La germinación y el crecimiento del hongo son etapas que generan estructuras muy vulnerables de rápido desarrollo y gran colonización del ambiente que requieren de nutrientes exógenos como glucosa, N-acetilglucosamina, glucosamina, quitina, almidón y/o ácidos grasos (Smith y Grula, 1981; Ferron, 1985) que se encuentran en la superficie cuticular del insecto. Los lípidos cuticulares podrían afectar los procesos de germinación y de formación de apresorios, influyendo de ese modo en el proceso de consolidación del propágulo en la cutícula (Boucias y Latgé, 1988; Lecuona et al., 1997).

Penetración del hongo al insecto huésped

La penetración de hongos entomopatógenos a través de la cutícula de su insecto hospedador ocurre tanto por presión mecánica como por degradación enzimática de sus componentes. Una gran variedad de enzimas fúngicas extracelulares, principalmente proteasas, quitinasas y quitosanas han sido caracterizadas y sus mecanismos de regulación ampliamente estudiados (St. Leger et al., 1986a; 1988; 1993). Sin embargo, es escasa la información acerca de las enzimas intracelulares involucradas en este proceso.

Crecimiento en hemocele

En el interior del insecto se desarrollan cuerpos hifales de tipo levaduriforme, principalmente blastosporos que se multiplican por gemación, evitando de esta manera la reacción inmunitaria del huésped ya que no presentan los componentes antigénicos propios de la pared celular. Recientemente se ha reportado que a los pocos minutos de su entrada al hemocele, los cuerpos hifales expresan una proteína con dominios característicos del colágeno, que protege a los blastosporos del ataque de los hemocitos de insecto (Wang y St. Leger, 2006).

Producción de metabolitos/toxinas fúngicos

Las toxinas cumplen un rol importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. Si bien estos compuestos no serían los responsables directos de la muerte del insecto huésped, ésta ocurre más rápidamente cuando el hongo las sintetiza. Son metabolitos secundarios de bajo molecular, principalmente péptidos

cíclicos con propiedades de antibióticos o insecticidas, como por ejemplo dextrusina en *M. anisopliae* (Roberts et al., 1992), beauvericina y bassianolida en *B. bassiana* (Vey et al., 2001), como así también toxinas proteicas de alto peso molecular como la bassiacridina (Quesada-Moraga y Vey, 2004).

Muerte del insecto

El principal órgano blanco dentro del huésped es el intestino, que es invadido por el hongo desde el hemocele. Esto produce una parálisis con interrupción de la alimentación y la consecuente pérdida de peso. También ocurren cambios de comportamiento en el insecto como temblores, alteraciones de coordinación y elevación corporal generando una postura rígida. Luego deviene la muerte y colonización saprofitica del hongo momificando al hospedador (Ferron, 1985). Finalmente, el crecimiento fúngico produce un agotamiento de los nutrientes y por lo tanto un estrés alimenticio con generación de estructuras de resistencia y disseminación, los conidios. Estos pueden ser dispersados por el viento, el agua, u otro mecanismo pasivo, e infectar a otros insectos cuando las condiciones de temperatura y humedad sean favorables. Asimismo los insectos infectados pueden desplazarse antes de morir trasladando el patógeno a distintas regiones.

I.6. Interacción entre la cutícula de insectos y los hongos entomopatógenos

Según se desprende de la lectura del ítem I.4, la cutícula juega un papel protector fundamental ante la presencia de insecticidas de contacto. Más aún, la alteración en la composición lipídica cuticular hace a los insectos más susceptibles a su ataque (Juárez, 1994). Esta composición también es clave en la etapa de adhesión de los conidios a la epicutícula, y sería un factor de gran importancia en el éxito de la infección fúngica. La composición de los HC epicuticulares de insectos susceptibles a hongos entomopatógenos se ajusta a la descrita previamente, con predominio de cadenas saturadas lineales y ramificadas (Pedrini et al., 2006). Contrariamente, una baja susceptibilidad fúngica coincide con la presencia de hidrocarburos insaturados en *Sitophilus oryzae*, lípidos de corta cadena en el hemíptero *Nezara viridula* o los áfidos;

así como la de derivados de quinonas es sus secreciones volátiles, como es el caso de *Tribolium castaneum* o la cucaracha *Blatella germanica*. En la Tabla I.1 se resume la relación entre de los HC mayoritarios de algunos insectos y su susceptibilidad a los hongos entomopatógenos.

Tabla I.1: Hidrocarburos epicuticulares de insecto y susceptibilidad a los hongos entomopatógenos.

Insecto	Hidrocarburos epicuticulares ^a			Referencia	Susceptibilidad a los hongos ^b	Referencia
	<i>n</i> -alcanos	metil-alcanos	<i>n</i> -alquenos			
Coleoptera						
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	++++	+	+	Nelson et al., 2003	si	Fargues et al., 1994
<i>Rhyzopertha dominica</i>	++++	++	-	Howard y Liang, 1993	si	Lord, 2001
<i>Sitophilus oryzae</i>	++	+	++++	Baker et al., 1984	si/no	Dal Bello et al., 2006
<i>Tenebrio monitor</i>	+++	++	++	Lockey, 1978	si	Wang et al., 2002
<i>Tribolium castaneum</i>	+	+	++++	Baker et al., 1978	no	Akbar et al., 2004
Dictyoptera						
<i>Blatella germanica</i>	++	+++	-	Augustynowicz et al., 1987	si/no	Zurek et al., 2002
Diptera						
<i>Aedes aegypti</i>	+++	++	+	Horne y Priestman, 2002	si	Scholte et al., 2004
<i>Anopheles gambiae</i>	+++	++	+	Caputo et al., 2005	si	Scholte et al., 2004

<i>Glossina morsitans</i>	-	++++	+	Nelson y Carlson, 1986	si	Kaaya, 1989
<i>Musca domestica</i>	+++	+++	+	Nelson et al., 1981	si	Lecuona et al., 2005
Hemiptera						
<i>Nezara viridula</i>	++++	-	-	Sosa- Gómez et al., 1997	no	Sosa- Gómez et al., 1993
<i>Rhodnius prolixus</i>	+++	+++	-	Juárez et al., 2001	si	Romaña y Fargues, 1992
<i>Triatoma infestans</i>	+++	+++	-	Juárez y Blomquist, 1993	si	Luz et al., 1998
<i>T. sordida</i>	+++	+++	-	Juárez y Calderón F., no publicado	si	Luz et al., 2004
<i>T. dimidiata</i>	+++	+++	-	Calderón F. et al., 2005	si	Hernández Salas, 2000
Homoptera						
<i>Brevicoryne brassicae</i>	+++	++	-	Szafranek et al., 2001	no	Lindquist, 1996
<i>Hyalopterus pruna</i>	+++	++	-	Szafranek et al., 2001	no	Lindquist, 1996
<i>Sitobion avenae</i>	+++	+	-	Hebanowska et al., 1989	no	Lindquist, 1996
Hymenoptera						
<i>Solenopsis invicta</i>	++	++	+	Nelson et al., 1980	si	Pereira et al., 1993
Isoptera						
<i>Coptotermes</i>	++++	+	-	Haverty et	si	Sun et al.,

<i>formosanus</i>				al., 1996		2003
Lepidoptera						
<i>Diatraea</i>	+++	++	-	Juárez, no publicado	si	Lecuona et al., 1996
<i>saccharalis</i>				Nelson et al., 1971	si	Samuels et al., 1988
<i>Manduca sexta</i>	++++	++	-	Lecuona et al., 1991	si	Bing y Lewis, 1991
<i>Ostrinia nubilalis</i>	++	+++	-	Jurenka y Subchev, 2000	si	Hajek, 1999
<i>Lymantria dispar</i>	++++	++	-			
Orthoptera						
<i>Locusta migratoria</i>	+++	++	-	Lockey, 1976	si	Lomer et al., 1997
<i>Melanoplus sanguinipes</i>	++++	++	-	Soliday et al., 1974	si	Lomer et al., 2001
<i>Schistocerca gregaria</i>	+++	++	-	Lockey, 1976	si	Bateman et al., 1996

^a Composición de hidrocarburos: -, trazas/ausente; +, < 10 %; ++, 10-40 %; +++, 40-70%; +++++, > 70 %.

^b El grado de susceptibilidad a los hongos se definió como: si, > 50% de mortalidad; si/no, 20 - 50% de mortalidad; no, < 20% de mortalidad, en un período de 14 días. No se cuantificaron los datos debido a la gran variedad de dosis y métodos de aplicación utilizados. La tabla contiene solo algunos ejemplos representativos.

1.7. Bioquímica de la degradación de los componentes cuticulares por hongos entomopatógenos

1.7.a. Degradación de quitina y proteínas cuticulares

La quitina está constituida por cadenas organizadas de N-glucosamina, y aunque se encuentra ausente en la epicutícula, representa entre el 25 y el 40% de la cutícula del insecto (Neville, 1975). Se ordena en forma de cadenas fibrilares apretadas que conforman la estructura de sostén de la exo y endocutícula (o

procutícula, como frecuentemente se llama a la combinación de estas capas). Esta matriz se completa por proteínas que rodean a las fibras de quitina, estabilizándose por compuestos fenólicos y quinonas que se unen mediante enlaces covalentes con estas proteínas y con la quitina formando la estructura rígida y apretada característica de la procutícula (Locke, 1965; Nation, 2002).

Al crecer en medios de cultivos conteniendo cutícula de insectos como única fuente de carbono, los hongos entomopatógenos producen una serie de enzimas hidrolíticas extracelulares que catalizan la degradación de los mayores componentes cuticulares. En *M. anisopliae* las primeras enzimas caracterizadas fueron una proteasa del tipo "elastasa" (pH óptimo 9,0 y PM 25.000) y una quitinasa (pH óptimo 5,3 y PM 33.000) (St. Leger et al., 1986b). Luego se describieron las proteasas Pr1, Pr2, y metaloproteínasa (St. Leger et al., 1994) y diferentes endo y exoquitinasas (St. Leger et al., 1996a). Estas y otras enzimas del complejo hidrolítico se inducen diferencialmente en las condiciones de cultivo antes mencionadas: las proteasas y las estererasas se producen antes de las 24 horas, mientras que la máxima actividad quitinasa aparece recién en los siguientes 4 o 5 días (St. Leger et al., 1986c). Posteriores estudios de inmunohistoquímica en cutículas infectadas confirmaron estas evidencias obtenidas *in vitro*, estableciéndose una acción sinérgica entre proteasas y quitinasas. Las primeras actúan inicialmente rompiendo la apretada estructura de la procutícula, mientras que el complejo quitinolítico se activa recién en zonas de degradación proteolítica, siendo dependiente de la accesibilidad a su sustrato (St. Leger et al., 1996a). Luego del análisis de bibliotecas de EST (*Expressed Sequence Tag*) en *M. anisopliae* crecido en presencia de cutícula de *Manduca sexta*, nueve secuencias adicionales de proteasas fueron descritas, y tres quitinasas y una quitosanasa se reportaron entre los diez transcritos mas abundantes (Freimoser et al., 2003). Los análisis de EST realizados en *M. anisopliae* muestran además que 860 genes son expresados al crecer en medio de cultivo mínimo con la adición de cutícula de insecto (Freimoser et al., 2003). Experimentos realizados en las mismas condiciones pero con la adición al medio de hemolinfa del mismo insecto resultó en la expresión de sólo 266 genes, con apenas 50 genes expresados en ambas condiciones (Freimoser et al., 2005). Este último medio sería equivalente al que se enfrenta el hongo en la etapa posterior a la penetración. Por lo tanto, son necesarios un

importante número de genes para incorporar los componentes cuticulares a las células fúngicas; mayoritariamente enzimas degradativas, transportadores proteicos y reguladores de la transcripción, fundamentales en la etapa inicial de la infección (Freimoser et al., 2005).

I.7.b. Degradación de hidrocarburos epicuticulares

El primer evento requerido para la penetración fúngica es la degradación de la epicutícula. Los HC son la fracción preferida de los lípidos epicuticulares de insecto para el crecimiento *in vitro* de los hongos entomopatógenos (Napolitano y Juárez, 1997), que tienen la capacidad de metabolizarlos y utilizarlos para la producción de energía (Crespo et al., 2000). Además, esos hongos son capaces de crecer en medios de cultivo conteniendo HC sintéticos, similares a los presentes en la cutícula de insectos, como única fuente de carbono y energía (Napolitano y Juárez, 1997). Luego de incubar *B. bassiana* y *M. anisopliae* en presencia de *n*-hexadecano (Napolitano y Juárez, 1997) o *n*-octacosano (Crespo et al., 2000) marcados radiactivamente, se detectó la síntesis de una variedad de lípidos fúngicos que incluyen triacilglicéridos, ácidos grasos libres, lípidos polares e HC; además de la liberación de cantidades variables de CO₂ y ácido acético. Cuando estos ensayos se repitieron con cultivos previamente crecidos en HC similares a los de insecto (hongos adaptados a crecer en estas condiciones), la producción de compuestos orgánicos volátiles marcados, con el ácido acético como el componente mayoritario, se incrementó significativamente respecto a los controles antes mencionados (Crespo et al., 2000; Juárez et al., 2000). Estos datos sugirieron que la actividad oxidativa estaría incrementada en estos cultivos adaptados.

No existe información previa sobre las enzimas involucradas en la degradación de HC alifáticos por hongos filamentosos. La ruta metabólica probablemente ocurra en analogía a las levaduras (Fig. I.3). La primera oxidación sería catalizada por un sistema de citocromo P450 monooxigenasa de localización microsomal. El alcohol resultante atravesaría la membrana peroxisomal y luego de sucesivas transformaciones por la acción concertada de las enzimas alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y acil CoA sintetasa, se convertiría en un ácido graso que

iniciaría el proceso de β -oxidación (Tanaka y Ueda, 1993). Eventualmente, el ácido graso se generaría directamente en los microsomas y luego de atravesar la membrana peroxisomal seguiría con la vía oxidativa antes mencionada (Scheller et al., 1998; Juárez et al., 2004).

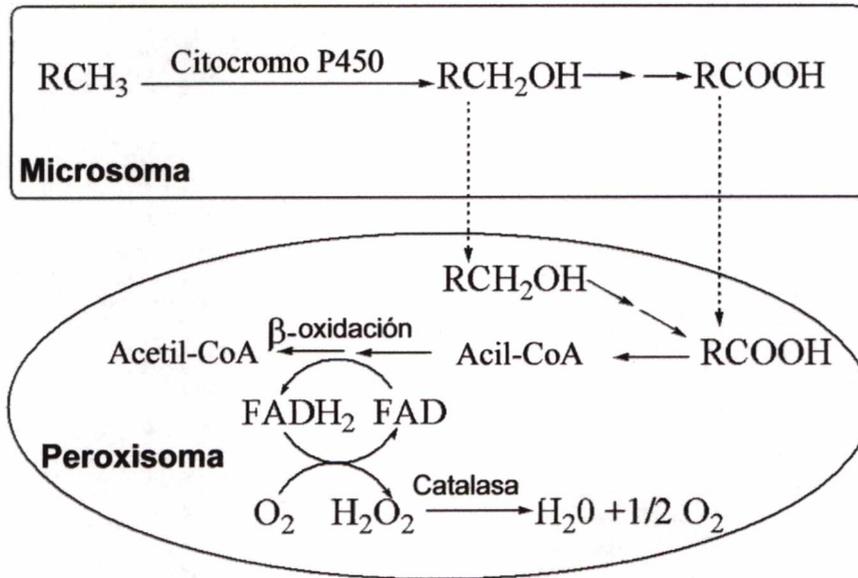


Figura I.3: Ruta metabólica propuesta para la degradación de hidrocarburos por *Beauveria bassiana*.

I.7.b.1. Citocromo P450 monooxigenasas

Las citocromo P450 constituyen una de las superfamilias de enzimas más numerosas que se conocen. Son hemo-tiolato proteínas que catalizan reacciones de monooxigenación estereoselectivas en un amplio rango de sustratos lipofílicos, originando derivados más hidrofílicos por la adición de un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular. Colectivamente están involucradas en el metabolismo de compuestos alifáticos, cíclicos y aromáticos; catalizando reacciones de hidroxilación, epoxidación, dealquilación, N-hidroxilación, sulfoxidación, desulfuración, dehalogenación reductiva y reducción de compuestos nitrogenados (Guengerich, 2001). Constituye un sistema microsomal de dos componentes formado por la NADPH citocromo P450 reductasa (flavoproteína que contiene FAD y FMN) y la hemoproteína P450 monooxigenasa (Fig. I.4). Debido su mecanismo de reacción (Fig. I.5), pertenece

al grupo de enzimas llamadas oxidasas de función mixta, por oxidar simultáneamente dos sustratos diferentes. El sistema en su conjunto juega un rol crucial en la detoxificación y catabolismo de xenobióticos como fármacos, pesticidas, carcinógenos, y contaminantes ambientales; así como en la biosíntesis de compuestos esenciales.

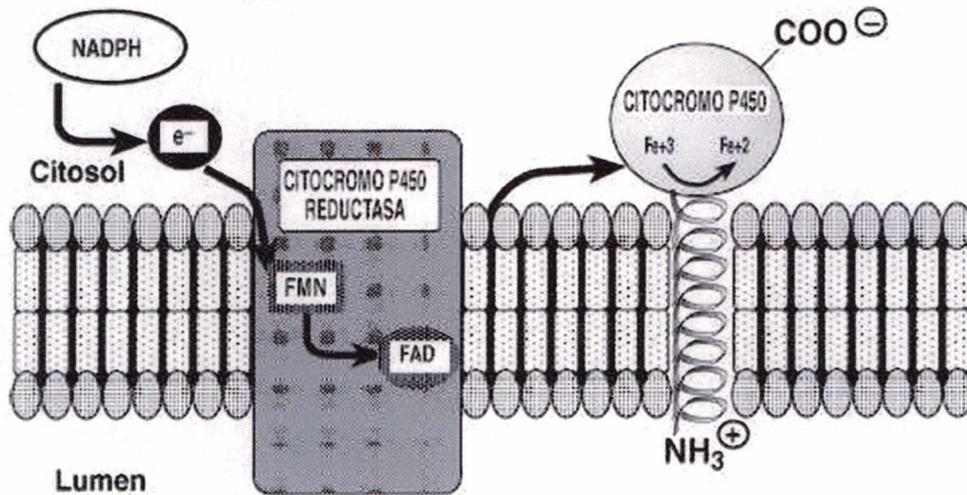


Figura I.4: Esquema del traspaso de electrones desde el NADPH al citocromo P450, catalizado por la enzima de membrana microsomal NADPH citocromo P450 reductasa.

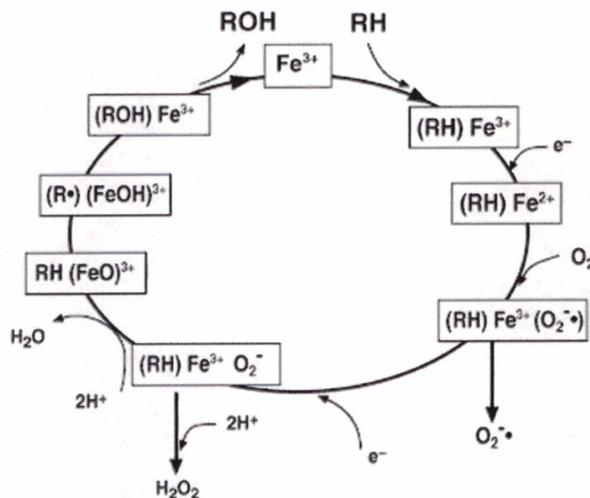


Figura I.5: Mecanismo de reacción de la citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de reacción propuesto por Coon et al. (1992). En él, el Fe^{3+} representa al hierro del grupo hemo oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Las citocromo P450 se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, formando parte de variadas rutas metabólicas en eucariotas superiores (plantas y animales) e inferiores (hongos e insectos), así como en algunas bacterias y algas (Nelson, 1999). En base a su homología de secuencia, se agrupan en dos grupos principales: E (eucariotas) y B (procariotas). Las del grupo E pertenecen a un sistema microsomal como el descrito anteriormente, mientras que las del grupo B están constituidas por una sola proteína con los dominios hemo y flavina. Típicamente, las P450 bacterianas son solubles y más cortas (aproximadamente 400 aa) mientras que las eucarióticas tienen como mínimo 500-600 aa y están ancladas a la membrana microsomal (Gotoh, 1993). Las secuencias aminoacídicas de estas enzimas no están bien conservadas, con niveles de identidad tan bajos como 16% en algunos casos, aunque su plegamiento estructural se ha mantenido durante la evolución (Doddapaneni et al., 2005a).

Debido al continuo incremento de proteínas que se incorporan a esta superfamilia, se estableció un sistema especial de nomenclatura (Nelson et al., 1996) que es continuamente revisado por el Comité Internacional para la Nomenclatura de Enzimas Citocromo P450 (<http://drnelson.utmem.edu/homepage.html>). De acuerdo a este sistema, el prefijo *CYP* es seguido por un número para cada familia, y luego por una letra para indicar la subfamilia (Ej: *CYP1A1*). Según el mismo Comité la identidad entre secuencias debe ser de al menos un 40% para ser consideradas como parte de la misma familia; mientras que la misma debe ser entre 40-55% para definir una subfamilia. En base a estas convenciones, alrededor de 250 familias fueron identificadas hasta el año 2003 (Yadav et al, 2003). La reciente secuenciación de los genomas de diversos organismos ha permitido identificar familias adicionales (muchas de ellas de función desconocida) en plantas, invertebrados y microorganismos. Estas secuencias se encuentran compiladas y actualizadas en la página web del Dr. David Nelson (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

Los hongos son una fuente importante de citocromos P450 con nuevas funciones catalíticas (Yadav et al., 2003). Los sistemas de citocromo P450 fúngicos están involucrados en la biosíntesis de componentes de la pared celular, biosíntesis de micotoxinas, patogénesis, resistencia a antifúngicos, desnitrificación, biotransformación de compuestos químicos y biodegradación (van der Brink et al, 1998), así como en la

síntesis de biosurfactantes (Hewald et al., 2005). La secuenciación del genoma completo del hongo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez et al., 2004) arrojó el número record de citocromos P450: contiene al menos 150 isoformas diferentes, que representan aproximadamente el 1% de las secuencias codificantes (Doddapaneni y Yadav, 2005), por lo que al conjunto se les dio el nombre de "P450oma" (Doddapaneni et al., 2005a).

I.7.b.1.i. Citocromo P450 monooxigenasas degradadoras de alcanos (P450alk)

Las isoformas que catalizan específicamente la hidroxilación de HC reciben el nombre de citocromo P450 monooxigenasas degradadoras de alcanos (P450alk). Todas pertenecen a la familia de genes *CYP52* y fueron clonadas y caracterizadas en las levaduras *C. tropicalis* (Seghezzi et al., 1991; 1992), *C. maltosa* (Scheller et al., 1996), *Yarrowia lipolytica* (Iida et al., 1998) y *Debaryomyces hansenii* (Yadav y Loper, 1999). Además se ha demostrado que una sola P450alk (*CYP52A3* de *C. maltosa*) no solo cataliza la reacción inicial de hidroxilación del alcano, sino que es capaz de producir el ácido α,ω dioico mediante una cascada oxidativa (Scheller et al., 1998). Alrededor de 20 isoformas, incluidas algunas variantes alélicas, fueron descritas hasta el momento en *C. tropicalis* (Craft et al., 2003). En presencia de ácido oleico y/o *n*-octadecano, dos de estas isoformas (*CYP52A13* y *CYP52A17*) se expresan fuertemente, mientras que otras lo hacen en menor medida o no lo hacen en ausencia de sus sustratos (Craft et al., 2003). La gran especificidad de sustrato es propia de la familia *CYP52*, algunas actúan hidroxilando alcanos de cadena corta (C12 a C16) mientras otras oxidan ácidos grasos en la posición ω (van Beilen et al., 2003). No hay reportes de estas enzimas hidroxilando alcanos de muy largas cadenas en sistemas biológicos.

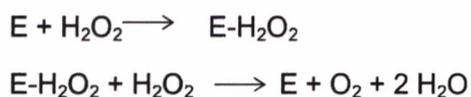
I.7.b.2. Catalasas

En hongos filamentosos y levaduras, la β -oxidación ocurre exclusivamente en los peroxisomas (Tanaka y Fukui, 1989; Kunau et al., 1996). Una proliferación peroxisomal, junto a una marcada inducción de las enzimas peroxisomales de la β -

oxidación, fueron reportados en levaduras crecidas en HC (Fukui y Tanaka, 1979; Tanaka et al., 1982). En *B. bassiana*, el desarrollo de peroxisomas también fue claramente estimulado en hongos crecidos en HC (Crespo et al., 2000; Juárez et al., 2004). La típica enzima marcadora de peroxisomas es la catalasa. Sin embargo, su localización no peroxisomal ha sido demostrada en diferentes sistemas eucarióticos (Taub et al., 1999, Bussink y Oliver 2001) y esta reportada la existencia de más de una isoforma de catalasa en hongos filamentosos (Kawasaki y Aguirre, 2001). En levaduras, la relación entre la actividad catalasa y el metabolismo de HC fue sugerida hace muchos años (Teranishi et al., 1974). Cuando células de *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia* y *C. lipolytica* fueron crecidas en una mezcla de alcanos de corta cadena (*n*-decano a *n*-tridecano), la actividad catalasa fue mayor que la detectada en las mismas levaduras crecidas en glucosa, etanol o dodecanol (Teranishi et al., 1974).

Las catalasas son enzimas que catalizan la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado junto a otras especies reactivas de oxígeno, como consecuencia del metabolismo celular aeróbico. Estas especies reactivas causan daños oxidativos a componentes celulares fundamentales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros.

El H_2O_2 puede actuar como sustrato y dador de hidrógeno simultáneamente (función catalasa) produciendo H_2O y O_2 :



O bien, ser utilizado para oxidar diversos compuestos (alcoholes, aldehídos) mediante una peroxidación (función peroxidasa):



De acuerdo a estos mecanismos, existen dos tipos de catalasas: las catalasa-peroxidasas (bifuncionales) y las catalasas verdaderas (monofuncionales). Estas últimas son inhibidas por el 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (Margoliash et al., 1960),

mientras que las catalasa-peroxidasas no son sensibles a este compuesto (Nadler et al., 1986; Fraaije et al., 1996). Las catalasas monofuncionales son las mejor caracterizadas tanto en eucariotas como en procariotas. Luego de análisis filogenéticos, 74 secuencias fueron clasificadas en tres diferentes grupos (I, II y III) correspondientes a tres familias diferentes de genes (Klotz et al., 1997). Las catalasas bacterianas se distribuyen en los tres grupos, las de plantas se ubican en el grupo I, mientras que las de animales, levaduras y hongos filamentosos lo hacen en el grupo III. Al grupo II pertenecen las llamadas catalasas de subunidades grandes, solo presentes en hongos y bacterias, que exhiben propiedades diferentes como gran resistencia al calor, el pH y los agentes caotrópicos. Estas características son atribuibles a la presencia de residuos extras en su secuencia: 70 aminoácidos (aa) en el extremo N-terminal y un dominio C-terminal de aproximadamente 150 residuos aminoácidos (Klotz et al., 1997). En hongos filamentosos, las catalasas son homotetrámeros y presentan diferentes estructuras, función y localización celular (Natvig et al., 1996). En *Aspergillus niger*, una catalasa extracelular protege a las células del H₂O₂ exógeno (Witteveen et al., 1992). Una expresión diferencial de estas enzimas se observó en *Cladosporium fulvum* bajo condiciones de estrés nutricional (Bussink y Oliver, 2001) y en *Neurospora crassa* durante procesos de diferenciación celular (Díaz et al., 2001). No hay reportes sobre la caracterización de catalasas en hongos entomopatógenos ni sobre su rol durante la degradación de HC en estos organismos.

I.8. Mejoramiento genético de micoinsecticidas

En los últimos años se han obtenido cepas recombinantes de hongos entomopatógenos con una alta estabilidad genética logrando reducir el tiempo letal medio y/o aumentar el porcentaje de mortalidad de sus insectos blanco (St. Leger et al., 1996b; Hu y St. Leger, 2002; Fang et al., 2005). La sobreexpresión de enzimas fúngicas involucradas en la degradación de la cutícula de insectos y su correlación con la virulencia sobre sus hospedadores es un tema de intenso estudio en este campo. El grupo de St. Leger ha obtenido una cepa de *M. anisopliae* con una actividad proteasa (Pr1) aumentada. La presencia de genes adicionales de Pr1 produjo una disminución

del 25% en el tiempo de mortalidad, en comparación con la *wild-type* (St Leger et al., 1996b). Recientemente, una quitinasa (Bbchit1) fue clonada y sobreexpresada en *B. bassiana* (Fang et al., 2005). La cepa transformada mostró un incremento de su virulencia contra el áfido *Myzus persicae*, donde no solo redujo en un 50% el tiempo de mortalidad, sino que además disminuyó un 50% la dosis letal media (Fang et al., 2005).

Capítulo II

OBJETIVOS DEL TRABAJO

II.1. Objetivos generales

- Avanzar en el estudio de la ruta metabólica propuesta para la degradación de hidrocarburos cuticulares de insecto, caracterizando algunas de las enzimas fúngicas involucradas en este proceso.
- Profundizar en el conocimiento de la bioquímica de la interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula de su insecto hospedador.

II.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las isoformas de la enzima catalasa presentes en *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, estudiar su localización celular y el rol de cada una de ellas durante la degradación de HC.
- Investigar la presencia de un sistema de citocromo P450 fúngico involucrado en la reacción inicial de la ruta de degradación de HC propuesta, y estudiar su expresión diferencial en hongos adaptados a crecer en HC similares a los de insecto.
- Estudiar la composición de los hidrocarburos epicuticulares de *Acanthoscelides obtectus* Say (gorgojo del poroto) y *Ulomoides dermestoides* Fairmaire (gorgojo del maní), y su correlación con la susceptibilidad a los hongos entomopatógenos; así como el efecto de la infección fúngica sobre la liberación de sustancias de defensa por *U. dermestoides*.
- Aportar nuevas evidencias a la hipótesis según la cual la adaptación de los hongos entomopatógenos a crecer en HC similares a los de insecto favorecería las etapas tempranas de interacción con la epicutícula y produciría un mejoramiento de su capacidad insecticida. Como modelo se utilizará el hongo *B. bassiana* y los insectos plaga de granos almacenados *A. obtectus*, *U. dermestoides*, *Rhizoperta dominica* Fabricius (taladrillo de los granos) y *Tribolium castaneum* Herbst (carcoma de la harina).

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS

III A) *Enzimas fúngicas involucradas en el catabolismo de hidrocarburos*

III.A.1. Solventes, reactivos, enzimas y oligonucleótidos utilizados

Los solventes (hexano, cloroformo, metanol, etanol, acetona, éter etílico) utilizados fueron grado proanálisis obtenidos de Merk (Darmstadt, Alemania) y Carlo Erba (Milán, Italia).

Las placas cromatográficas de ácido silícico utilizadas fueron provistas por Aldrich (Milwaukee, USA) y las placas de alta resolución (HPTLC Silicagel 60) fueron provistas por Merck.

El trazador radiactivo [^{14}C] *n*-hexadecano (60 mCi/mmol) fue adquirido en New England Nuclear (Boston, USA) y el [α - ^{32}P]-dCTP (50 μCi , 3000 Ci/mmol) en Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA). El líquido de centelleo fue obtenido en Packard Instrument Company (Illinois, USA).

El inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), los protectores de grupos sulfidrilos ditioeritritol (DTE) y ditiotreitól (DTT), el inhibidor de catalasas 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), diclorofluoresceína, peróxido de hidrógeno, Nycodenz, lignoceroil-CoA, *n*-hexadecano y *n*-octacosano se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El β -mercaptoetanol, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa (X-Gal) y el isopropil- β -D-tiogalactopirano (IPTG) se adquirieron en Promega (Madison, USA).

Las enzimas de restricción utilizadas fueron de Promega. Los *primers* para reacciones de PCR fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, USA), la enzima *Taq*-polimerasa se adquirió en Inbio-Highway (Tandil, Argentina), la *Taq*-polimerasa Platinum y la transcriptasa reversa Superscript II en Invitrogen.

III.A.2. Kits comerciales empleados

- Cuantificación de proteínas: BCA protein assay (Pierce, Rockford, USA)
- Extracción de ARN: RNeasy Plant Mini (Qiagen, Valencia, USA)
- Síntesis de ADNc: SMART cDNA library construction (Clontech, Franklin Lakes, USA)
- Clonado de productos de PCR: pGem-T Easy vector systems (Promega)
- Minipreparación de plásmidos: Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen)
- Síntesis de sondas radiactivas: Prime-a-Gene labelling system (Promega)

- Purificación de sondas radiactivas: Wizard DNA clean-up system (Promega)

III.A.3. Hongos entomopatógenos

Se utilizaron las siguientes cepas de *B. bassiana*: Bb GHA, obtenida de un formulado comercial producido por Mycotech (Butte, USA) y Bb ARSEF 5500 (USDA-ARS, Ithaca; Humber, 1998), aislada en 1993 de *Diatraea saccharalis* en la localidad de Oliveros (Santa Fe, Argentina). Las cepas fueron mantenidas mediante resiembras periódicas en placas de agar-Sabouroud modificado y/o mediante pasajes por el insecto hospedador.

III.A.4. Cultivo de microorganismos

III.A.4.a. *Beauveria bassiana*

Los cultivos fúngicos se realizaron en medios de cultivo sólidos (en placas de Petri descartables) y líquidos (en erlenmeyers de 250 ml). La composición del medio completo (MC) sólido fue: 0.4 gr. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 1,4gr. de PO_4HNa_2 , 0,6 gr. de SO_4Mg , 1 gr. ClK, 1,4 gr. de NO_3NH_4 , 20 gr. de glucosa, 10 gr. de extracto de levadura y 15 gr. de agar disueltos en 1000 ml de agua destilada. El MC líquido fue similar pero sin el agregado de agar. La composición del medio mínimo (MM), tanto sólido como líquido, fue similar a los respectivos MC pero sin el agregado de glucosa ni de extracto de levadura.

Se denominó cultivos "control" a los hongos crecidos en MC, y cultivos "adaptados" a los hongos crecidos en MM suplementado con HC sintéticos (similares a los cuticulares de insecto) como única fuente de carbono. Excepto para algunos bioensayos donde se utilizó *n*-hexadecano (*n*-C16), el HC empleado fue *n*-octacosano (*n*-C28) disuelto en hexano (15% p/v). La solución de HC (2,5 ml) se esparció sobre la superficie del medio de cultivo y posteriormente se evaporó el solvente. En ambos casos, los cultivos se realizaron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días (medio líquido) o 14 días (medio sólido).

III.A.4.b. *Escherichia coli*

Los cultivos de *E. coli* cepa JM109 utilizada para el clonado de ADNc se realizaron en medio Luria Bertani (LB). La composición del mismo fue: 10 gr. de triptona, 5 gr. de extracto de levadura y 10 gr. de ClNa disueltos en 1000 ml de agua destilada. Para el medio de cultivo sólido se agregó 1,5% (p/v) de agar.

Todos los medios de cultivo utilizados se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

III.A.5. Obtención de fracciones subcelulares fúngicas

Se utilizaron cultivos control y adaptados de Bb GHA crecidos en medio sólido. Los hongos se procesaron en buffer fosfato 50 mM pH 7 conteniendo PMSF 1 mM, con un homogeneizador Mini-Bead Beater (BioSpec, Bartlesville, USA) operado a 50.000 rpm, utilizando perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. La homogeneización se realizó en 6 ciclos de 30 segundos cada uno, manteniendo las muestras en hielo entre cada ciclo para evitar el sobrecalentamiento producido por la agitación. Luego se centrifugó a 2.000g durante 15 minutos para obtener el homogenato. Una posterior centrifugación de éste a 20.000g durante 30 minutos permitió separar un pellet ($P_{20.000g}$) y un sobrenadante que se ultracentrifugó a 100.000g durante 1 hora, obteniéndose las fracciones $S_{100.000g}$ y $P_{100.000g}$. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C. Alternativamente, la fracción homogenato fue ultracentrifugada a 130.000g en presencia de Nycodenz 30% para purificar los peroxisomas según el protocolo descrito por Ghosh y Hajra (1986). Sin embargo esto no fue posible debido a la presencia de restos de HC en cultivos adaptados que alteraron los parámetros de sedimentación.

III.A.6. Actividad de acil-CoA oxidasa

Ante la imposibilidad de obtener una fracción peroxisomal pura, el pellet de 20.000g fue utilizado como la fracción contenedora de peroxisomas. Para corroborarlo se midió en esta fracción la actividad de la enzima marcador de peroxisomas acil-

CoA oxidasa. Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Small et al. (1985), consistente en la determinación de la producción de H₂O₂ acoplada a la oxidación de diclorofluoresceína en una reacción catalizada por peroxidasa exógena. Esta oxidación fue determinada por el cambio de absorbancia a 502 nm durante 30 minutos a partir de la adición de lignoceroil-CoA. El coeficiente de extinción molar utilizado para la diclorofluoresceína fue $1,42 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III.A.7. Actividad de catalasa

La actividad específica de la enzima catalasa se determinó en las fracciones P_{20.000g} y S_{100.000g} de cultivos control y adaptado crecidos en medio sólido. El consumo de H₂O₂ (20 mM en buffer fosfato 50 mM, pH 7) se midió espectrofotométricamente por el decaimiento de la absorbancia a 240 nm (Beers y Sizer, 1952) utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), y cubetas de cuarzo de 10 mm de paso de luz. Una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1 μmol de H₂O₂ en 1 minuto de reacción a pH 7 y 25°C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), excepto durante la purificación donde se empleó el micrométodo del ácido bicínico (Pierce, Rockford, USA), en ambos casos utilizando albúmina bovina como estándar.

III.A.8. Purificación de catalasas

La fracción de partida para la purificación de la catalasa peroxisomal fue el P_{20.000g} de cultivo control crecido en medio sólido. Para solubilizar las enzimas de la matriz peroxisomal, la muestra se sonicó (3 veces durante 1 min a 0°C, 50 watts de potencia) en un sonicador Branson 450 (Branson, Danbury, USA) y luego se centrifugó a 10.000g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana Amicon YM50 (Amicon, Danvers, USA) y se concentró hasta un volumen de 300 μl . Esta fracción se sembró en una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada previamente con buffer fosfato

50 mM pH 7, y se eluyó con el mismo buffer a 0,5 ml/min. Se colectaron alícuotas de 1,5 ml. La fracción con actividad catalasa fue filtrada a través de una membrana YM50, concentrada y sembrada en una columna de intercambio aniónico Mono Q 10/10 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada previamente con buffer acetato 20 mM, pH 7. Luego de eluir otras proteínas con buffer acetato 30 mM, pH 6 y buffer acetato 100 mM, pH 5; la actividad catalasa se recuperó eluyendo con buffer acetato 20 mM más cloruro de sodio 1 M, pH 7.

Para la purificación de la catalasa citosólica se agregó 1 volumen de etanol:cloroformo (1:1 v/v) a 5 volúmenes de la fracción $S_{100.000g}$. La mezcla se agitó (3 veces \times 15 segundos) y luego de 20 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 10.000g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se agregaron 5 volúmenes de acetona fría al sobrenadante (fase acuosa), y luego de dejar reposar 20 minutos a -20°C, se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer fosfato 50 mM pH 7, se filtró a través de una membrana YM50 y se concentró hasta un volumen de 300 μ l. Esta fracción se sembró sucesivamente en una columna Superdex 200 HR 10/30 y en una columna Mono Q HR 10/10, las cuales se eluyeron como se describió previamente. Durante ambas purificaciones, el contenido de proteínas y de grupos hemo de cada fracción se chequeó midiendo en forma simultánea las absorbancias a 280 y 406 nm, respectivamente. Las fracciones con actividad catalasa se dializaron (24 horas) contra EDTA 10 mM para eliminar las sales y se concentraron en filtros Ultrafree 30.000Da (Sigma, St. Louis, USA).

III.A.9. Caracterización de catalasas

III.A.9.a. Electroforesis

Las electroforesis en geles de poliacrilamida (10 y 12%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se corrieron en presencia de β -mercaptoetanol utilizando un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, USA) mediante el método de Laemmli (1970). Las proteínas se visualizaron por tinción de los geles con Coomassie Blue R-250. La masa molecular de cada subunidad se estimó empleando el programa

1D Image Analysis (Kodak) y estándares de peso molecular (Amersham, Buckinghamshire, UK).

III.A.9.b. Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática

El pH óptimo de las enzimas purificadas se determinó a 25°C, utilizando los buffers fosfato 50 mM, acetato 50 mM, y carbonato 50 mM, dependiendo del intervalo estudiado. La temperatura óptima se determinó a pH 7 en buffer fosfato 50 mM, midiendo la actividad enzimática a diferentes temperaturas. La estabilidad térmica de las enzimas purificadas se evaluó luego de preincubar las mismas en buffer fosfato 50 mM pH 7 por 5 minutos (Brown-Peterson y Salin, 1995) a diferentes temperaturas (entre 25 y 75°C), la actividad residual se midió empleando la técnica antes descrita.

III.A.9.c. Propiedades catalíticas

El efecto de la concentración de sustrato en la actividad catalasa se determinó incubando las enzimas purificadas en buffer fosfato 50 mM pH 7 a 25°C a diferentes concentraciones de H₂O₂ (entre 5 y 70 mM). La actividad de catalasa también se midió en presencia de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) incubando las enzimas a 37°C en buffer fosfato 50 mM pH 7, conteniendo H₂O₂ 4 mM (Margoliash et al., 1960). La actividad remanente se determinó de la forma antes descrita a los 5 y 10 minutos de incubación.

III.A.10. Oxidación microsomal de hidrocarburos

La oxidación de HC *in vitro* se estudió incubando la fracción microsomal fúngica (P_{100.000g}) de cultivos control con [¹⁴C] *n*-hexadecano. Se preparó una mezcla de reacción con 2,2 × 10⁶ cpm del trazador radiactivo (disuelto en 5 µl de etanol), 3 mg de proteínas microsomales, 200 µl de NADPH 10 mM y se llevó a 1 ml con buffer de reacción. El mismo consistió en buffer fosfato 0,1 M pH 7,8 conteniendo Cl₂Mg (2 mM), EDTA (1 mM), DTE (1 mM) y sacarosa (10 mM). La mezcla se incubó durante 1 hora a 30°C con agitación leve. Cumplido el tiempo de reacción, la misma se interrumpió con

el agregado de 200 μ l de H₂SO₄ concentrado. Los metabolitos producidos se extrajeron con cloroformo:metanol (2:1) y se particionaron con agua bidestilada (1:5 v/v) de acuerdo al método de Folch (1957). La fase orgánica se evaporó hasta reducir al mínimo su volumen y se sembró en una placa de cromatografía en capa fina de silicagel (20 × 20 cm) con estándares apropiados (HC, alcoholes grasos, aldehídos y ácidos grasos libres). La placa se desarrolló dos veces sucesivas en hexano, para separar completamente el sustrato remanente (hidrocarburo no oxidado por los microsomas). Finalmente la placa se desarrolló en una mezcla de solventes consistente en éter de petróleo: éter etílico:ácido acético (80:20:1). La detección de radiactividad y su distribución sobre la placa se realizó por radio-TLC empleando un scanner de radiactividad Berthold LB-2723 (Berthold, Berlin, Alemania). Detectadas las zonas con radiactividad, se calcularon los R_f (distancia recorrida por el soluto/distancia recorrida por el solvente) correspondientes, y se refirieron a estándares sembrados y desarrollados en la misma placa.

III.A.11. Extracción de ARN

Se utilizaron 2,5 gramos de micelio provenientes de cultivos adaptados de Bb GHA crecidos en medio líquido durante 7 días. La homogeneización se realizó con un mortero en N₂ líquido y el ARN total se extrajo con el kit RNeasy Plant Mini (Qiagen Valencia, USA), utilizando DNAsa en la columna de extracción. La cantidad de ARN total se estimó por su absorbancia a 260 nm y la calidad del mismo por la relación 260/280 (1,8 a 2,0) y por la integridad del ARN, evaluada por electroforesis en gel de agarosa 1% y formaldehído 37%.

III.A.12. Obtención de ADNc

La primera hebra de ADNc se obtuvo utilizando el kit SMART cDNA library construction (Clontech, Franklin Lakes, USA). Esta estrategia utiliza los oligonucleótidos SMART IV que se unen preferentemente a los ARNm intactos (Fig. III.A.1). En un eppendorf de 500 μ l se adicionaron: 1 μ g de ARN total (3 μ l), 1 μ l del

oligonucleotido SMART IV y 1 μ l del *primer* CDS III, luego se incubó 2 min a 72°C y se enfrió inmediatamente en hielo. Posteriormente se agregaron al eppendorf: 2 μ l de buffer *first-strand*, 1 μ l de DTT 20 mM, 1 μ l de dNTPs 10 mM y 1 μ l de transcriptasa reversa Power Script. Esta mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 42°C.

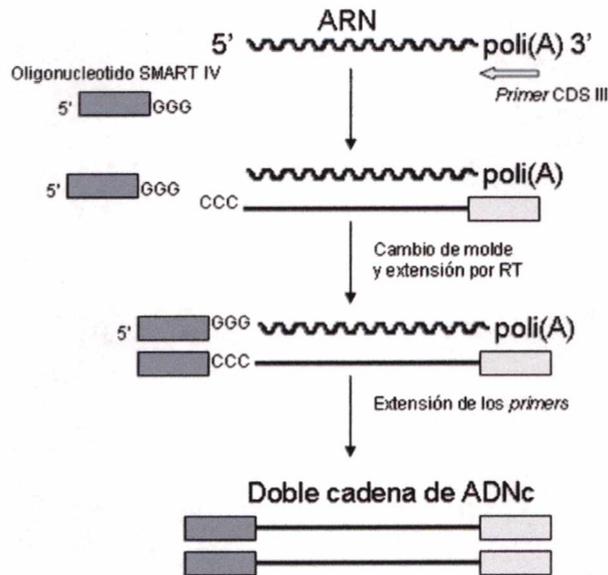


Figura III.A.1: Esquema del método de obtención de ADNc de doble cadena utilizando la estrategia SMART (Switching Mechanism At the 5'end of the RNA Transcript).

III.A.13. Amplificación de los ADNc por reacción en cadena de la polimerasa de larga distancia (LD-PCR)

A los 10 μ l de la mezcla de reacción se agregaron: 10 μ l de buffer Advantage II, 2 μ l de la mezcla de dNTPs 50X, 2 μ l de cada uno de los *primers* 5' PCR y CDS III/3' PCR y 2 μ l de la ADN polimerasa Advantage II. Esta enzima tiene una alta procesividad como para permitir la amplificación de largos segmentos. El volumen final se llevó a 100 μ l con agua destilada estéril. El programa utilizado para la LD-PCR consistió en:

Ciclo 1: ($\times 1$)

Paso 1: 95°C, 1 min

Ciclo 2: ($\times 26$)

Paso 1: 95°C, 15 seg

Paso 2: 68°C, 6 min

El rango de tamaños de los ADNc sintetizados se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Este ADNc fue posteriormente utilizado como molde para la amplificación por PCR de los segmentos de genes *CYP*.

III.A.14. Software utilizado

- Diseño de *primers* degenerados a partir de secuencias proteicas: CODEHOP y Blockmaker (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>)
- Diseño de *primers* específicos: Gene Runner (<http://www.generunner.com>)
- Identificación en una secuencia de nucleotidos provenientes del vector: VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)
- Alineamiento entre dos secuencias: LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)
- Alineamiento entre múltiples secuencias: AliBee (http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html)
- Alineamiento y comparación con bases de datos: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)
- Determinación de masas moleculares desde geles: 1D Image Analysis (Kodak, Rochester, USA)
- Análisis estadísticos: InStat 2.0 (Graph Pad Software, San Diego, USA)

III.A.15. Diseño de *primers*

Debido a la falta de reportes de genes *CYP* involucrados en la degradación de alcanos en hongos filamentosos, para el clonado de segmentos de estos genes en *B. bassiana* se diseñaron *primers* degenerados en base a algunas secuencias de estos genes de levaduras (familia *CYP52*). Para esto se empleó el algoritmo CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer), que genera *primers* conteniendo una corta secuencia 3' de 11-12 pares de bases de longitud que corresponde a la región degenerada, seguida de una secuencia consenso 5' no

degenerada que actúa estabilizando el híbrido (Rose et al., 2003). Se emplearon 15 secuencias aminoacídicas de citocromo P450alk de las levaduras *C. tropicalis*, *C. maltosa*, *C. apicola* y *Y. lipolytica* (Tabla III.A.1), para generar bloques con las regiones más conservadas. Los mismos se construyeron empleando el programa Blockmaker desde el mismo sitio web donde se encuentra el algoritmo CODEHOP (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>). Estos bloques fueron corridos en el CODEHOP para identificar los *primers* degenerados candidatos. En base a las predicciones de longitud de los fragmentos amplificables, se seleccionaron los *primers* que se muestran en la Tabla III.A.2. Adicionalmente se diseñaron *primers* específicos (Tabla III.A.3), utilizando el programa Gene Runner, a partir de las secuencias de segmentos de genes obtenidos de una EST de *M. anisopliae* (Freimoser et al., 2005) que poseen alta homología con genes CYP.

Tabla III.A.1: Citocromos P450alk de levaduras empleadas para el diseño de *primers* degenerados

Enzimas	Organismo	Número de acceso (Genbank)
CYP52A1	<i>C. tropicalis</i>	M24894
CYP52A2	<i>C. tropicalis</i>	M63258
CYP52A6	<i>C. tropicalis</i>	Z13010
CYP52A7	<i>C. tropicalis</i>	Z13011
CYP52A8	<i>C. tropicalis</i>	Z13012
CYP52B1	<i>C. tropicalis</i>	Z13013
CYP52C1	<i>C. tropicalis</i>	Z13014
CYP52A3	<i>C. maltosa</i>	D12475
CYP52A4	<i>C. maltosa</i>	X51932
CYP52A5	<i>C. maltosa</i>	X55881
CYP52E2	<i>C. apicola</i>	X87640
CYP52F1	<i>Y. lipolytica</i>	AB010388
CYP52F3	<i>Y. lipolytica</i>	AB010390
CYP52F4	<i>Y. lipolytica</i>	AB010391
CYP52F5	<i>Y. lipolytica</i>	AB010392

Tabla III.A.2: Secuencias de los *primers* degenerados diseñados con el algoritmo CODEHOP

Nombre	Secuencia
<i>Foward</i>	
P450A1	5'CCTTCCTCGGCAACggnathhttyrc3'
P450C1	5'GGCCGGCCGGgayacnwsngc3'
<i>Reverse</i>	
P450C-1	5'GGACAGCAGGCCGgcnswngrtc3'
P450E-1	5'CTCGTACcanckntcngg3'

Código para bases degeneradas: m=A/C; r=A/G; w=A/T; s=C/G; y=C/T; k=G/T; v=A/C/G; d=A/G/T; h=A/T/C; b=C/G/T, n=A/C/G/T.

Tabla III.A.3: Secuencias de los *primers* específicos diseñados con el programa Gene Runner

Nombre	Secuencia
AJf	5'CAGCAGGTCTCCAAGGTGAACAGC3'
AJr	5'TCCCTTGGCTGTGGTTTCGCTAG3'
CNf	5'CACACGACGTGCACATACGCGACTCC3'
CNr	5'CTGCGGTTAGCGACGAGAAAGCCCAGTC3'

Los *primers* fueron diseñados a partir de las secuencias con números de acceso (GenBank) AJ274003 y CN809217

III.A.16. Amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR se utilizó como molde 50 ng de ADNc, con un programa consistente en:

Ciclo 1: (×1)

Paso 1: 94°C, 3 min

Ciclo 2: (×35)

Paso 1: 94°C, 30 seg

Paso 2: 56°C, 40 seg

Paso 3: 72°C, 1 min

Se utilizó la enzima *Taq*-polimerasa (Inbio-Highway, Tandil) y el ciclador PCR Express. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con el programa 1D Image Analysis (Kodak).

III.A.17. Clonado de los segmentos génicos

Los segmentos amplificados fueron clonados en el plásmido pGem-T Easy (Promega). Este vector posee una zona con múltiples sitios de unión, donde se insertan los fragmentos a clonar, que a su vez está flanqueado por los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 (Fig. III.A.2). Además, en esa zona se encuentra la región que contiene el gen que codifica para la enzima β -galactosidasa (gen *lacZ*), por lo que cuando se inserta un fragmento de ADN, el gen *lacZ* se inactiva impidiéndose la síntesis de dicha enzima.

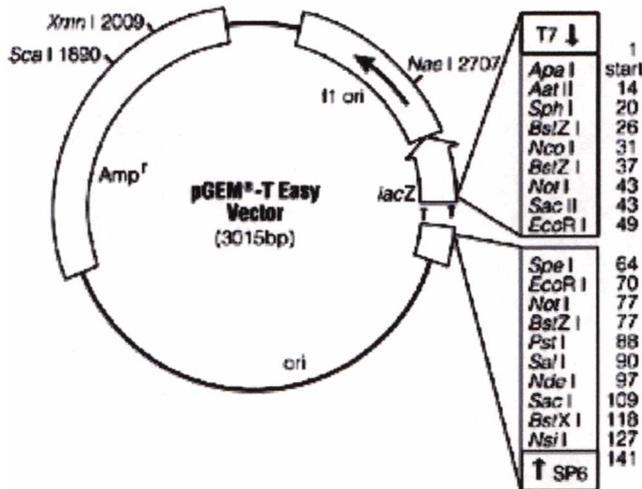


Figura III.A.2: Mapa de restricción del plásmido pGEM® Easy utilizado para el clonado de los productos de PCR.

Una vez ligado, el vector recombinante (vector con el inserto de ADN) fue transformado en células competentes de *E. coli* cepa JM109 mediante un shock térmico (Sambrook et al., 2000). Las células competentes transformadas se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB con ampicilina (100 µg/ml), 40 µl de X-Gal (20 mg/ml) y 4 µl de IPTG (200 mg/ml). El X-Gal es un compuesto cromógeno que es degradado enzimáticamente por la enzima β-galactosidasa, originando un compuesto de color azul. El IPTG es un inductor del promotor del gen lac Z. De esta manera, las colonias de *E. coli* que han recibido un vector que contiene un inserto de ADN, al tener inactivado el gen de la β-galactosidasa son incapaces de hidrolizar el X-Gal, por lo que son de color blanco. Sin embargo, aquellas colonias que tras la transformación no han recibido el inserto aparecen de color azul, al poseer la enzima β-galactosidasa funcional (Fig. III.A.3).

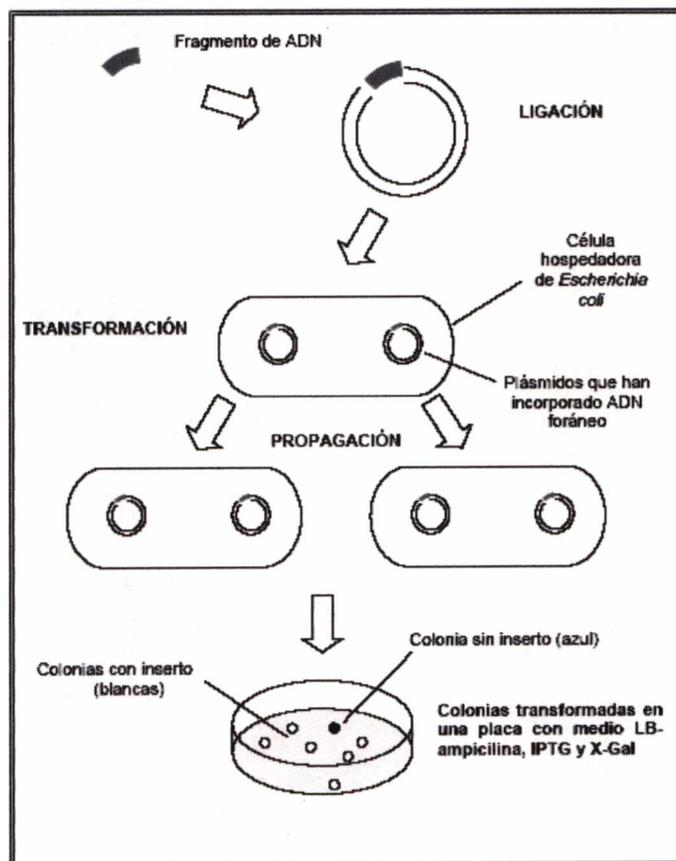


Figura III.A.3: Esquema del clonado de productos de PCR.

Las colonias blancas seleccionadas fueron repicadas en tubos de polipropileno conteniendo 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y crecidas durante una noche a 37°C con agitación leve. Las células fueron peleteadas y los plásmidos purificados utilizando el kit Qiaprep Spin (Qiagen). La longitud de los insertos fue confirmada por corte de los plásmidos con la enzima de restricción Eco RI y posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% en las condiciones antes descritas. Los insertos fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Los nucleótidos correspondientes al vector fueron eliminados de las secuencias con el programa VecScreen.

III.A.18. Análisis de las secuencias

Para los alineamientos entre dos secuencias se utilizó el programa LALIGN, que encuentra los mejores alineamientos locales; mientras que los alineamientos entre múltiples secuencias se realizaron con el programa AliBee. Las secuencias también fueron analizadas por comparación con la bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante la herramienta BLASTx, que compara la secuencia traducida con las secuencias proteicas existentes en esta base de datos. Todos los programas fueron corridos con los parámetros ofrecidos por defecto.

III.A.19. Expresión diferencial de los genes

III.A.19.a. Northern blot

El ARN total de cultivos control y adaptado fue extraído como se describió anteriormente (ítem III.A.12) y separado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y formaldehído 37%. Se sembraron 20 µg de ARN en cada calle. Luego el ARN fue transferido desde el gel a una membrana de nylon Zeta-Probe (Bio-Rad, Richmond, USA). Las sondas fueron sintetizadas con el kit Prime-a-Gene labelling system (Promega) según las instrucciones del fabricante. En forma resumida, 5 ng/µl de cada inserto proveniente de los respectivos plásmidos fueron desnaturalizados e incubados

con [α - 32 P]-dCTP (50 uCi, 3000 Ci/mmol), los restantes dNTPs y el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I por un período de 2 horas a 23°C. Luego las sondas fueron purificadas con el kit Wizard DNA clean-up system (Promega). La prehibridización y la hibridación de la membrana se realizaron en presencia del buffer de hibridización (SSC 5x, solución de Denhardt 5x, SDS 1%, 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón, en 50% de formamida), incubando durante una noche a 42°C. Luego la membrana fue lavada en buffer SSC 2x durante 30 minutos (3 lavados), y la señal radiactiva de cada banda fue revelada y cuantificada en el equipo Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA). Como control se utilizó el gen de β -tubulina de *B. bassiana* (GenBank DQ079603), el cual fue amplificado con los *primers* TubF (5'TGGGCYAARGGYCACTACACYGA3') y TubR (5'TCAGTGAAGTCCATCTCRTCCAT3') (Tartar y Boucias, 2004).

III.A.19.b. PCR cuantitativa a tiempo real (RTi-PCR)

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (RTi-PCR) incluye el agregado de un fluorocromo (que puede ser un agente intercalante o una sonda específica) a la mezcla de reacción de PCR. El fluorocromo se une al producto amplificado y un programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo. Esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles. Para cada muestra el programa calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN molde presente en la muestra (Kubista et al., 2006).

Los ensayos de RTi-PCR se llevaron a cabo en Gentron Genomics Services (Instituto Leloir, Buenos Aires), utilizando un equipo iCycler iQ (Bio-Rad, USA). Como agente intercalante se utilizó SYBR Green I. A partir de ARN total (~ 300 ng) extraídos de cultivos control y adaptado como se describió anteriormente se obtuvo ADNc con la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen), empleando hexameros como *random*

primers. Se utilizaron 3 muestras independientes de cultivos control y adaptado (C1, C2, C3, A1, A2, A3). El ADNc de cada muestra fue cuantificado por fluorescencia utilizando el reactivo Oligreen (Invitrogen). Cada una de las 6 muestras fue corrida por triplicado, utilizando β -tubulina y subunidad 18S de ARNr como genes de referencia. Los *primers* utilizados se muestran en la Tabla III.A.4.

Tabla III.A.4: Secuencias de los primers utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real y longitud de los productos amplificados

Nombre ^a	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>	Amplificación
1	5'aaggagcccgtgatttagtg3'	5'gtctcccaagagtcgaaacc3'	160 pb
2	5'cgggataaggattggctct3'	5'gaagcctgctaaggacatca3'	131 pb
3	5'gtgacgaggactggttgc3'	5'ccacccatgaatgaatgc3'	201 pb
Tub	5'gatggctgctctgactcc3'	5'ttacgcatctggtcctcaac3'	151 pb
18S	5'gttcggcaccttacgagaa3'	5'gcagacaaatcactccacca3'	241 pb

^a Los números 1, 2 y 3 corresponden a los fragmentos llamados (a partir del ítem IV.A.12) *53like*, P450 y EH, respectivamente.

Las condiciones de amplificación fueron:

Ciclo 1: (×1)

Paso 1: 95 °C, 1 min

Ciclo 2: (×40)

Paso 1: 95 °C, 30 seg

Paso 2: 59 °C, 30 seg

Paso 3: 72 °C, 15 seg

Paso 4: 84 °C, 5 seg

Ciclo 3: (×40)

Paso 1: 98 °C, 10seg

Los correspondientes valores de Ct se calcularon para cada pocillo de cada placa corrida, y a partir de estos se estimó el número de transcritos en cada pocillo. Para esto se utilizaron curvas estándar preparadas en idénticas condiciones

cuantificando un producto de amplificación de β -actina. Las cantidades utilizadas variaron desde 5 hasta 50 pg, desde 200 a 7000 pg y desde 1000 a 30000 pg en las diferentes curvas realizadas según la abundancia de cada transcripto (previamente estimada). Se calcularon los promedios de los triplicados de los genes de referencia y el error de los mismos (desvío estándar y coeficiente de variación). Posteriormente los datos del número de transcriptos de cada pocillo se normalizaron respecto al promedio de cada gen de referencia y luego se calculó el promedio y el error de las tres réplicas dentro de cada placa.

IIIB) *Interacción hongo entomopatógeno*
– *cutícula del insecto hospedador*

III.B.1. Solventes, estándares y accesorios utilizados

Además de los mencionados en el ítem III.A.1, se utilizaron los solventes acetonitrilo y diclorometano grado proanálisis obtenidos de Carlo Erba (Milán, Italia).

Las placas cromatográficas de ácido silícico utilizadas fueron provistas por Macherey-Nagel (Düren, Alemania). El ácido silícico utilizado para relleno de columnas de purificación fue Biosil A (Bio-Rad Lab, USA).

Los estándares de ácidos grasos, 1-pentadeceno, benzoquinona e hidroquinona fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Las fibras de microextracción en fase sólida (SPME) se adquirieron en Supelco (Bellefonte, USA).

III.B.2. Insectos

Se emplearon ejemplares adultos de los insectos plaga de granos almacenados *A. obtectus* (Fig. III.B.1A), *R. dominica*, *T. castaneum* y *U. dermestoides* (Fig. III.B.1B), provenientes de la Cátedra de Terapéutica Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Los insectos fueron criados en frascos de vidrio de 250 ml cubiertos con una fina red metálica y mantenidos en una cámara de cría a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa, con un fotoperíodo de 12 hs/12 hs luz:oscuridad (excepto los ejemplares de *U. dermestoides*, mantenidos en oscuridad). Se alimentaron con dietas consistentes en porotos para *A. obtectus*, granos de trigo para *R. dominica*, pan de salvado y maní para *U. dermestoides* y una mezcla de levadura de cerveza, leche descremada, germen y harina de trigo para el caso de *T. castaneum*.

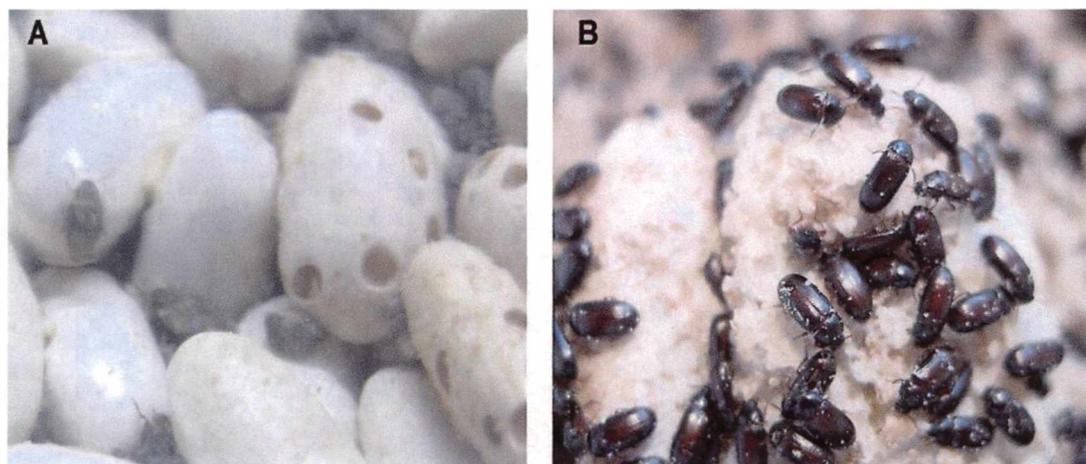


Figura III.B.1: Ejemplares adultos de *Acanthoscelides obtectus* (A) y *Ulomoides dermestoides* (B).

III.B.3. Análisis de lípidos de insecto

III.B.3.a. Extracción

Insectos adultos de *A. obtectus* y *U. dermestoides* fueron lavados con agua bidestilada para remover restos de alimento, y luego transferidos a un tubo cónico de vidrio con tapa esmerilada. Los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol (2:1) y se partitionaron con agua bidestilada (1:5 v/v) de acuerdo al método de Folch (1957).

III.B.3.b. Cromatografía en capa fina (TLC)

El extracto se analizó en placas de silica gel de 4 × 8 cm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), utilizando dos sistemas de desarrollo: primero *n*-hexano (100%) y luego *n*-hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1 v/v). La placa se reveló pulverizando con H₂SO₄ (5% en etanol) y luego calentando en estufa a 170°C durante 15 minutos. Los lípidos se identificaron por comparación con estándares analizados en condiciones similares.

III.B.4. Análisis de hidrocarburos de insecto

III.B.4.a. Extracción y purificación

Para la extracción de los lípidos epicuticulares, los insectos de las especies descritas en el ítem anterior fueron sumergidos durante 5 minutos en *n*-hexano destilado (6 ml/gr de insecto). Los hidrocarburos totales (en su mayoría provenientes de hemolinfa e integumento) se extrajeron de forma similar pero luego de 24 horas de inmersión. Los extractos se partitionaron con agua destilada (1:5 v/v), luego la fase orgánica se separó y concentró bajo atmósfera de N₂. Los hidrocarburos se purificaron del extracto lipídico total en una mini columna de Biosil de 2,5 cm × 0,5 cm, eluyendo con *n*-hexano destilado (6 ml/mg de lípido), y luego se concentraron bajo atmósfera de N₂.

III.B.4.b. Cromatografía en capa fina (TLC)

Los extractos se analizaron en las mismas condiciones que las descritas para los lípidos. Adicionalmente, para estudiar la presencia de hidrocarburos insaturados, la muestra se desarrolló por TLC en placas de sílica gel previamente impregnadas con NO₃Ag (20% en acetonitrilo), usando como solvente *n*-hexano:éter etílico (80:20 v/v) y revelando por pulverización con H₂SO₄ (5% en etanol). Los hidrocarburos se identificaron por comparación con estándares analizados en condiciones similares.

III.B.4.c. Cromatografía gaseosa capilar (CGC)

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 con detector de ionización por llama (FID) operado a 320°C y equipado con una columna capilar no polar (30 mts de longitud × 0,32 mm de diámetro interno, 0,5 µm de fase estacionaria) DB-5 (J & W Scientific, Folsom, USA). Como gas transportador se utilizó He a 11.36 psi con una velocidad lineal de 39 cm/seg. El inyector se operó en modo splitless a 280°C, y el horno se programó con una temperatura inicial de 50°C por 1 min, y luego con rampas de temperatura de 50°/min hasta 200°C y 3°C/min hasta 300°C permaneciendo

finalmente a esa temperatura por 10 minutos. El sistema fue operado, y los datos colectados, con el programa HP ChemStation. La longitud de cadena se estimó en base a los índices de Kovats (IK) (Kovats, 1965) calculados a partir de los tiempos de retención de *n*-alcanos de 10 a 40 átomos de carbono analizados en idénticas condiciones, utilizando la siguiente fórmula:

$$IK = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log t'_r(\text{desconocido}) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(N) - \log t'_r(n)} \right]$$

donde *n* es el número de carbonos del alcano más corto; *N* es el número de átomos de carbono del alcano más largo; *t*'(*n*) es el tiempo de retención ajustado del alcano más corto; y *t*'(*N*) el tiempo de retención ajustado del alcano más largo.

Los patrones de ramificación se estimaron en base al protocolo descrito por Carlson et al. (1998), que asigna estructuras metil-ramificadas a los HC de acuerdo a sus patrones de elución, y se confirmaron por la interpretación de sus espectros de masa.

III.B.4.d. Cromatografía gaseosa capilar (CGC) acoplada a espectrometría de masa (MS)

Las muestras de HC de *A. obtectus* se analizaron en un equipo Hewlett-Packard 5890 acoplado a un analizador que utiliza un filtro de masa cuadrupolo Hewlett-Packard 5972A (Laboratorio LADECOR, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). El inyector se operó a 230°C y el horno se programó con una temperatura inicial de 110°C por 5 min, y luego con una rampa de temperatura de 5°/min hasta 290°C permaneciendo a esa temperatura por 10 minutos. El análisis de los HC de *U. dermestoides* se realizó en un equipo Finnigan Polaris Q con trampa iónica (Department of Biochemistry, University of Reno, USA), operado en similares condiciones a las descritas para CGC. La fuente iónica se fijó en 200°C y la línea de transferencia en 275°C. Los HC se identificaron por interpretación de sus espectros de masa (Nelson y Sukkestad, 1970; Blomquist et al., 1987; Juárez et al., 2001).

III.B.5. Bioensayos

Para cada ensayo se seleccionaron aleatoriamente de la cámara de cría veinte insectos adultos de las especies descritas en el ítem III.B.2., de dos semanas luego de eclosionar, y se colocaron en una placa de Petri. Posteriormente, empleando un pulverizador, se rociaron con suspensiones fúngicas (cultivos control y adaptado de Bb GHA o Bb ARSEF 5500 crecidos en medio sólido) conteniendo 0,01% de Tween 20 en agua destilada estéril. Debido a su mayor tamaño, la inoculación de *U. dermestoides* se llevo a cabo por inmersión de los insectos en las mismas suspensiones durante 6 segundos. Se realizaron al menos 4 repeticiones para cada ensayo. Las concentraciones utilizadas variaron de acuerdo a la cepa fúngica y el insecto empleado, las mismas fueron: 4×10^6 y 8×10^7 conidios/ml para *A. obtectus*, 2×10^6 conidios/ml para *R. dominica* y 1×10^9 conidios/ml para *U. dermestoides*. Los insectos utilizados como control fueron igualmente tratados con 0,01% de Tween 20 en agua destilada estéril. Los ejemplares de cada muestra se mantuvieron en ayuno por 24 horas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa, y luego se transfirieron a recipientes plásticos de 100 ml conteniendo la dieta correspondiente. La misma fue previamente almacenada por 10 días a -15°C para asegurar que estuvieran libres de insectos. Los ejemplares se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas y la mortalidad se chequeó a los 7 y 14 días luego de la exposición a los hongos. Los insectos muertos fueron sucesivamente separados, sumergidos por 1 minuto en etanol 95 %, lavados con agua destilada estéril, secados y mantenidos 5 días en cámara húmeda ($27 \pm 2^\circ\text{C}$). Se registraron como infectados los insectos que mostraron crecimiento hifal característico de hongos entomopatógenos.

III.B.6. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos por los insectos en presencia y ausencia de infección fúngica

III.B.6.a. Microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a CGC-MS

Esta técnica consiste en poner en contacto la fase gaseosa del espacio de cabeza circundante de una muestra sólida o líquida, con una fibra de sílice fundida

recubierta con un material adsorbente y protegida con una aguja de metal (Fig. III.B.2A). La muestra se coloca en un vial de 20 ml con tapa de teflón y septum de goma. Con la aguja de metal se perfora el septum de la tapa del vial y se expone el material adsorbente a la muestra durante un período de tiempo que oscila entre 15 y 30 minutos (Fig. III.B.2B). Se retrae la fibra del vial y se inyecta en el cromatógrafo gaseoso (Fig. III.B.2C). En el inyector del CGC se expone el material adsorbente a altas temperaturas y los analitos se desorben en el interior del mismo. Los diversos materiales adsorbentes que recubren la fibra de sílice se clasifican según su polaridad en: polares (poliacrilato, carbowax-divinilbenceno, carbowax- resina templada), no polares (polidimetilsiloxano), y bipolares (combinación de las anteriores). Esta técnica no requiere de solventes para la extracción y tiene un límite de detección muy bajo, del orden de las partes por trillón (ppt).

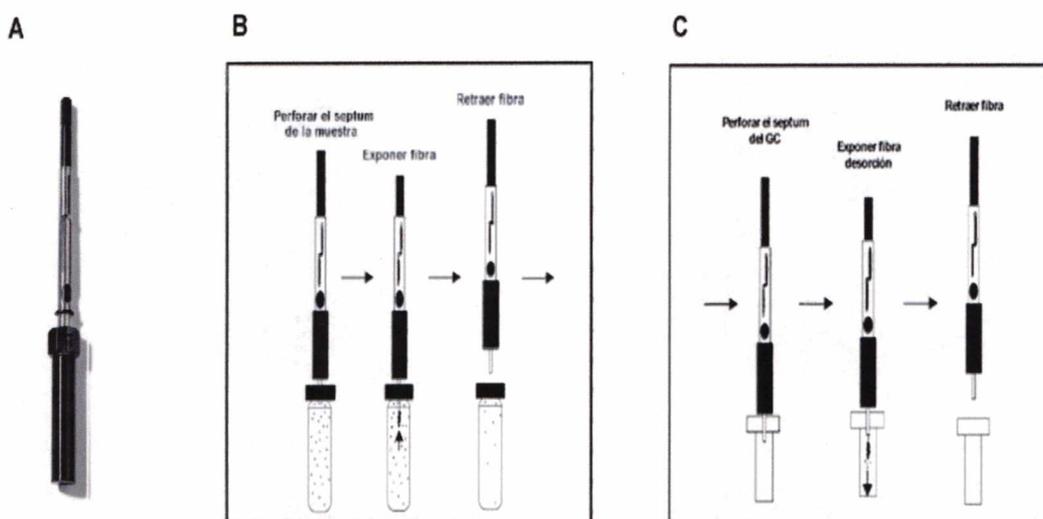


Figura III.B.2: A) Fotografía del dispositivo (holder) para análisis de micro extracción en fase sólida (SPME): la fibra se encuentra protegida por una aguja de metal, que se retrae dentro del holder. B) Procedimiento para la extracción de compuestos volátiles por SPME. C) Desorción de los analitos en el inyector del cromatógrafo gaseoso.

Ejemplares adultos de *U. dermestoides* se trataron con una suspensión fúngica de 1×10^9 con/ml de Bb GHA (cultivo control crecido en medio sólido) y luego de 7 días mantenidos en las condiciones de cría, se colocaron individualmente en viales de

4 ml con septum para SPME y tapa perforada. Cada vial fue agitado por 30 segundos para estimular la liberación de los VOC, y luego la muestra fue analizada por SPME-CGC. Como control se emplearon insectos adultos tratados con agua bidestilada estéril y analizados en similares condiciones. En ambos tratamientos los VOC fueron colectados durante 15 minutos, utilizando una fibra bipolar de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) (65 μm). El análisis de los VOC liberados se realizó en un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 con detector FID utilizando una columna capilar no polar DB-5 (30 mts.; 0,32 mm, 0,25 μm de espesor). El inyector se operó en modo splitless a 250°C, el programa de temperatura del horno fue de 40°C durante 1 minuto y 20°C/minuto hasta 25 0°C.

La identidad de los compuestos se confirmó por SPME-CGC-MS en un equipo Finnigan Polaris Q con trampa iónica (Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro, Olavarría), operado en similares condiciones a las descritas para CGC. La identificación se realizó por interpretación de sus espectros de fragmentación y por comparación con la biblioteca de MS (NIST/EPA/NIH, NIST 98). Los compuestos liberados se cuantificaron según Villaverde et al. (enviado a publicar). En forma resumida, cantidades conocidas de C15:1 y BQ fueron disueltas en 1 μl de hexano (C15:1) y en 1 μl de diclorometano (BQ) dentro de viales de SPME. Cada muestra fue analizada como se describió anteriormente y con los datos obtenidos se trazó una curva de calibración estándar.

III.B.7. Microscopía electrónica de barrido

Se inocularon ejemplares de *A. obtectus*, como se describió en bioensayos, con suspensiones de 1×10^9 conidios/ml de cultivos control y adaptado de Bb GHA crecidos en medio sólido. A las 6 o 24 horas desde la inoculación, las muestras fueron fijadas 1 hora en formol 0.5% y luego 24 horas en formol 1%. El fijador se reemplazó tres veces durante ese período y finalmente se lavó varias veces con agua bidestilada.

La deshidratación se realizó con concentraciones crecientes de etanol absoluto pro análisis: 30, 50, 70, 90 y 100%. Se realizaron tres lavados, de 15-20 minutos cada uno, con cada una de las distintas concentraciones.

Las muestras fueron posteriormente procesadas con el método del punto crítico (Baltec CP 30) y metalizadas con oro paladio en argón en cámara de alto vacío. Distintos campos de la superficie del insecto se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-T100 (Servicio de Microscopía Electrónica, Museo de Ciencias Naturales, UNLP).

III.B.8. Ensayo de zona de inhibición

Suspensiones de Bb GHA (4×10^8 con/ml) fueron uniformemente dispersadas en la superficie de placas de Petri conteniendo MC sólido. Luego de 30 minutos a 26°C, se colocó en el centro de cada placa un disco de papel de filtro estéril (20 mm de diámetro) embebido en un extracto lipídico epicuticular de *U. dermestoides* o *T. castaneum*. Los componentes mayoritarios de estos extractos son las secreciones de las glándulas de defensa, principalmente metil y etil benzoquinonas junto con 1-pentadeceno (Villaverde et al., enviado a publicar). Se ensayaron concentraciones de 0,1 y 0,2 equivalentes de insecto/ μ l diclorometano para *U. dermestoides*, y de 0,3 y 0,6 equivalentes de insecto/ μ l diclorometano para *T. castaneum*. Por otra parte, los mismos experimentos se llevaron a cabo con papeles embebidos en soluciones de benzoquinona (BQ) (4, 12,5 y 25 μ g/ μ l en diclorometano), hidrobenzoquinona (HQ) (4, 12,5 y 25 μ g/ μ l en etanol) y 1-pentadeceno (C15:1) (4, 12,5 y 25 μ g/ μ l en hexano). Como control se emplearon discos embebidos en los respectivos solventes. Luego de incubar las placas durante 3 días a 26°C, se midió el diámetro correspondiente a la inhibición del crecimiento fúngico en torno a los discos de papel.

Capítulo IV

LOS RESULTADOS

**IVA) *Enzimas fúngicas involucradas en
el catabolismo de hidrocarburos***

Estudios bioquímicos

IV.A.1. Actividad acil-CoA oxidasa

La actividad acil-CoA oxidasa se midió en las fracciones subcelulares obtenidas a partir de cultivos control de Bb GHA. El 78% de ésta actividad se encontró en la fracción P_{20.000g}, mientras que el 22% restante correspondió a la fracción S_{20.000g}. Las actividades específicas fueron 14,50 y 0,15 nmoles/min×mg, respectivamente. Estos valores respaldaron la decisión de considerar a la fracción P_{20.000g} como la fracción peroxisomal.

IV.A.2. Actividad catalasa

La actividad específica de catalasa aumentó significativamente (13,6 veces) en la fracción P_{20.000g} de cultivos adaptados respecto a los controles de Bb GHA. Se observó un incremento de actividades desde 14 ± 5 (controles) a 191 ± 52 U/mg (adaptados) ($p < 0,0001$) (Fig. IV.A.1). Inversamente, la actividad específica en la fracción S_{100.000g} se redujo de 118 ± 24 (controles) a 52 ± 10 U/mg (adaptados) ($p < 0,0001$) (Fig. IV.A.1). La actividad en esta última fracción no se alteró luego de varios meses a -70°C , mientras que en similares condiciones no se detectó actividad catalasa en la fracción P_{20.000g}.

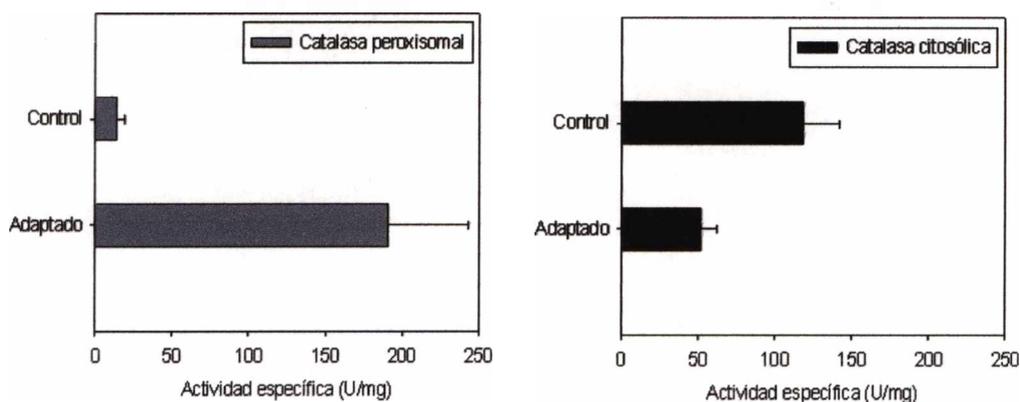


Figura IV.A.1: Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad catalasa en las fracciones peroxisomal y citosólica de *Beauveria bassiana* cepa GHA.

IV.A.3. Purificación de catalasas

La catalasa peroxisomal se purificó 108 veces (con un rendimiento del 20%), la actividad específica se incrementó desde 14,4 hasta 1.559,0 U/mg (Tabla IV.A.1). La purificación de la isoforma citosólica fue de 150 veces, con un rendimiento de 6% y un contenido de catalasa del 0,04% de las proteínas citosólicas totales (Tabla IV.A.1). Por SDS-PAGE se determinaron masas moleculares de 54.7 kDa (Fig. IV.A.2A) y 84.0 kDa (Fig. IV.A.2B) para cada subunidad de las isoformas peroxisomal y citosólica, respectivamente.

Tabla IV.A.1: Purificación de catalasas de *Beauveria bassiana* cepa GHA.

Etapa de purificación	Proteínas totales (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
<i>Catalasa peroxisomal</i>					
P _{20,000g}	16,10	231,8	14,4	1	100
Sonicación	1,60	109,6	68,5	5	47
Superdex 200	0,11	98,2	892,8	62	42
Mono Q	0,03	46,8	1.559,0	108	20
<i>Catalasa citosólica</i>					
S _{100,000g}	441,45	50.413,4	114,2	1	100
Etanol-cloroformo	171,60	40.514,8	236,1	2	80
Precipitación c/ acetona	17,51	34.272,0	1.957,3	17	68
Superdex 200	1,78	10.038,1	5.639,4	49	20
Mono Q	0,16	2.825,5	17.659,5	150	6

Las enzimas se purificaron a partir de 6 gramos (peso húmedo) de cultivos control crecido en MC sólido como se describe en Materiales y métodos.

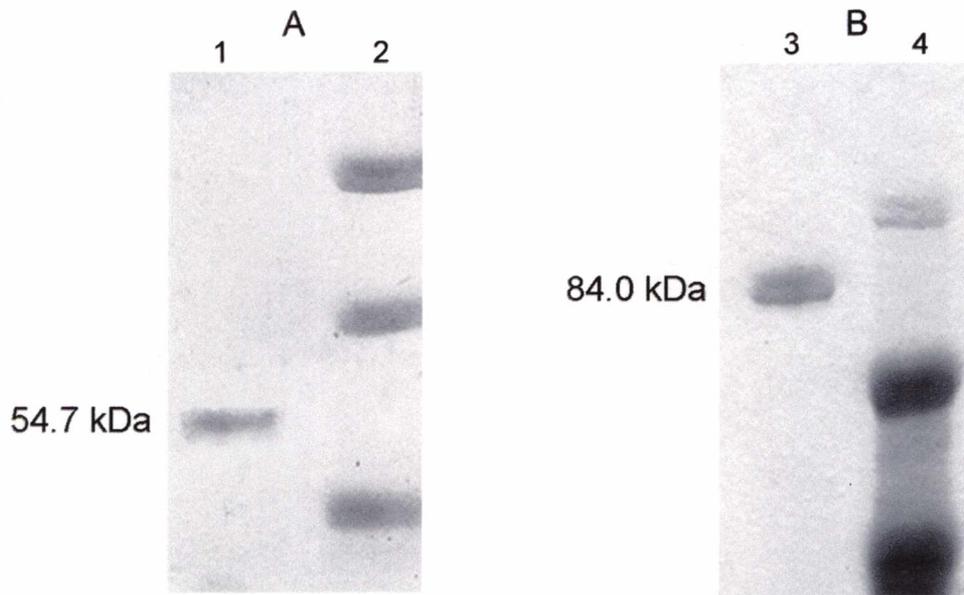


Figura IV.A.2: Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en gels de 10% (A) y 12% (B) de poliacrilamida de las catalasas purificadas de *Beauveria bassiana* cepa GHA. Calle 1, catalasa peroxisomal; calle 3, catalasa citosólica; calles 2 y 4, estándares de masa molecular de 97, 66 y 45 kDa.

IV.A.4. Caracterización de catalasas

La catalasa peroxisomal exhibió un rango estrecho de pH óptimo, con la mayor actividad a pH 7, disminuyendo significativamente a valores de pH menores y mayores (Fig. IV.A.3A). Inversamente, un amplio rango de pH óptimo se observó en la catalasa citosólica, con valores de pH óptimos entre 6 y 10.

La actividad también fue determinada a diferentes temperaturas, los valores óptimos se obtuvieron entre 25 y 37°C para ambas enzimas, aunque se detectó actividad residual a 7°C (31%) y 60°C (40%) en la catalasa citosólica.

La termoestabilidad de ambas isoformas fue ensayada preincubando las enzimas por 5 minutos a diferentes temperaturas. La catalasa citosólica resultó altamente estable hasta los 55°C, y retuvo 35% de actividad a 75°C (Fig. IV.A.3B). La isoforma peroxisomal resultó más sensible al calor, sólo recuperó el 27% de su actividad luego de ser preincubada a 45°C y fue totalmente inactivada luego de igual tratamiento a 75 °C.

El efecto de la concentración de sustrato en la actividad de ambas enzimas se muestra en la Figura IV.A.3C. Incrementando las concentraciones de H₂O₂, la catalasa

citósica mostró máxima actividad a 40 mM, mientras que no se observó pérdida de la misma hasta los 70 mM. La isoforma peroxisomal exhibió la máxima actividad entre concentraciones de H_2O_2 de 20 y 40 mM, mostrando una importante caída de ésta (73%) a 60 mM.

Luego del tratamiento con 3-AT 20 mM, se observó una inhibición del 100% para la catalasa peroxisomal y un 85% para la isoforma citósica (Fig. IV.A.3D). Esta última fue completamente inhibida cuando la concentración de 3-AT se incrementó a 60 mM.

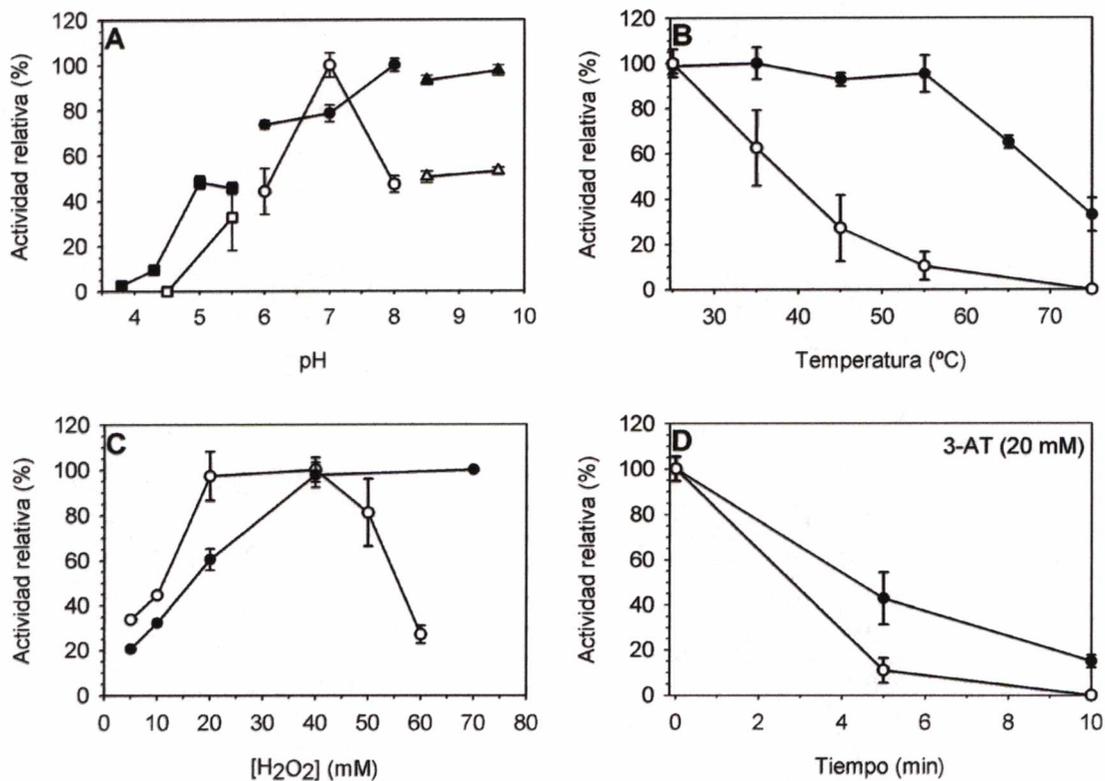


Figura IV.A.3: Efecto del pH (A), temperatura (B), concentración de sustrato (C) y 3-amino-1,2,4 triazol (3-AT) (D) sobre la actividad de las catalasas purificadas de *Beauveria bassiana*. Símbolos negros: catalasa citosólica, símbolos blancos: catalasa peroxisomal. A) La actividad enzimática fue ensayada a diferentes pH, utilizando buffers acetato 50 mM (cuadrados), fosfato 50 mM (círculos) y carbonato 50 mM (triángulos). B) El ensayo de termoestabilidad se realizó preincubando las muestras a las temperaturas indicadas por 5 minutos antes de iniciar la reacción como se describe en Materiales y métodos. C) El efecto de la concentración de sustrato fue analizado hasta 70 mM de H_2O_2 . D) La actividad enzimática fue medida luego de 5 o 10 minutos de incubación en presencia de 3-AT 20 mM, como se describe en Materiales y métodos. Los resultados están expresados como porcentajes de la máxima actividad. Los valores representan las medias de 4 repeticiones \pm error estándar.

IV.A.5. Oxidación microsomal de HC

La fracción microsomal de Bb GHA fue incubada durante 1 hora con [^{14}C] *n*-hexadecano. Luego de separar los metabolitos producidos por radio-TLC, se obtuvo un pico de radiactividad en el punto de siembra donde en el sistema de corrida empleado eluyen los fosfolípidos (Fig. IV.A.4). Evidencias previas en este laboratorio empleando precursores radiactivos (Crespo, 2006) mostraron que ciertos metabolitos quedaban retenidos en el punto de siembra, posiblemente surfactados por los fosfolípidos fúngicos. Debido a este problema técnico, la sílice de esta zona de la placa fue separada por raspado, la correspondiente fracción lipídica fue extraída con éter etílico y concentrada hasta un volumen adecuado. Posteriormente se sembró en una placa de HPTLC de 10 × 10 cm y se desarrolló en un sistema de hexano:éter etílico:ácido fórmico (60:40:2). Luego del revelado se obtuvo un pico con un *R_f* similar al del ácido graso utilizado como estándar (Fig. IV.A.4, inserto).

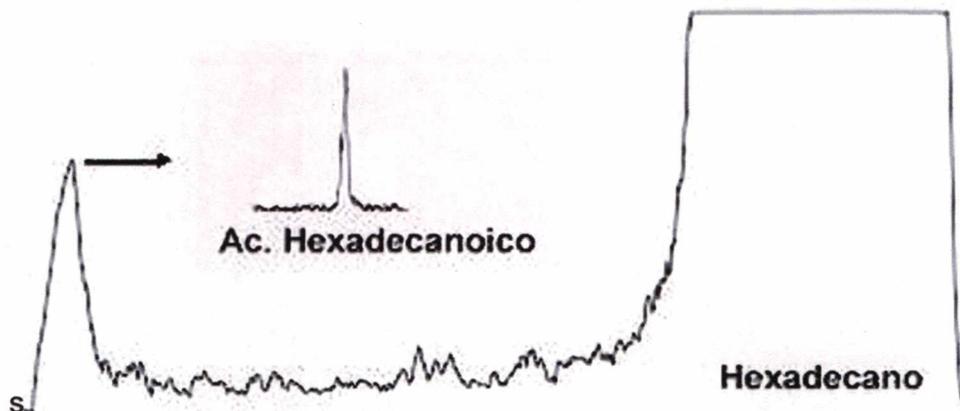


Figura IV.A.4: Oxidación del [^{14}C] *n*-hexadecano por proteínas microsomales. El análisis se realizó por radio-TLC como se describe en Materiales y métodos. En el inserto se muestra el reanálisis por radio-HPTLC del pico obtenido en el punto de siembra (S).

Estudios moleculares

IV.A.6. Extracción de ARN

El ARN se extrajo de cultivos control y adaptados de Bb GHA crecidos durante 7 días en medio líquido como se describe en el ítem III.A.4.a; en estas condiciones se observa un menor crecimiento fúngico en los cultivos adaptados respecto a los controles. A tiempos de incubación más cortos (2-3 días) los cultivos adaptados son visualmente indetectables, mientras que en los controles se observa la formación de abundante micelio. En ambos casos, el ARN obtenido fue de buena calidad para las posteriores aplicaciones, como se ejemplifica en la figura IV.A.5A. Puede observarse las dos bandas de ARN ribosómico 18S y 28S, con una relación aproximada de 2:1 luego de su cuantificación. No se observa la presencia de importante cantidad de ADN.

IV.A.7. Obtención de ADNc

La mayor parte del ADNc sintetizado por LD-PCR mediante la estrategia SMART se encuentra entre los 400 y los 1.500 pb, rango que incluye a la mayoría de los transcritos celulares. No se observan bandeos menores a 300 pb lo que indica ausencia de ADNc sintetizados a partir de transcritos parcialmente degradados (Fig. IV.A.5B).

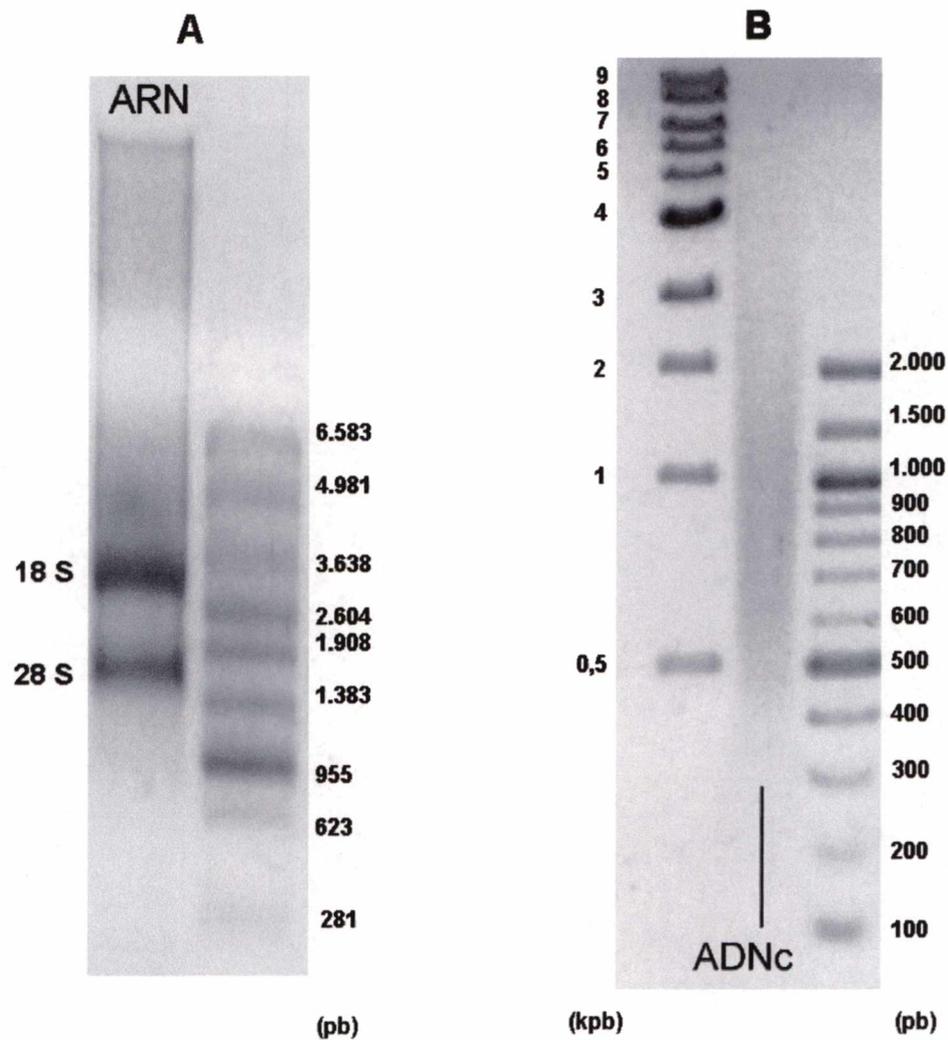


Figura IV.A.5: (A) ARN total de *Beauveria bassiana* cepa GHA, donde se muestran las subunidades mayoritarias de ARNr. Como estándar se utilizó el marcador de Promega RNA Markers. (B) ADNc sintetizado a partir del ARN mostrado en A).

IV.A.8. PCR

Mediante PCR fueron amplificados tres segmentos diferentes utilizando los *primers* específicos AJf/AJr, CNf/CNr, y los *primers* degenerados P450C1/P450E-1. Los amplicones obtenidos se observan como las bandas más intensas de cada uno de los geles de la Figura IV.A.6.

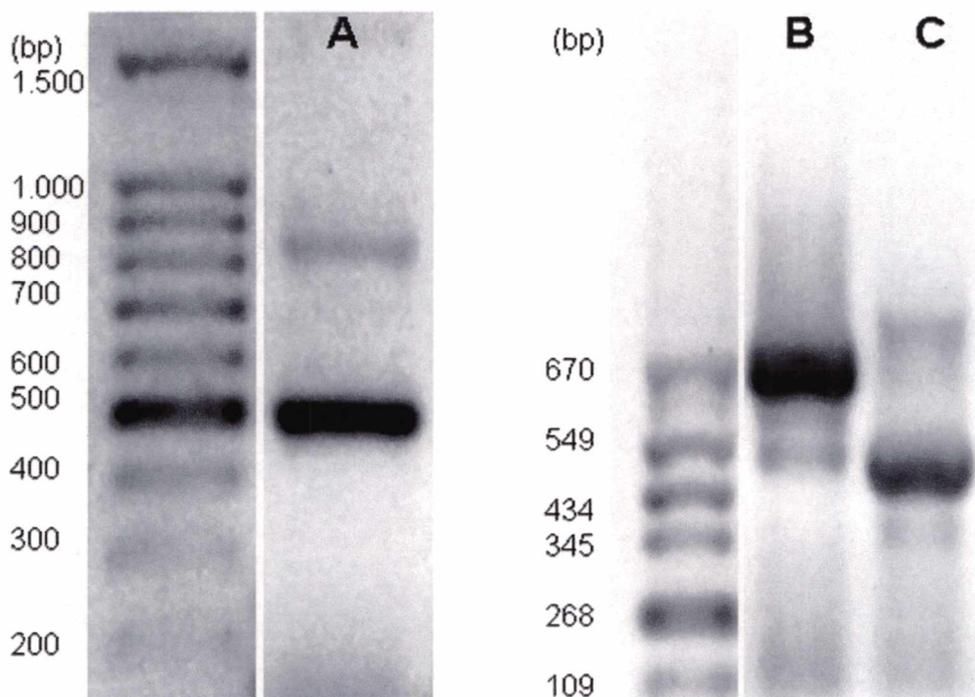


Figura IV.A.6: Geles de agarosa 1% de los fragmentos amplificados por PCR a partir del ADNc obtenido como se describe en Materiales y métodos. Los primers utilizados fueron AJf/AJr (A), P450C1/P450E-1 (B) y CNf/CNr (C).

IV.A.9. Clonado

Luego de realizar las transformaciones de bacterias competentes, y debido a la aparición de bandas inespecíficas (por ej, Fig. IV.A.6A) en los geles corridos con los productos de PCR, los insertos fueron cortados del plásmido utilizando la enzima de restricción Eco RI y corridos en geles de agarosa 1%, para comprobar que los fragmentos clonados sean los esperados (Fig. IV.A.7).

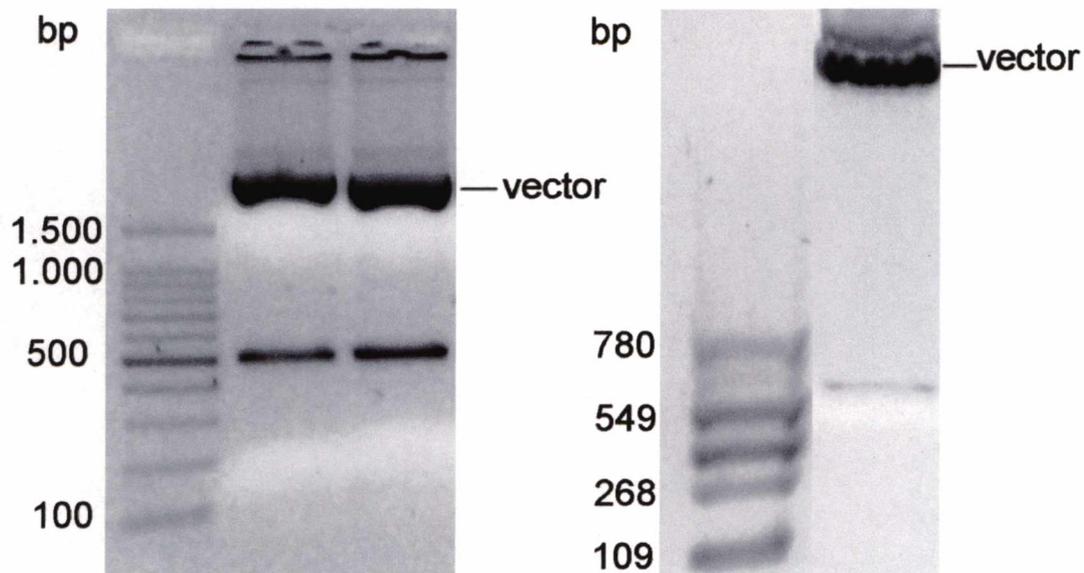


Figura IV.A.7: Geles de agarosa 1 % de los segmentos amplificados y clonados en pGEM T, luego de cortar con Eco RI.

IV.A.10. Secuencias

Las secuencias de los fragmentos clonados fueron las siguientes:

P450C1/P450E-1: 615 bp

```

GGCCGGCCGG  GATACATGCG  CTATCCATCA  ACCCCTCAAC  AAGGAGCCCG  TGATTTAGTG
ACGGACTCAG  CACTGTTCTT  GCCCACCAGC  ACTCGAAAAC  TCGACTGCAT  GCATCGAGAG
CTTGAATCAG  TTTTGGCCGA  GCTGGGCCTT  GCTCATTACC  TCGATGCATT  TGTAGATCAA
GGTTTCGACT  CTTGGGAGAC  CATTCTCGAT  ATCCAAGAGT  CTGACCTGTG  AGTGCTTGCA
CCACGGCCTA  CTCACCTCCC  TCGATCCGTA  TCTAACTTTG  AGAATAGTGA  TGCACCTCGA
GTCAAGCTCG  GCCATCGACG  CGTAAGCAGT  GACCTTACAT  CTTTGCTTGC  CTTTTTATG
CTCACATTTT  TTCCAGAAAC  CTCAAAGGCG  TATAGCCAAT  GCTCGCGGCA  TCGCCCCCAG
CATCTCATT  GTCTCGGCGC  TGAAAGCTGG  GTTCAGAAGA  AGGGCAAGCA  GCAACANCTT
AACGAAAATA  ATCAAACCTG  CTCGGAGGCC  GGCTCTGAGT  CAACAAACGG  TGTGACAAAA
AGGAAATATC  GGNGTCTCAA  AGGGTACGTG  GTCATCATAA  TTACGTTTTT  GGGCCGCCCG
CTGATTGCAC  AGCAA

```

AJf/AJr: 575 bp

```

CAGCAGGTCT  CCAAGGTGAA  CAGCCTCTGG  TTGATAGAAC  AATGTAGATA  AGGGAAGTCG
GCAAAAATAGA  TCCGTAACCT  CGGGATAAGG  ATTGGCTCTA  AGGGTTGGGC  ACGTGGGGCT

```

```

TTGGAAGGAC GCCTCGGGAG CAGGCCGCCA CTAGCCGGGC AACCGGCCGG CGGCAGCCAG
CATCTGGGCG CTGATGTCCT TAGCAGGCTT CGGCCGTCCG GCGTGCGGTT AACAAACCAAC
TTAGAAGTGG TACGGACAAG GGAATCTGA CTGTCTAATT AAGCATAGCA TTGCGATGGC
CAGAAAGTGG TGTGACGCA ATGTGAATTT CTGCCCAGTG CTCTGAATGT CAAAGTGAAG
TAATCAACC AAGCGCGGGT AAACGGCGGG AGTAACTATG ACTCTCTTAA GGTAGCCAAT
GCCTCGTCAT CTAATTAGTG ACGCGCATGA ATGGATTAAC GAGATTCCAC TGCCTATCT
ACTATCTAGC GAAACCACAG CAAGGGAAAT CACTAGTGAA TTCGCGGCCG CCTGCAGGTC
AACNTATNGG AAAGTCCANC GCGTGGATGC NTACC

```

CNf/CNr: 442bp

```

GAATCACTA GTGATCACA CGAGCTGCAC ATACGCGACT CCTTGAGCTG TCGCCCATCG
GGCCCGCCGT GTACGAAAAC ACACAAAACG GGC GCGCCTA TGGCGTGACG AGGACTTGGT
TGCAAGAGGC AAAGCAAAAA TGGCTGCAAG AGTTTACTG GCGCAAGTGC GAAGAGCGCA
TCAACTCGTT TCCCAACTTT AAAGCCAAAG TCAAAGACGC GCATGGCAAC AGTCTTGATC
TTCAC TTTAT GGC ACTATTC TCCGAGAGAA AGGATGCAAT CCCGATTGCA TTCATTCATG
GGTGGCCGAG CTCGTTTGCA TCTTTCATGG ATATCCTGGA CCTCCTCAAG AACAAGTATT
CCCCCAAAGA CTGCCATAC CATGTCATTG TCCCATCGCT GCCAGGCCAT GCCTACTCGT
CTGGCCACC GCTGGAGAAA GA

```

IV.A.11. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas por PCR del ADNc se compararon mediante un alineamiento con las respectivas secuencias a partir de las cuales se diseñaron los *primers* específicos. En el caso del alineamiento entre AJf/AJr y AJ274003 (Fig. IV.A.8A), el programa LALIGN arrojó un 93,3% de identidad entre ambas a lo largo de toda la secuencia, con un score: 2.276 y un E(10,000): $8,7e^{-182}$. Estos resultados permiten afirmar que la secuencia clonada en *B. bassiana* es de una alta homología con un fragmento de citocromo P450 monooxigenasa de *M. anisopliae* obtenida a partir de un EST de este último (Freimoser et al., 2005). La situación es diferente para la comparación entre CNf/CNr y CN809217 (Fig. IV.A.8B), donde sólo se observa un buen alineamiento en 26 nucleótidos (100% identidad, score: 130 E(10,000): 0.0084); lo que indica que esta secuencia amplificada y clonada en *B. bassiana* no es homóloga de la obtenida de la EST de *M. anisopliae*, a partir de la cual los *primers* específicos CNf y CNr fueron diseñados.

A

```

      10      20      30      40      50      60
AJf/AJr  CAGCAGGTCTCCAAGGTGAACAGCCTCTGGTTGATAGAACAAATGTAGATAAGGGAAGTCG
          .....
AJ274003 CAGCAGGTCTCCAAGGTGAACAGCCTCTGGTTGATAGAACAAATGTAGATAAGGGAAGTCG
          10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
AJf/AJr  GCAAAATAGATCCGTAACCTCGGGATAAGGATTGGCTCTAAGGGTTGGGCACGTTGGGCT
          .....
AJ274003 GCAAAATAGATCCGTAACCTCGGGATAAGGATTGGCTCTAAGGGTTGGGTGCGTTGGGCC
          70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
AJf/AJr  TTGGAAGGACGCCTCGGGAGCAGGCCGCCACTAGCCGGGCAACCGGCCGGCGCAGCCAG
          : : : .....
AJ274003 TCGGGGGGACGCCTTGGGAGCAGGCAGCCACTAGCCGGGCAACCGGTTCGGCGGCCGCCAG
          130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
AJf/AJr  CATCTGGGCGCTGATGTCTTAGCAGGCTTCGGCCGTCCGGCGTGCGGTTAAACAACCAAC
          : : : .....
AJ274003 CATCCGAGCGCTGAATCCCTTGGCAGGCTTCGGCCGTCCGGCGCACGATTAACAACCAAC
          190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290
AJf/AJr  TTAGAACTGGTACGGACAAGGGGAATCTGACTGTCTAATTAAG-CATAGCATTGCGATGG
          .....
AJ274003 TTAGAACTGGTACGGACAAGGGGAATCTGACTGTCTAATTAACATAGCATTGCGATGG
          250     260     270     280     290     300

      300     310     320     330     340     350
AJf/AJr  CCAGAAAGTGGTGTGACGCAATGTGAATTTCTGCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGAA
          .....
AJ274003 CCAGAAAGTGGTGTGACGCAATGTGA-TTTCTGCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGAA
          310     320     330     340     350     360

      360     370     380     390     400     410
AJf/AJr  GTAATTCAACCAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTCTTAAGGTAGCCAA
          .....
AJ274003 GTAATTCAACCAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTCTTAAGGTAGCCAA
          370     380     390     400     410     420

      420     430     440     450     460     470
AJf/AJr  -TGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCC-CTGTCC-T
          .....
AJ274003 ATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCCACTGTCCCT
          430     440     450     460     470     480

      480     490     500     510     520
AJf/AJr  ATCTACTATCTAGCGAAACCACAGC-AAGGGAAATCACTAGT--GAATTCGCGG
          .....
AJ274003 ATCTACTATCTAGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGGCAGAATCAGCGG
          490     500     510     520     530
    
```

B

```

          20      30      40
CNf/CNr  CACACGAGCTGCACATACGCGACTCC
          : : : : : : : : : : : : : : : :
CN809217 CACACGAGCTGCACATACGCGACTCC
          340      350

```

Figura IV.A.8: Alineamiento entre la secuencias obtenidas del fragmento amplificado con los primers AJf/AJr (A) y CNf/CNr (B) y las que se utilizaron para diseñar los respectivos *primers* (GenBank AJ274003) (A) y (GenBank CN809217) (B).

Luego de analizar las secuencias vía BLASTx, los resultados estadísticamente más significativos que se obtuvieron para la secuencia amplificada con los *primers* AJf/AJr fueron:

BLASTX 2.2.14 [May-07-2006]

Query= Length:575

Sequences producing significant alignments:

	Score (Bits)	E Value
dbj BAA10929.1 cytochrome P450 like_TBP [Nicotiana tabacum]	80.2	1e ⁻²⁷
emb CAH00939.1 unnamed protein product [Kluyveromyces lactis...]	100	1e ⁻¹⁹
emb CAH00931.1 unnamed protein product [Kluyveromyces lactis...]	97.0	9e ⁻¹⁹
ref XP_359943.1 predicted protein [Magnaporthe grisea 70-15]	88.4	4e ⁻¹⁶
qb EAT89282.1 hypothetical protein SNOG_04077 [Phaeosphaeria]	76.7	1e ⁻¹²
qb EAT89262.1 hypothetical protein SNOG_04057 [Phaeosphaeria]	76.7	1e ⁻¹²
qb EAT89272.1 hypothetical protein SNOG_04067 [Phaeosphaeria]	76.3	2e ⁻¹²
pir T02955 probable cytochrome P450 monooxygenase - maize	75.4	3e ⁻¹²
ref XP_729762.1 senescence-associated protein [Plasmodium yo...]	67.2	5e ⁻¹²
qb AAR25996.1 cytochrome P450 monooxygenase [Pyrus communis]	74.1	7e ⁻¹²

Para la secuencia amplificada con los *primers* CNf/CNr los mejores alineamientos obtenidos fueron:

BLASTX 2.2.14 [May-07-2006]

Query= Length:442

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 83766166 dbj BAE56309.1 unnamed protein product [Aspergillus	188	2e ⁻⁴⁶
gi 62255512 gb AAX78198.1 epoxide hydrolase [Aspergillus nig...	182	1e ⁻⁴⁴
gi 71000006 ref XP_754720.1 epoxide hydrolase [Aspergillus f...	182	1e ⁻⁴⁴
gi 6165234 emb CAB59813.1 epoxide hydrolase [Aspergillus nig...	181	2e ⁻⁴⁴
gi 7245813 pdb 1QO7 B Chain B, Structure of Aspergillus Niger...	181	2e ⁻⁴⁴
gi 93103251 gb ABE98162.1 epoxide hydrolase [Aspergillus niger]	181	3e ⁻⁴⁴
gi 111069376 gb EAT90496.1 hypothetical protein SNOG_02284 [Pha	181	3e ⁻⁴⁴
gi 93103257 gb ABE98163.1 epoxide hydrolase [Aspergillus niger]	179	7e ⁻⁴⁴
gi 39942614 ref XP_360844.1 hypothetical protein MG03387.4 [Mag	179	1e ⁻⁴³
gi 111059991 gb EAT81111.1 hypothetical protein SNOG_11403 [Pha	176	8e ⁻⁴³

Mientras que para la secuencia amplificada con los *primers* degenerados P450C1/P450E-1, los mejores alineamientos fueron:

BLASTX 2.2.14 [May-07-2006]

Query= Length: 615

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 46125477 ref XP_387292.1 hypothetical protein FG07116.1 [...	87.5	2e ⁻²¹
gi 85110964 ref XP_963712.1 hypothetical protein [Neurospora...	84.1	1e ⁻¹⁸
gi 39951997 ref XP_363715.1 hypothetical protein MG01641.4 [Mag	81.0	8e ⁻¹⁸
gi 111067759 gb EAT88879.1 hypothetical protein SNOG_03674 [Pha	67.2	9e ⁻¹⁰
gi 111070245 gb EAT91365.1 hypothetical protein SNOG_01716 [Pha	51.3	6e ⁻⁰⁵

Estos resultados indican que si bien la secuencia amplificada con AJf/AJr fue un segmento del gen esperado (P450), no sucedió lo mismo con la amplificada con los *primers* CNf/CNr, a partir de los cuales se obtuvo el fragmento de un gen homólogo a una epóxido hidrolasa (EH). En el caso de la secuencia obtenida a partir de los *primers* degenerados, los mejores alineamientos coinciden con proteínas no identificadas de los hongos filamentosos *Fusarium graminearum*, *N. crassa*, *Magnaporthe grisea* y

Phaeosphaeria nodorum. Cuando esta secuencia se comparó mediante un alineamiento múltiple con las secuencias de P450alk de levaduras que les dieron origen, la homología fue del 16,3% (dato no mostrado). Esta comparación también se realizó con secuencias de P450's de hongos filamentosos. Debido a la ausencia de reportes de P450alk en estos organismos, se eligieron secuencias de P450 que catalicen reacciones similares. Por esto se compararon con secuencias pertenecientes a la familia CYP53, involucradas en la hidroxilación del benzoato. En la Figura IV.A.9 se muestra un árbol filogenético de las secuencias comparadas. El alineamiento múltiple (Fig. IV.A.10) se realizó contra las siguientes secuencias de ADNc: CYP53A1 de *A. niger* (GenBank X52521), CYP53A3 de *A. nidulans* (GenBank AY048583) y CYP53B1 de *Rhodotorula minuta* (GenBank D63703). El análisis arrojó un 30,9% de homología de secuencia, por lo que de aquí en adelante se hará referencia a este segmento como *53like*.

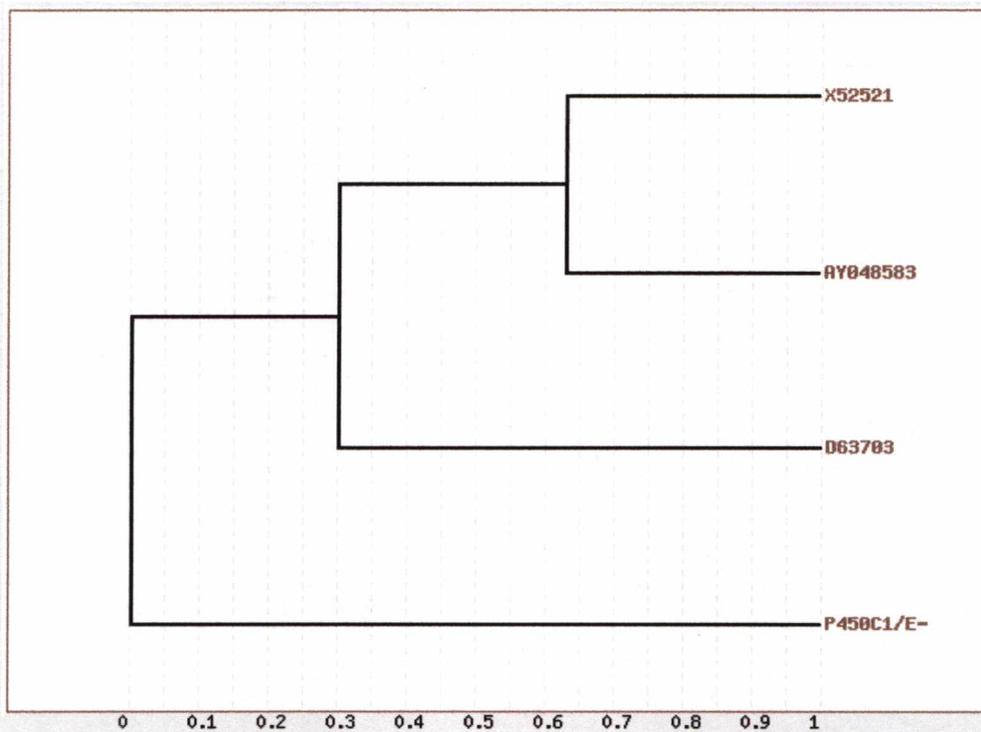


Figura IV.A.9: Análisis filogenético de la familia CYP53 donde se incluye a la secuencia clonada de *Beauveria bassiana* (P450C1/E-1). X52521: CYP53A1 de *Aspergillus niger*, AY048583: CYP53A3 de *A. nidulans*, D63703: CYP53B1 de *Rhodotorula minuta*. El árbol filogenético fue generado con el programa AliBee.

Dentro de estas 3 secuencias pertenecientes a la familia *CYP53*, la mayor similitud encontrada fue con *CYP53A1* de *A. niger*, cuyo alineamiento (Fig. IV.A.11) mostró un 54,3% de identidad en un solapamiento de 444 nucleótidos, con un score: 183 y un E(10,000): 8,5e⁻⁰⁷.

```

      430      440      450      460      470      480
X52521  GAGCAGTACATCCACGGC--AACATCGAGCTCTTTGTCAAGCAATGGAACC-GCATGGCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 GCGCTATCCATCAACCCCTCAACAAGGAGCCCGTGATTTAGTGACGGACTCAGCACTGTT
      20      30      40      50      60      70

      490      500      510      520      530
X52521  GATACCCAGCGCAACCCCAAGACTGGGTTTCGCCAGCCTGGACGCCCTGAACTGGTTCAA-
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 CCTGCCACCCGACACTCGAAAACCTCGACT-GCATGCATCGAGAGCTTGAATCAGTTTTTG
      80      90      100      110      120      130

      540      550      560      570      580      590
X52521  -CTA-CTTGGCTTTTGACATCA--TCGGTGACTTGGCCTTTGGCGCT-----CCCTTCGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 CCGAGCTGGGCCTTGCTCATTACCTCGATGCATTTGTAGATCAAGGTTTCGACTCTTGGG
      140      150      160      170      180      190

      600      610      620      630      640
X52521  ----CATGCTTGACAAGGGCAAG-GACTTCGCCGAGA-TGC--GCAAGACTCCCAGCTCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 AGACCATTCTCGATATC--CAAGAGTCTGACCTGTGAGTGCTTGCACCACGGCCTACTCA
      200      210      220      230      240      250

      650      660      670      680      690
X52521  CCTCCTTCC-TACGT--CCAAGCCGTCGAGG-TCCTCAACCGC-CGCGGTGAAGTCTCCG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 CCTCCCTCGATCCGTATCTAA--CTTTGAGAATAGTGATGCACTCGGAGTCAAG-CTCGG
      260      270      280      290      300      310

      700      710      720      730      740      750
X52521  CCACCCTGGGCTGCTACCCGG---CCTTGAAGCCCT--TTGCCAAGTATCTCCCCGACAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 CCATC---GACGCGTAAGCAGTGACCTTACATCTTTGCTTGCCATTTTATGCTC-ACAT
      320      330      340      350      360

      760      770      780      790      800      810
X52521  TTTCTTCCGTGATGGTATCCAAGCCGTCGAGGACCTGGCTGGTATTGCCGTCGCCCGCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 TTTTCCAGAAACC---TCAAAGCGTATAGCCAATG-CTCGC---GGCATCGCCCCCAG
      370      380      390      400      410      420

      820      830
X52521  CAACGAAC--GTCTCCGCCCGGAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P450C1E-1 CATCTCATTAGTCTCGGCGCTGAA
      430      440

```

Figura IV.A.11: Alineamiento entre la secuencia P450C1/E-1 de *Beauveria bassiana* y el gen *CYP53A1* de *Aspergillus niger* (GenBank X52521).

IV.A.12. Expresión diferencial

La expresión de los 3 genes cuyos fragmentos fueron clonados de Bb GHA se estudió en cultivos control y adaptados a crecer en *n*-octacosano. En ambos casos los hongos fueron crecidos en medio líquido durante 7 días. Tanto por *Northern blot* como por RTi-PCR se comprobó que la β -tubulina, gen usado inicialmente como referencia para normalizar los valores de los genes de interés, se expresó en promedio más de dos veces en cultivos adaptados respecto a los controles, por lo que invalidó los resultados obtenidos para los demás genes al no poderse normalizar la expresión de éstos. El nivel de expresión para la β -tubulina en los ensayos de RTi-PCR se calculó en base a la cuantificación de ADNc en cada muestra. La misma metodología se utilizó con el gen del ARNr de la subunidad 18S ribosomal, obteniéndose en ambos cultivos similares valores de expresión, por lo que se empleó este gen para normalizar los valores de los genes EH, P450 y 53*like*. La longitud de los amplicones, así como la ausencia de productos inespecíficos, se comprobó mediante electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa 1% (Fig. IV.A.12). En la Fig. IV.A.13 se muestran a modo de ejemplo algunas de las curvas de RTi-PCR y curvas estándar utilizadas para cuantificar los transcritos, observándose en todos los casos buenos coeficientes de regresión ($r^2 > 0,98$). La cantidad inicial del transcripto EH fue significativamente mayor (2,7 veces) en cultivos adaptados respecto a los controles ($p = 0.0288$). Por otra parte, los valores iniciales de transcritos P450 y 53*like* no variaron significativamente entre ambas condiciones de cultivo, con una relación adaptado/control de 1,0 y 1,1 respectivamente (Fig. IV.A.14).

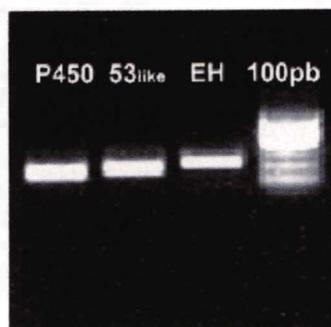


Figura IV.A.12: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR amplificados a partir de ADNc con los *primers* indicados.

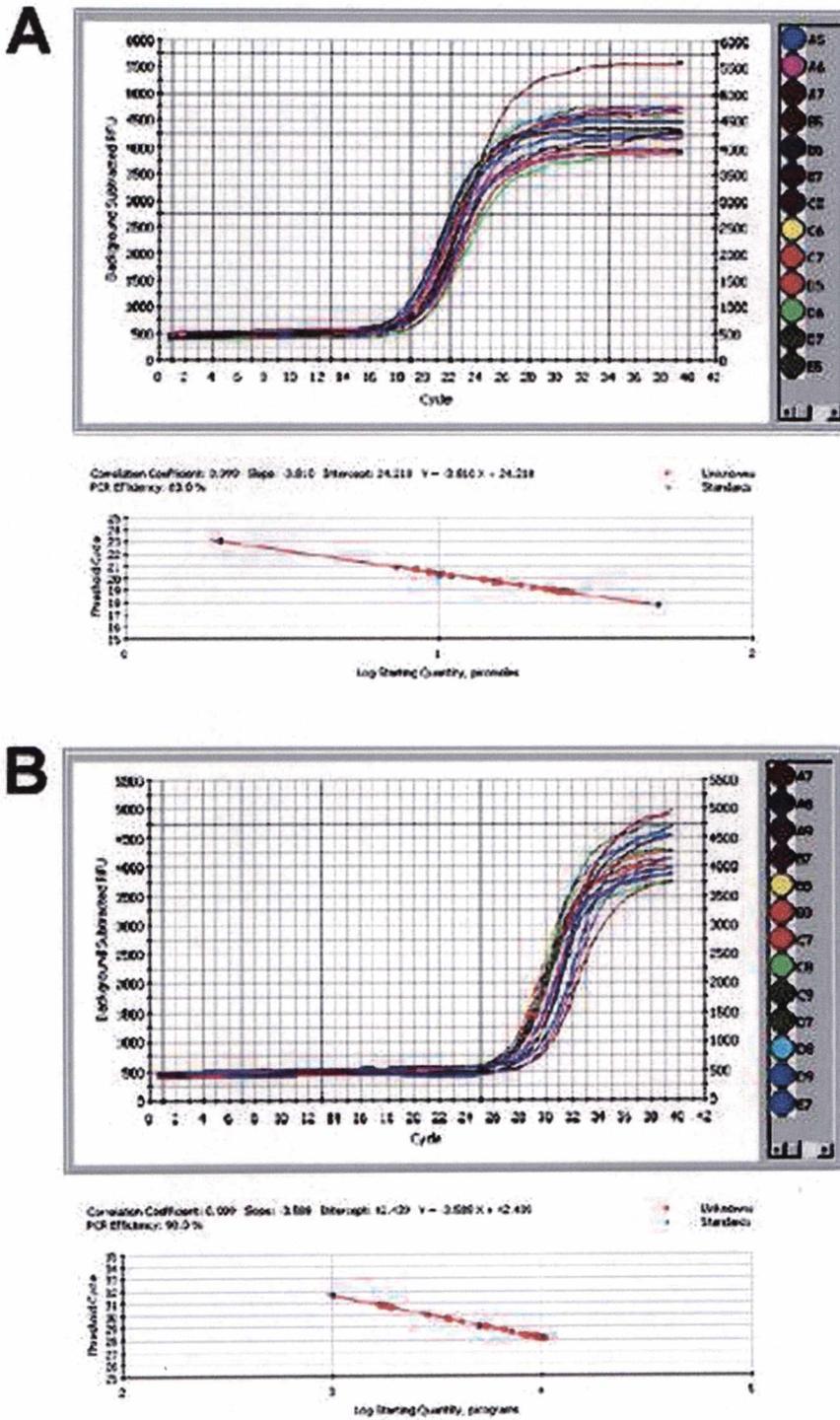


Figura IV.A.13: Curvas de RTi-PCR (unidades de fluorescencia vs. número de ciclos) y curvas estándar (Ct vs. log transcritos iniciales (pg)) para los genes 18S (A) y EH (B).

Ct: ciclo umbral.

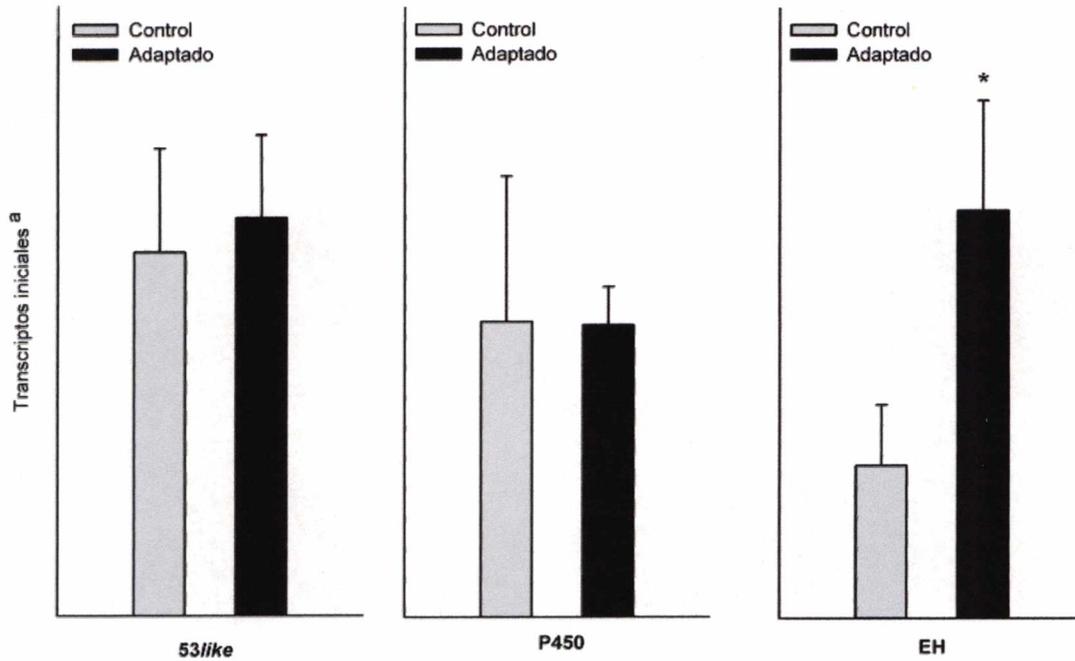


Figura IV.A.14: Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los genes *53like*, *P450* y *EH* de *Beauveria bassiana* cepa GHA.

^a El número de transcritos iniciales de cada gen fue medido por RTi-PCR en cultivos de 7 días y normalizado con respecto al gen de referencia 18S como se describe en Materiales y métodos.

Los datos corresponden a los valores promedio \pm error estándar de 3 réplicas biológicas de 3 repeticiones cada una. El asterisco representa diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de *t*-student entre cultivos control y adaptado (*n*-octacosano).

**IVB) *Interacción hongo entomopatógeno –
cutícula del insecto hospedador***

IV.B.1. Análisis de lípidos de insecto

La composición lipídica total de los insectos analizados por TLC reveló diferencias cualitativas entre ambas especies. En *U. dermestoides* los HC fueron la fracción más abundante. En la Figura IV.B.1A se observa que éstos corrieron como dos bandas de similares R_f en las condiciones de desarrollo. También se detectaron pequeñas cantidades de ceras, ácidos grasos libres, alcoholes grasos, diacilglicéridos, esteroides y lípidos polares (Fig. IV.B.1A). En tanto, en *A. obtectus* se observó una composición más variada, con ésteres de colesterol, triacilglicéridos, ácidos grasos libres, alcoholes grasos y lípidos polares como los componentes mayoritarios; y menores cantidades de esteroides, diacilglicéridos e HC (Fig. IV.B.1B).

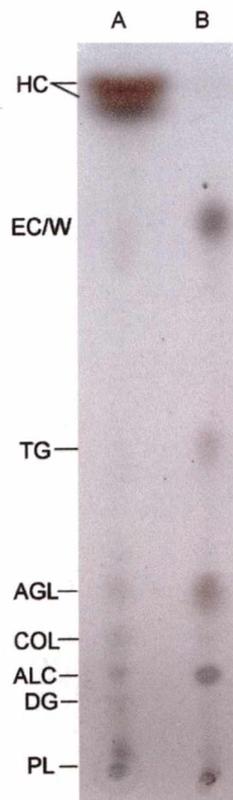


Figura IV.B.1: Cromatografía en capa fina de los lípidos totales de *Ulomoides dermestoides* (A) y *Acanthoscelides obtectus* (B). Los sistemas de desarrollo utilizados fueron hexano en primer término y luego hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). Los componentes se identificaron corriendo en la misma placa los correspondientes estándares. HC: hidrocarburos, EC: ésteres de colesterol, W: ceras, TG: triacilglicéridos, AGL: ácidos grasos libres, COL: colesterol y otros esteroides, ALC: alcoholes grasos, DG: diacilglicéridos, PL: lípidos polares.

IV.B.2. Análisis de hidrocarburos de insecto

La fracción de HC de ambos insectos fue analizada por TLC de sílica gel impregnada con NO_3Ag para investigar la presencia de compuestos insaturados. Los mismos no fueron detectados en *A. obtectus* (Fig. IV.B.2) y su ausencia fue luego confirmada por MS. En *U. dermestoides* fue posible separar las dos bandas de HC mostradas en la Figura IV.B.1, observándose una mayor abundancia de HC insaturados (Fig. IV.B.2B).

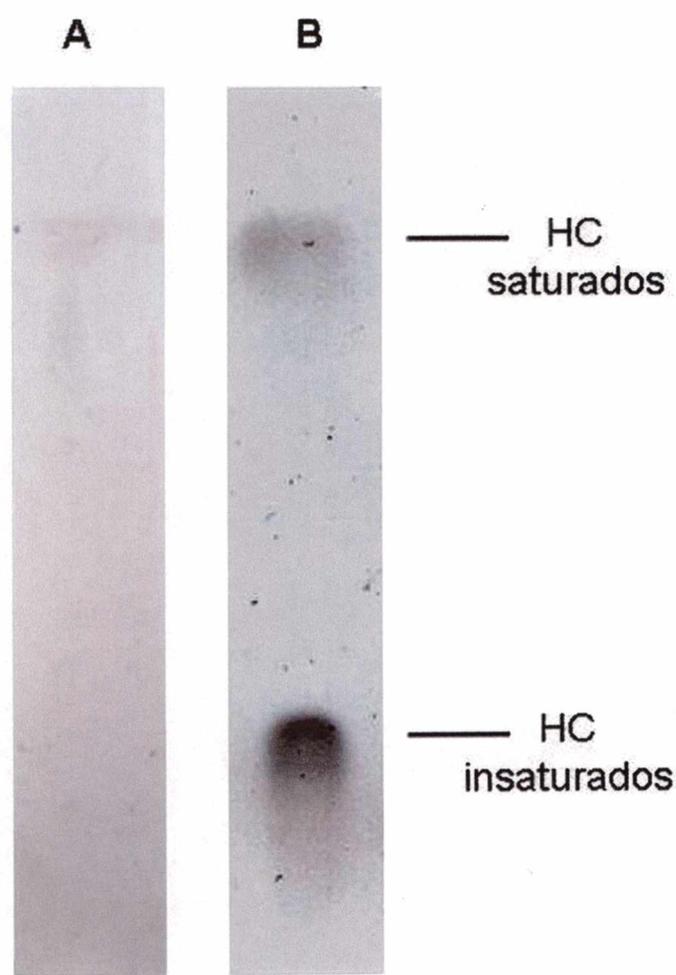


Figura IV.B.2: Cromatografía en capa fina de los hidrocarburos epicuticulares de *Acanthoscelides obtectus* (A) y *Ulomoides dermestoides* (B). La palca de sílica gel fue previamente impregnada con NO_3Ag (20% en acetonitrilo) y luego desarrollada con hexano. Los componentes se identificaron corriendo en la misma placa los estándares de *n*-C16, *n*-C28, *n*-C15:1 y *n*-C23:1.

A. *obtectus*. El análisis por CGC y CGC-MS (filtro de masa cuadrupolo) de los HC epicuticulares mostró una serie de *n*-alcanos con longitud de cadena entre 25 y 31 carbonos. Predominaron HC metil-ramificados con cadenas lineales de 27 y 29 átomos de carbono, siendo el 9,13-dimetil heptacosano el componente más abundante ($24,30 \pm 0,86\%$) (Fig. IV.B.3). Los iones diagnóstico que respaldan la identificación fueron los siguientes: 352 (*n*-C₂₅); 112/113, 280/281, 366 (7-metil C₂₅); 84/85, 308/309, 366 (5-metil C₂₅); 308/309, 336/337, 366 (3-metil C₂₅); 84/85, 154/155, 252/253, 322/323 (5,9 dimetil C₂₅); 366 (*n*-C₂₆); 140/141, 266/267, 168/169, 238/239 (9- + 11-metil C₂₆); 98/99, 308/309 (6-metil C₂₆); 84/85, 322/323 (5-metil C₂₆); 308/309, 336/337 (4-metil C₂₆); 140/141, 210/211, 280/281 (9,13-dimetil C₂₆); 98/99, 168/169, 252/253, 322/323, 350/351 (6,10-dimetil C₂₆ + 3-metil C₂₆); 380 (*n*-C₂₇); 140/141, 168/169, 252/253, 280/281 (9- + 11-metil C₂₇); 84/85, 308/309, 336/337 (5-metil C₂₇); 140/141, 210/211, 224/225, 294/295 (9,13-dimetil C₂₇); 336/337, 364/365 (3-metil C₂₇); 84/85, 154/155, 280/281, 350/351, 182/183, 252/253 (5,9-dimetil C₂₇ + 5,11-dimetil C₂₇); 394 (*n*-C₂₈); 84/85, 154/155, 224/225, 294/295, 364/365 (5,9,13-trimetil C₂₇); 154/155, 280/281 (10-metil C₂₈); 154/155, 224/225, 294/295 (10,14-dimetil C₂₈); 98/99, 168/169, 280/281, 350/351 (6,10- + 6,18-dimetil C₂₈); 408 (*n*-C₂₉); 168/169, 196/197, 252/253, 280/281 (11- + 13-metil C₂₉); 140/141, 168/169, 210/211, 224/225, 238/239, 252/253, 294/295, 322/323 (9,11- + 11,13-dimetil C₂₉); 112/113, 182/183, 280/281, 350/351 (7,11-dimetil C₂₉); 84/85, 154/155, 182/183, 280/281, 308/309, 378/379 (5,11- + 5,9-dimetil C₂₉); 364/365, 392/393 (3-metil C₂₉); 84/85, 154/155, 224/225, 252/253, 322/323, 392/393 (5,9,11-trimetil C₂₉); 436 (*n*-C₃₁). En la Tabla IV.B.1 se detallan las cantidades relativas de los HC tanto en la epicutícula como en el insecto entero (en su mayoría provenientes de hemolinfa e integumento). No se detectaron diferencias cualitativas en ambas composiciones, evidenciado por sus idénticos IK. Los cambios cuantitativos más importantes se observaron en la relación ramificados/lineales, que se incrementó desde 3,43 en epicutícula hasta 5,65 en los extractos de insecto entero, probablemente debido a la mayor cantidad de HC ramificados presentes en la hemolinfa.

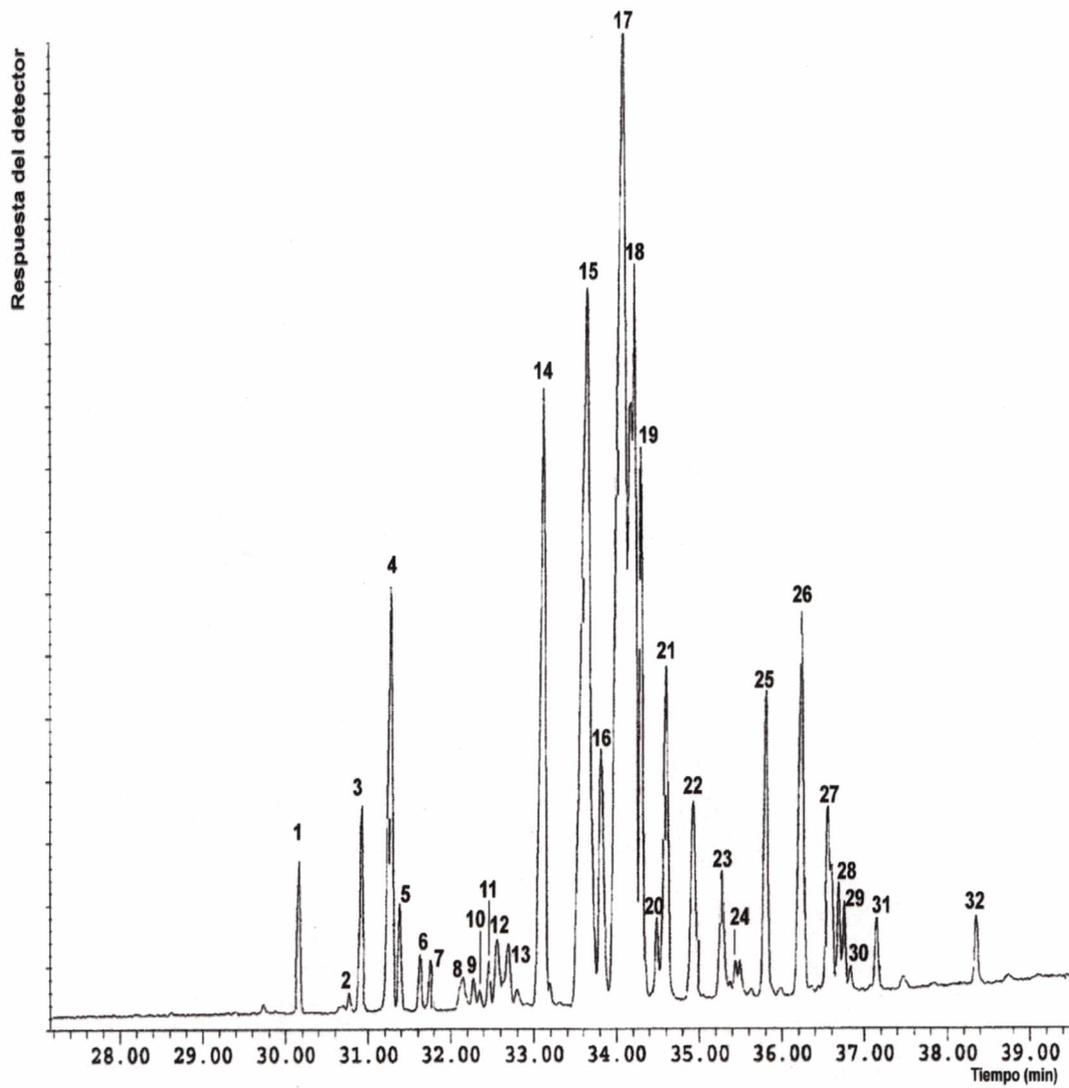


Figura IV.B.3: Perfil cromatográfico de los hidrocarburos epicuticulares de *Acanthoscelides obtectus*

Tabla IV.B.1: Composición porcentual de los hidrocarburos de *Acanthoscelides obtectus*

Pico ^a	Hidrocarburo ^b	Índice de Kovats	Abundancia (% ± EE) ^c	
			Epicutícula	Insecto entero
1	<i>n</i> -C ₂₅	2500	1,54 ± 0,19	1,20 ± 0,01
2	7-metil C ₂₅	2540	tr	tr
3	5-metil C ₂₅	2549	1,07 ± 0,03	1,83 ± 0,04
4	3-metil C ₂₅	2570	3,33 ± 0,11	5,89 ± 0,09
5	5,9-dimetil C ₂₅	2580		
6	<i>n</i> -C ₂₆	2600	tr	tr
7	no identificado	2607	tr	tr
8	9-metil C ₂₆ + 11-metil C ₂₆	2635	tr	tr
9	6-metil C ₂₆	2644	tr	tr
10	5-metil C ₂₆	2649	tr	tr
11	4-metil C ₂₆	2656	tr	tr
12	9,13-dimetil C ₂₆	2663	tr	tr
13	6,10-dimetil C ₂₆ + 3-metil C ₂₆	2672	tr	tr
14	<i>n</i> -C ₂₇	2700	14,65 ± 0,14	9,42 ± 0,22
15	9-metil + 11-metil C ₂₇	2736	16,24 ± 0,41	16,19 ± 0,19
16	5-metil C ₂₇	2750	1,62 ± 0,26	3,17 ± 0,03
17	9,13-dimetil C ₂₇	2765	24,30 ± 0,86	22,76 ± 0,04
18	3-metil C ₂₇	2774	12,28 ± 0,83	14,82 ± 0,18
19	5,9-dimetil + 5,11- dimetil C ₂₇	2782	3,75 ± 0,07	4,34 ± 0,02
20	<i>n</i> -C ₂₈	2800	1,09 ± 0,08	0,79 ± 0,03
21	5,9,13-trimetil C ₂₇	2808	2,97 ± 0,08	3,85 ± 0,02
22	10-metil C ₂₈	2834	2,23 ± 0,04	2,26 ± 0,01
23	10,14-dimetil C ₂₈	2861	1,61 ± 0,05	1,45 ± 0,02
24	6,10-dimetil + 6,18-dimetil C ₂₈	2872	tr	tr
25	<i>n</i> -C ₂₉	2900	5,29 ± 0,25	3,65 ± 0,15
26	11-metil + 13-metil C ₂₉	2928	4,18 ± 0,09	4,57 ± 0,04
27	9,11-dimetil + 11,13 dimetil C ₂₉	2955	2,66 ± 0,05	4,17 ± 0,41

28	7,11-dimetil C ₂₉	2964	1,2 ± 0,10	1,16 ± 0,26
29	5,11-dimetil + 5,9-dimetil C ₂₉	2975	tr	tr
30	3-metil C ₂₉	2979	tr	tr
31	5,9,11-trimetil C ₂₉	3005	tr	tr
32	<i>n</i> -C ₃₁	3100	tr	tr
Ramificados/lineales			3,43	5,65

^a Los números corresponden a los picos de la figura IV.B.3.

^b Los HC se identificaron en base a sus IK y a sus patrones de ruptura por CGC-MS. Cuando se indica más de un HC por pico, el primero que se nombra es el más abundante.

^c Los valores representan las medias de 4 repeticiones ± error estándar.

tr: trazas.

U. dermestoides. Para el análisis de la estructura de los HC se empleó un espectrómetro de masa con trampa iónica operado a baja energía de ionización, lo que permitió detectar claramente los iones moleculares. Analizando los perfiles cromatográficos, es posible agrupar los HC en dos fracciones: la primera, que eluye con tiempos de retención menores a 5 min, corresponde a HC insaturados de entre 13 y 15 átomos de carbono (Fig. IV.B.4 inserto, Tabla IV.B.2); mientras que el otro grupo, de mayor peso molecular, incluye una gran variedad de estructuras saturadas, insaturadas y/o ramificadas, con longitudes de cadena de entre 23 y 37 átomos de carbono (Fig. IV.B.4, Tabla IV.B.2). El HC más abundante fue el 1-pentadeceno ($24,6 \pm 5,2\%$), seguido por el pentacosano ($17,6 \pm 1,2\%$) y un componente diinsaturado de 26 átomos de carbono ($15,7 \pm 1,0\%$). Los fragmentos iónicos obtenidos (67, 81, 95, etc.) así como el tamaño del ión molecular (362) junto con el correspondiente valor del IK indicaron que éste último se trata de un HC diinsaturado de 25 átomos de carbono en su estructura lineal, con un grupo metilo insertado en posición terminal. También fueron importantes los HC saturados de 23 y 27 átomos de carbono, así como las menores cantidades de los HC mono y diinsaturados de 35 y 37 átomos de carbono. Según se desprende de sus IK (Tabla IV.B.2), los dobles enlaces de estos compuestos se ubicarían en posiciones internas de la cadena; a diferencia del C_{15:1} donde la insaturación se ubica en el C1, posición confirmada luego de correr un estándar de 1-

pentadeceno en idénticas condiciones, coincidiendo con la estructura reportada en *T. castaneum* (Baker et al. 1978; Peschke y Eisner, 1987). Los iones diagnóstico que respaldan la identificación de todos los compuestos fueron los siguientes: 182 ($n\text{-C}_{13:1}$); 196 ($n\text{-C}_{14:1}$); 208 ($n\text{-C}_{15:2}$); 210 ($n\text{-C}_{15:1}$); 324 ($n\text{-C}_{23}$); 338 ($n\text{-C}_{24}$); 348 (monometil terminal- $\text{C}_{24:2}$); 352 ($n\text{-C}_{25}$); 362 (monometil terminal- $\text{C}_{25:2}$), 366 (monometil terminal- C_{25}); 380 ($n\text{-C}_{27}$); 394 (monometil terminal- C_{27}); 394 ($n\text{-C}_{28}$); 408 ($n\text{-C}_{29}$); 436 ($n\text{-C}_{31}$); 450 ($n\text{-C}_{32}$); 462 ($n\text{-C}_{33:1}$), 464 ($n\text{-C}_{33}$); 168/169, 336/337 (11-metil C_{33}); 492 (dimetil interno- C_{33}); 488 ($n\text{-C}_{35:2}$); 490 ($n\text{-C}_{35:1}$); 492 ($n\text{-C}_{35}$); 168/169, 196/197, 224/225, 252/253, 280/281, 308/309, 336/337, 364/365 (13-+15-+11-+17-metil C_{35}); 168/169, 196/197, 224/225, 322/323, 350/351, 378/379 (13,23-+13,21-+11,23-dimetil C_{35}).

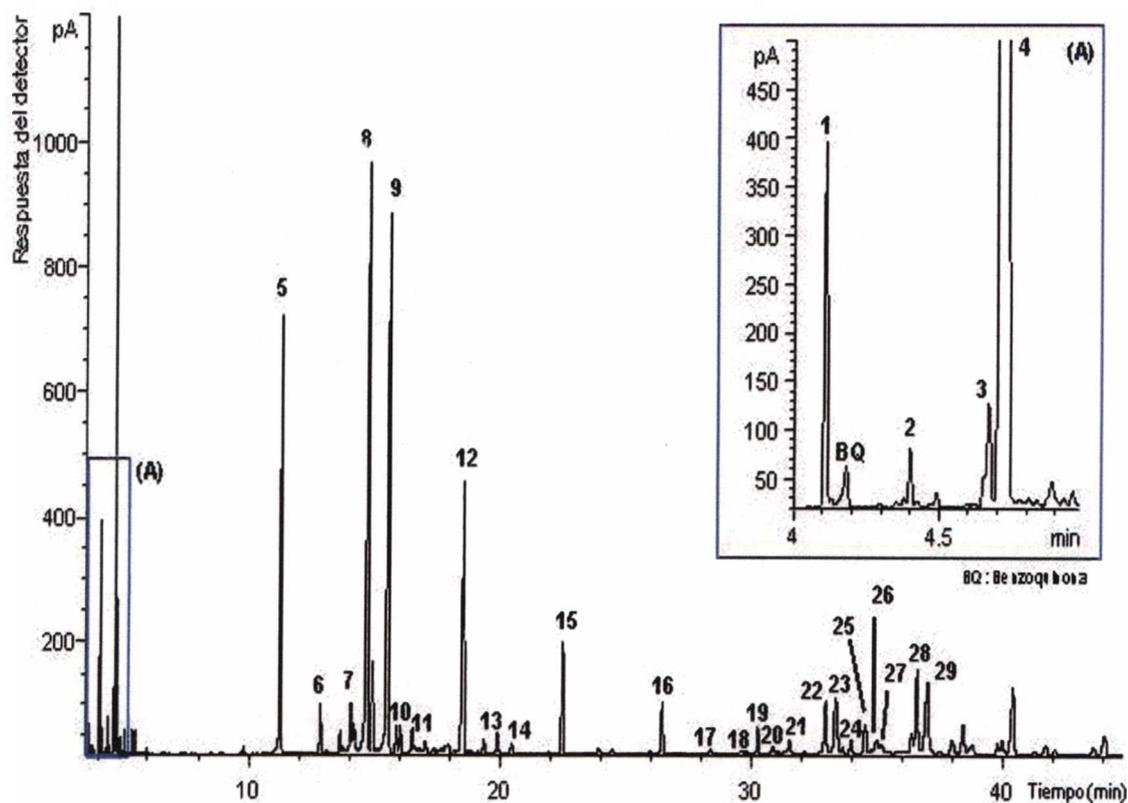


Figura IV.B.4: Perfil cromatográfico de los hidrocarburos epicuticulares de *Ulomoides dermestoides*

BQ: Benzoquinona

Tabla IV.B.2: Composición porcentual de los hidrocarburos epicuticulares de *Ulomoides dermestoides*

Pico ^a	Hidrocarburo ^b	Indice de Kovats	Abundancia (% ± EE) ^c
1	<i>n</i> -C _{13:1}	1291	0,77 ± 0,16
2	<i>n</i> -C _{14:1}	1392	0,16 ± 0,06
3	<i>n</i> -C _{15:2}	1472	0,29 ± 0,11
4	<i>n</i> -C _{15:1}	1492	24,64 ± 5,21
5	<i>n</i> -C _{23:0}	2300	7,55 ± 0,58
6	<i>n</i> -C _{24:0}	2400	0,88 ± 0,07
7	Monometil (terminal)-C _{24:2}	2439	tr
8	<i>n</i> -C _{25:0}	2500	17,64 ± 1,18
9	Monometil (terminal)-C _{25:2}	2537	15,67 ± 0,90
10	Monometil (terminal)-C _{25:0}	2560	tr
11	<i>n</i> -C _{26:0}	2600	0,57 ± 0,06
12	<i>n</i> -C _{27:0}	2700	6,95 ± 0,54
13	Monometil (terminal)-C _{27:0}	2770	tr
14	<i>n</i> -C _{28:0}	2800	0,25 ± 0,02
15	<i>n</i> -C _{29:0}	2900	2,79 ± 0,16
16	<i>n</i> -C _{31:0}	3100	1,59 ± 0,14
17	<i>n</i> -C _{32:0}	3200	tr
18	<i>n</i> -C _{33:1}	3292	tr
19	<i>n</i> -C _{33:0}	3300	0,85 ± 0,08
20	11-metil C _{33:0}	3333	0,23 ± 0,04
21	Dimetil (interno)-C _{33:0}	3368	0,46 ± 0,07
22	<i>n</i> -C _{35:2}	3449	0,40 ± 0,06
23	<i>n</i> -C _{35:1}	3473	0,85 ± 0,09
24	<i>n</i> -C _{35:0}	3500	tr
25	13- + 15- + 11- + 17-metil C _{35:0}	3530	tr
26	13,23- + 13,21- + 11,23-dimetil C _{35:0}	3562	tr
27	<i>n</i> -C _{36:1}	3571	tr

28	<i>n</i> -C _{37:2}	3650	0,86 ± 0,10
29	<i>n</i> -C _{37:1}	3676	2,36 ± 0,15

^a Los números corresponden a los picos de la figura IV.B.4.

^b La longitud de cadena de los HC fue estimada por sus correspondientes IK y espectros de masa. La posición relativa de las ramificaciones metilo de los compuestos cuya estructura no fue asignada se indica entre paréntesis y fue estimada en base al protocolo descrito por Carlson et al. (1998).

^c Los valores representan las medias de 4 repeticiones ± error estándar.

tr: trazas.

IV.B.3. Bioensayos

La mortalidad se evaluó a los 7 y 14 días posteriores a la exposición a los hongos, como se describió en Materiales y métodos. El abundante micelio observado en los cadáveres (Fig. IV.B.5) confirmó que la muerte de los insectos se produjo debido a la infección fúngica. Se detectaron importantes diferencias entre la capacidad insecticida de cultivos controles y adaptados de las diferentes cepas fúngicas ensayadas.

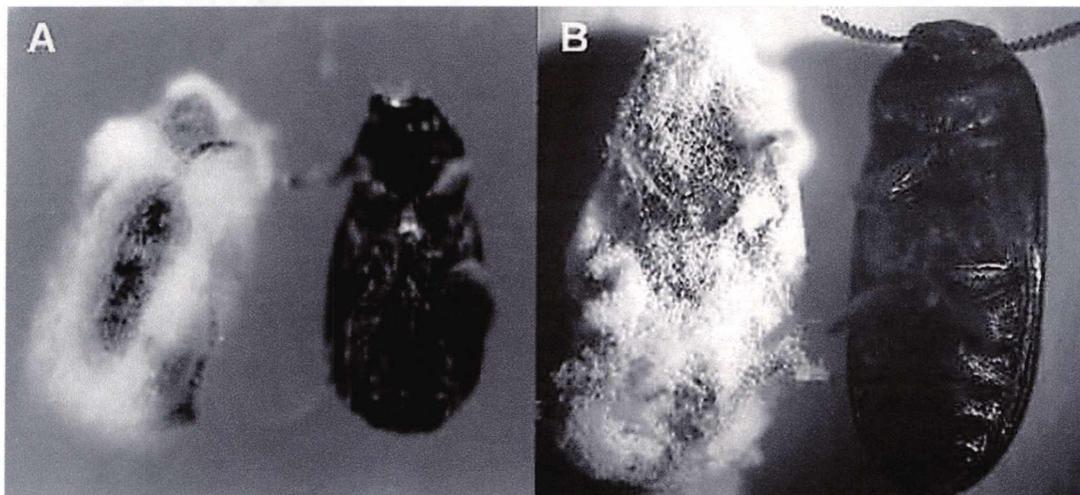


Figura IV.B.5: Ejemplares adultos de *A. obtectus* (A) y *U. dermestoides* (B) muertos por *B. bassiana*, luego de 3-4 días de incubación en cámara húmeda. A la derecha de los insectos infectados se muestran los correspondientes ejemplares no tratados. Aumento: 4x.

Utilizando Bb ARSEF 5500 sobre *A. obtectus* (Fig. IV.B.6), se obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad ($44 \pm 11\%$) empleando cultivos adaptados a crecer en *n*-C16 respecto a los controles ($22 \pm 4\%$) a los 7 días postratamiento, con diferencias significativas según el test de *t*-student ($p < 0,05$). También se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos a los 14 días, con mortalidades de $60 \pm 7\%$ para cultivos adaptados y $26 \pm 5\%$ para cultivos controles. Los porcentajes de mortalidad variaron temporalmente en forma significativa en los cultivos adaptados ($p < 0,05$), mientras que no se registraron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad obtenidos en los cultivos control entre los 7 y los 14 días postratamiento. En *R. dominica* también se observó una mayor capacidad insecticida en los cultivos adaptados. Los porcentajes de mortalidad fueron de $6 \pm 2\%$ y $26 \pm 4\%$ (controles) y $33 \pm 7\%$ y $51 \pm 9\%$ (adaptados) a los 7 y 14 días, respectivamente ($p < 0,05$).

La cepa Bb GHA también aumentó su capacidad insecticida luego de sucesivos repiques en medio mínimo suplementado con *n*-C28. En *A. obtectus*, el porcentaje de mortalidad se incrementó desde $43 \pm 3\%$ (controles) hasta $67 \pm 3\%$ (adaptados) ($p < 0,005$) a los 7 días, mientras que la mortalidad alcanzó el 100% a los 14 días empleando cultivos adaptados (Fig. IV.B.7). *U. dermestoides* se mostró poco susceptible, aún a altas dosis fúngicas (1×10^9 con/ml) (Fig. IV.B.7). En cultivos controles la mortalidad apenas alcanzó el $3 \pm 3\%$ a los 7 días, aunque este parámetro aumentó en forma significativa ($p < 0,005$) empleando cultivos adaptados ($31 \pm 4\%$).

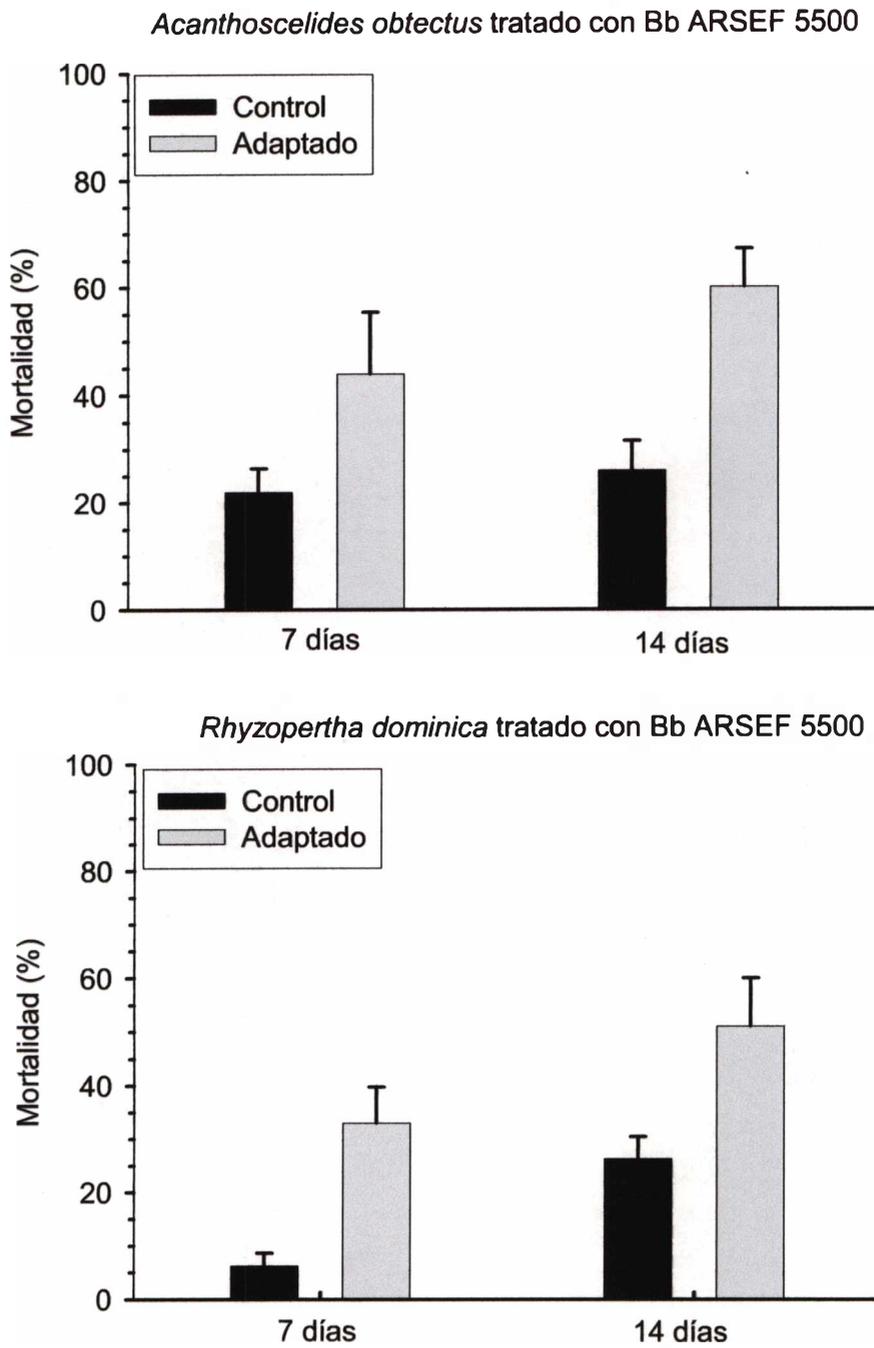


Figura IV.B.6: Porcentajes de mortalidad de *Acanthoscelides obtectus* y *Rhizopertha dominica* tratados con *B. bassiana* cepa Bb ARSEF 5500. Las dosis utilizadas fueron 4×10^6 conidios/ml para *A. obtectus* y 2×10^6 conidios/ml para *R. dominica*. Los cultivos adaptados crecieron en *n*-C16 como única fuente de carbono, como se describe en Materiales y métodos. Los valores representan las medias de 5 repeticiones (10 insectos *c/u*) \pm error estándar. Los valores difieren significativamente ($p < 0,05$) entre los cultivos control y adaptado en todos los casos.

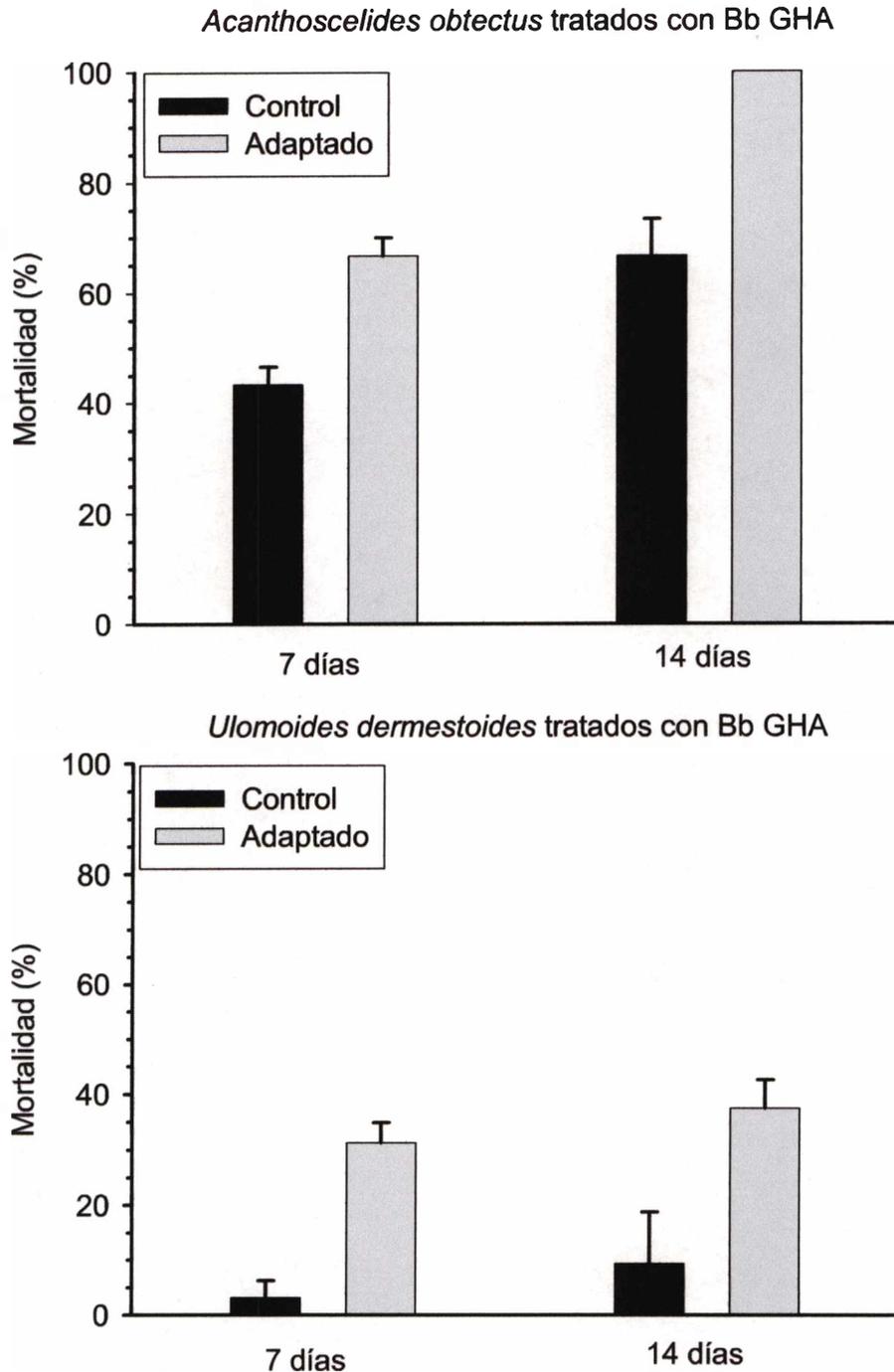


Figura IV.B.7: Porcentajes de mortalidad de *Acanthoscelides obtectus* y *Ulomoides dermestoides* tratados con Bb GHA. Los cultivos adaptados crecieron en *n*-C28 como única fuente de carbono, como se describe en Materiales y métodos. Las dosis utilizadas fueron 8×10^7 conidios/ml para *A. obtectus* y 1×10^9 conidios/ml para *U. dermestoides*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones (10 insectos c/u) \pm error estándar para *A. obtectus* y 4 repeticiones (8 insectos c/u) \pm error estándar para *U. dermestoides*. Los valores difieren significativamente ($p < 0,005$) entre los cultivos control y adaptado en todos los casos.

IV.B.4. Microscopía electrónica de barrido

Luego de la inoculación de *A. obtectus* con Bb GHA se observan acúmulos de conidios sobre toda la superficie del insecto, en particular asociados a pelos (Fig. IV.B.8). A las 6 horas posteriores al tratamiento se observa la adhesión de los conidios a la cutícula, con una abundante secreción de sustancias mucilaginosas. Se ven también algunos conidios comenzando la etapa de germinación (Fig. IV.B.8A). A las 24 horas postinoculación, la mayor parte de los conidios de cultivos control están germinados y comienzan a desarrollar largos tubos germinales (Fig. IV.B.8B). En los insectos inoculados con Bb GHA inducida a crecer en *n*-C28 (cultivo adaptado) e incubados durante período similar (24 hs), se observa un alto grado de invasión fúngica a través de una masiva proliferación micelial (Fig. IV.B.8C), ausente completamente en cutículas tratados con cultivos control (Fig. IV.B.8B).

IV.B.5. Efecto de la infección fúngica sobre la liberación de compuestos orgánicos volátiles por *Ulomoides dermestoides*

Si bien los porcentajes de mortalidad de *U. dermestoides* por Bb GHA son muy bajos, aún en el caso del tratamiento con cultivos adaptados (Fig. IV.B.7), la infección fúngica produce una abrupta caída de la emisión de secreciones volátiles en los insectos vivos a los 7 días posteriores al tratamiento, según se observa en el perfil cromatográfico donde los picos son prácticamente indetectables (Fig. IV.B.9B). Luego del tratamiento con cultivos controles, la cantidad de BQ totales disminuye en forma significativa ($p < 0.005$) desde casi 5 mg por insecto ($1.057,8 \pm 250,6$ ng/insecto de metil-1,4 benzoquinona y $3.852,0 \pm 834,9$ de etil-1,4 benzoquinona) hasta apenas 0,1 mg/insecto de BQ totales en insectos tratados (Tabla IV.B.3). Lo mismo ocurre con el *n*-C15:1 y el *n*-C13:1 donde estas cantidades caen significativamente ($p < 0,005$) desde $1.445,8 \pm 225,1$ y $168,1 \pm 34,1$ ng/insecto hasta $19,1 \pm 1,4$ y $3,3 \pm 2,2$ ng/insecto para ejemplares sanos e infectados, respectivamente (Tabla IV.B.3). Similares resultados se obtuvieron con cultivos adaptados, las cantidades de VOC liberados por ejemplares infectados fueron $91,9 \pm 10,6$ ng/insecto de BQ totales y $20,3 \pm 0,7$ ng/insecto de *n*-C15:1.

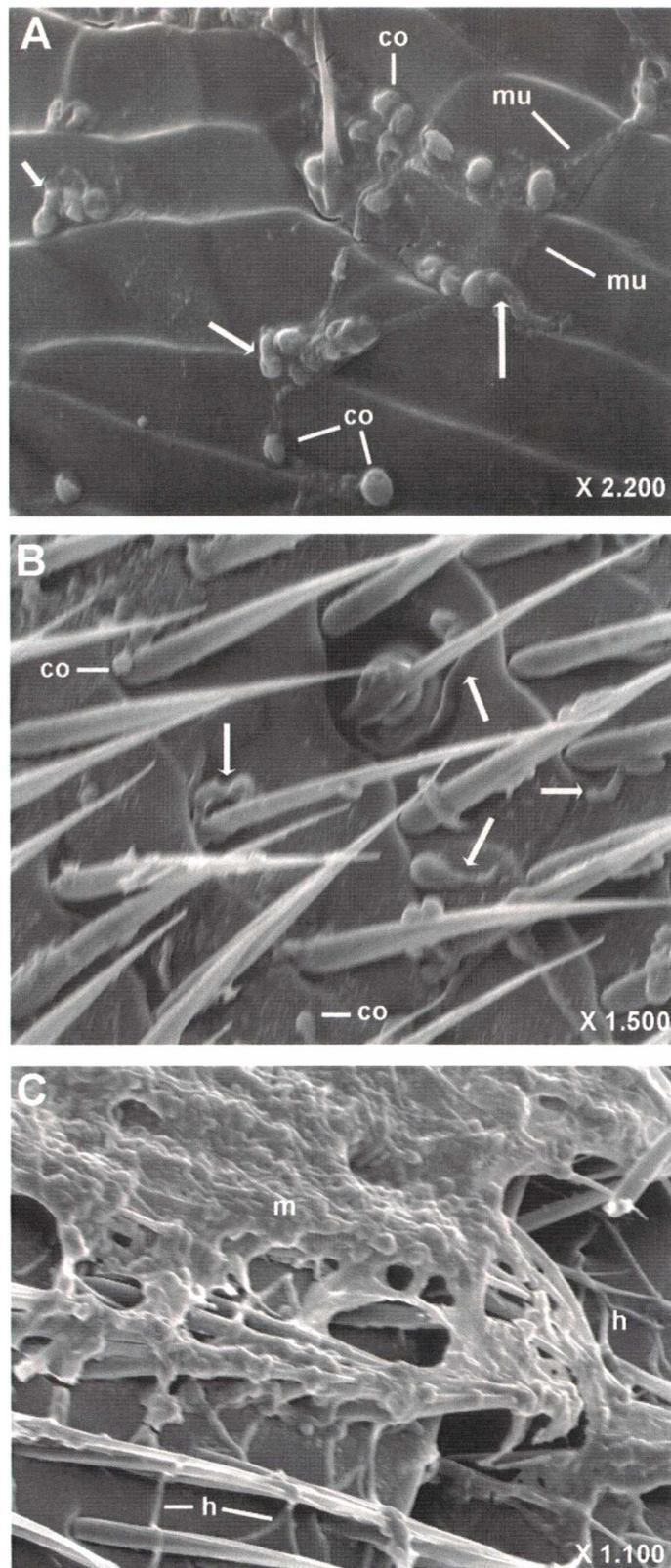


Figura IV.B.8: Microscopía electrónica de barrido de *B. bassiana* cepa GHA sobre cutícula de *A. obtectus*. Las muestras fueron fijadas a las 6 horas (A) y 24 horas (B, C) luego del tratamiento como se describe en Materiales y métodos. A, B) cultivos control; C) cultivo adaptado. Las estructuras germinativas se indican con flechas. co: conidio, m: micelio, h: hifas, mu: sustancia mucilaginosa.

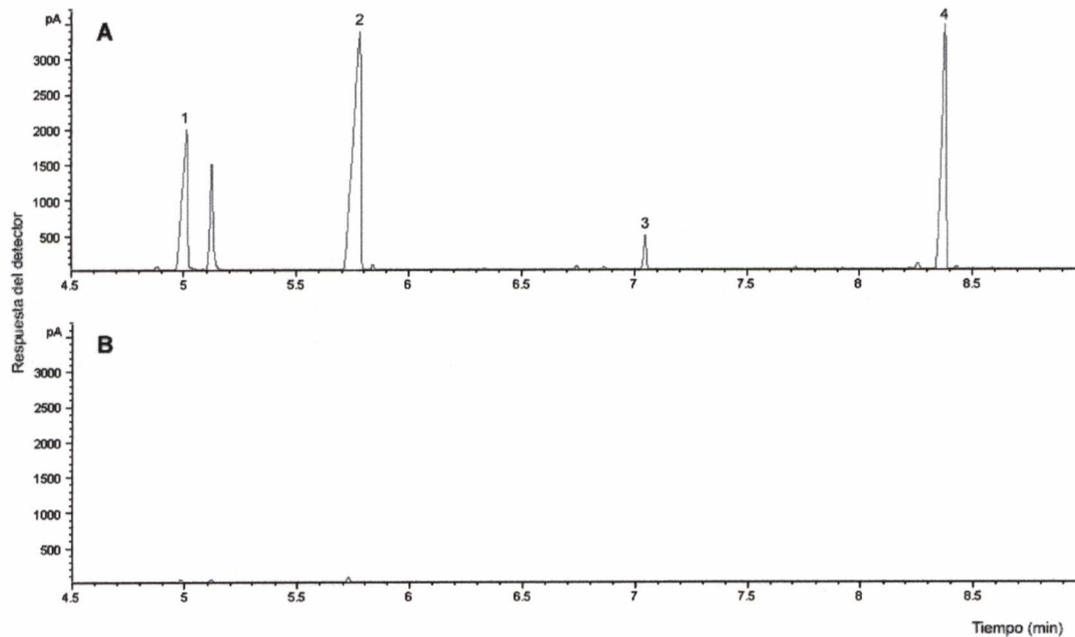


Figura IV.B.9: Perfil de SPME-CGC de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos por *Ulomoides dermestoides*. A) Insecto control, sumergido en agua bidestilada. B) Insecto infectado, sumergido en una suspensión de 1×10^9 conidios/ml de Bb cepa GHA (crecida en MC) en agua bidestilada. Los VOC fueron colectados por SPME a los 7 días del tratamiento, como se describe en Materiales y métodos

Tabla IV.B.3: Cuantificación de las secreciones volátiles emitidas por *Ulomoides dermestoides* en presencia y ausencia de infección fúngica

Pico ^a	Compuesto ^b	Cantidad emitida (ng/insecto \pm EE) ^c	
		Insecto control	Insecto infectado
1	metil-1,4 benzoquinona	1.057,8 \pm 250,6	57,5 \pm 7,5
2	etil-1,4 benzoquinona	3.852,0 \pm 834,9	66,1 \pm 12,2
3	1-trideceno	168,1 \pm 34,1	3,3 \pm 2,2
4	1-pentadeceno	1.445,8 \pm 225,1	19,1 \pm 1,4

^a Los números corresponden a los picos de la figura IV.B.9.

^b Los compuestos fueron identificados por SPME-CGC-MS como se describe en Materiales y métodos.

^c La cuantificación se realizó según Villaverde et al. (enviado a publicar), a partir de una curva de calibración estándar de 1,4 benzoquinona y 1-pentadeceno. Los valores representan las medias de 10 repeticiones \pm error estándar. Las diferencias entre insectos control e infectado son significativas ($p < 0,005$) según el test t en todos los casos.

IV.B.6. Efecto de las sustancias volátiles de tenebriónidos sobre el crecimiento fúngico

Los extractos epicuticulares de *U. dermestoides* y *T. castaneum* produjeron una importante inhibición sobre el crecimiento de *B. bassiana* en MC sólido (Fig. IV.B.10E,F,G,H; Tabla IV.B.4). Con extractos de *U. dermestoides*, los radios de inhibición fueron de $20,12 \pm 1,27$ mm para la dosis de 0,1 equivalentes de insecto/ μ l y de $22,37 \pm 1,42$ mm para 0,2 equivalentes de insecto/ μ l (Tabla IV.B.4). Empleando extractos de *T. castaneum* se observaron radios de inhibición de $18,90 \pm 1,25$ mm y de $24,12 \pm 1,80$ mm para dosis de 0,3 y 0,6 equivalentes de insecto/ μ l, respectivamente (Tabla IV.B.4). Las diferencias mostradas entre las dosis fueron no significativas según el test de *t*-student, tanto para los extractos de *U. dermestoides* ($p = 0,2107$) como para los de *T. castaneum* ($p = 0,0546$). De los tres análogos sintéticos ensayados (BQ, HQ y C15:1), solo la BQ mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *B. bassiana* (Fig. IV.B.10A,B,C). El radio de inhibición fue de $7,6 \pm 1,3$ mm para la solución de 4 μ g/ μ l; $9,7 \pm 1,5$ mm para 12,5 μ g/ μ l y $12,1 \pm 2,3$ mm para 25 μ g/ μ l (Tabla IV.B.4). La dosis de 12,5 μ g/ μ l corresponde aproximadamente a 1 equivalente de insecto/ μ l. Las diferencias entre los tratamientos fueron significativas (ANOVA, $F = 7,807$; $p = 0,009$). Tanto la HQ (precursor en la síntesis de BQ), como el C15:1 (*carrier* de las mismas), utilizados en las mismas dosis que las descritas para la BQ, no produjeron ningún grado de inhibición; con crecimientos similares a los obtenidos en presencia de diclorometano (controles) (Fig. IV.B.10, D).

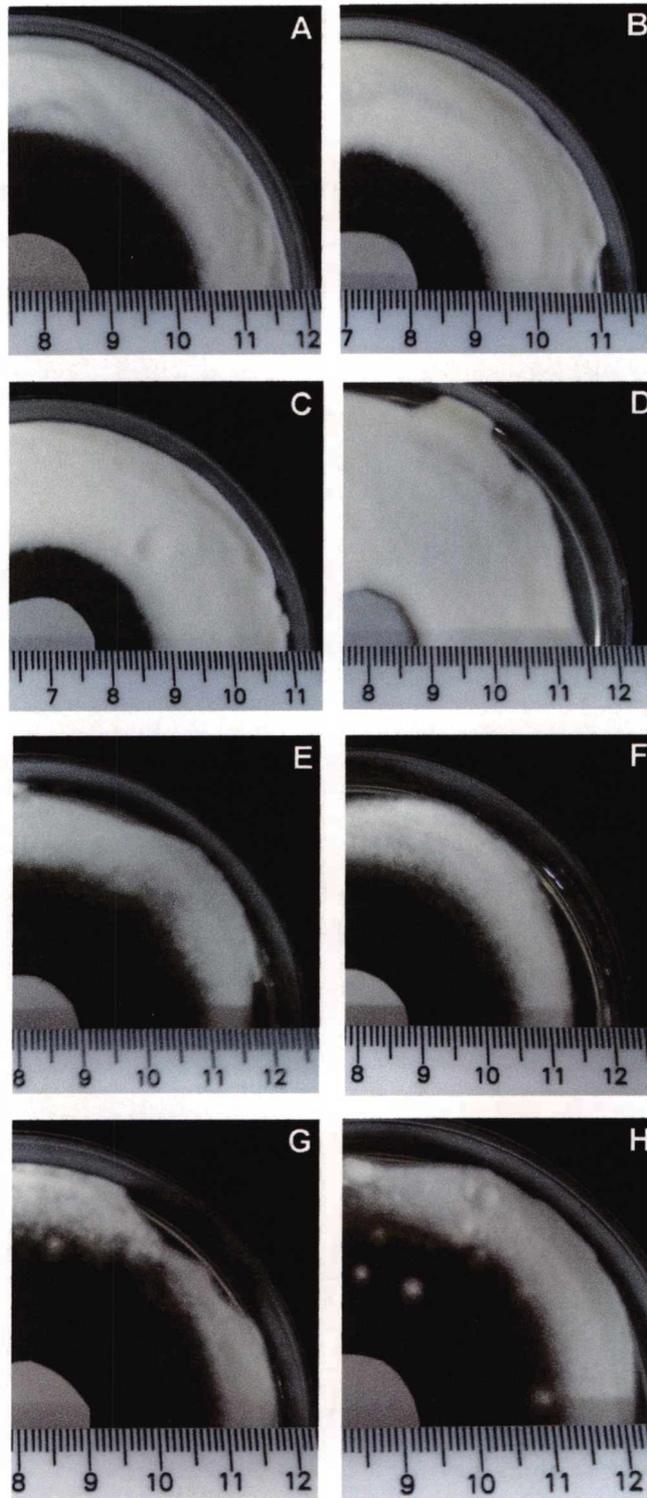


Figura IV.B.10: Ensayo de inhibición del crecimiento de Bb GHA en placas de Petri conteniendo medio agarizado completo (MC). En todos los casos los discos de papel de filtro estéril fueron embebidos en las distintas soluciones y depositados en el centro de la placa previamente inoculada con una suspensión de *B. bassiana* control. BQ: 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (A), 12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (B), 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (C), diclorometano (D). *U. dermestoides*: 0.1 eq/ μl (E), 0,2 eq/ μl (F). *T. castaneum*: 0,3 eq/ μl (G), 0.6 eq/ μl (H).

Tabla IV.B.4: Radios de inhibición del crecimiento de Bb GHA en medio agarizado completo en presencia de extractos lipídicos epicuticulares de *U. dermestoides* y *T. castaneum* y solución de 1,4-benzoquinona.

Compuesto/extracto lipídico	Concentración	Radio de inhibición (mm \pm EE) ^a
Extracto de <i>U. dermestoides</i>	0,1 eq/ μ l	20,12 \pm 0,75
	0,2 eq/ μ l	22,37 \pm 1,42
Extracto de <i>T. castaneum</i>	0,3 eq/ μ l	18,90 \pm 1,25
	0,6 eq/ μ l	24,12 \pm 1,80
1,4-benzoquinona	4 μ g/ μ l	6,62 \pm 0,85
	12 μ g/ μ l	9,75 \pm 0,75
	25 μ g/ μ l	12,20 \pm 1,27

^a Los valores representan las medias de 4 repeticiones \pm error estándar. Para los extractos de cada insecto, las diferencias entre las dosis utilizadas no fueron significativas. En el caso de la BQ, las diferencias entre las dosis utilizadas fueron significativas ANOVA, $F = 7,807$; $p < 0,01$)

Capítulo V

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

V.1. Enzimas fúngicas involucradas en la degradación de componentes cuticulares

V.1.a. Caracterización bioquímica y rol de las catalasas en la degradación de hidrocarburos

La utilización de alcanos por microorganismos eucariotas ocurre generalmente a través de una oxidación inicial que provee los precursores apropiados para la β -oxidación peroxisomal (Tanaka y Fukui, 1989). En levaduras, las enzimas peroxisomales de la β -oxidación son inducidas cuando las células crecen en medios de cultivo conteniendo alcanos como única fuente de carbono (Fukui y Tanaka, 1979). *B. bassiana* evidenció una proliferación de peroxisomas (detectada por tinción con diaminobenzidina) cuando se cultivó en medios de cultivo conteniendo alcanos como única fuente de carbono (Crespo et al., 2000; Juárez et al., 2004). En el presente trabajo se muestra un aumento de 14 veces en la actividad de la catalasa peroxisomal de *B. bassiana* crecida en *n*-octacosano. La misma fue de 14 ± 5 en cultivos controles y de 191 ± 52 U/mg en cultivos adaptados (Fig. IV.A.1). En base a estos resultados, la medida de la actividad de catalasa peroxisomal sería un parámetro bioquímico de utilidad para evaluar la capacidad de oxidación de HC. La catalasa citosólica exhibió un comportamiento diferente, su actividad específica se redujo más de 2 veces en cultivos adaptados respecto a los controles (Fig. IV.A.1). En el hongo filamentoso *N. crassa*, la generación de un singlete de oxígeno, debido a la oxidación del grupo hemo de una catalasa citosólica (Cat-1), es la causa de la degradación de la enzima bajo situaciones de estrés (Lledías et al., 1998). En el caso de *B. bassiana*, la caída en la actividad de catalasa citosólica también podría ser explicada por una degradación aumentada causada por estrés nutricional. Por otra parte, la enzima glucosa oxidasa es producida en grandes cantidades junto a la catalasa en hongos filamentosos, asociadas a la pared celular (Petruccioli et al., 1995; Fiedurek y Gromada, 2000). En hongos crecidos en glucosa, la glucosa oxidasa cataliza la reacción de glucosa con oxígeno molecular para generar ácido glucónico y H_2O_2 . La carencia de glucosa en el medio de cultivo podría afectar la expresión de glucosa oxidasa - y por ende la liberación de H_2O_2 - en hongos

crecidos en alcanos, con la concomitante reducción de la expresión de catalasa citosólica.

Las catalasas monofuncionales (verdaderas) se encuentran en animales, plantas, hongos y bacterias (Klotz et al., 1997) y son inhibidas por 3-AT (Margoliash et al., 1960). Las catalasa-peroxidasas solo se aislaron de hongos y bacterias, y no son sensibles al 3-AT (Nadler et al., 1986; Fraaije et al., 1996). Las dos catalasas purificadas de *B. bassiana* fueron inhibidas por 3-AT (Fig. IV.A.3D), por lo que serían catalasas monofuncionales. Las catalasas verdaderas se clasifican en dos grupos: las de "subunidades pequeñas" y las de "subunidades grandes". En *A. nidulans* las catalasas de subunidades pequeñas contienen una secuencia señal de entrada a peroxisomas y fueron reportadas en la fracción particulada junto a otras enzimas marcadoras de peroxisomas (Kawasaki y Aguirre, 2001). Las catalasas peroxisomales de diferentes sistemas muestran un rango bastante estrecho de masas moleculares, desde 48 kDa para *Saccharomyces cerevisiae* hasta 55 kDa tanto para *C. tropicalis* como para el hongo filamentoso *A. nidulans* (Okada et al., 1987; Kawasaki y Aguirre, 2001). Los resultados aquí presentados muestran que la catalasa peroxisomal de *B. bassiana* pertenece al grupo de subunidades pequeñas, con una masa molecular aparente de 54,7 kDa (Fig. IV.A.2A). Las catalasas de subunidades grandes fueron identificadas en bacterias y hongos filamentosos pero no en eucariotas superiores. Se localizan en citosol y pared celular, exhibiendo gran resistencia al calor y a los solventes orgánicos (Kawasaki y Aguirre, 2001). La catalasa más abundante en los conidios de *N. crassa* es una enzima monofuncional y de subunidades grandes (Chary y Natvig, 1989), al igual que en *A. nidulans* (Kawasaki y Aguirre, 2001). La catalasa purificada del citosol de *B. bassiana* tiene una masa molecular aparente (84 kDa) y propiedades físicas y cinéticas similares a estas enzimas (Figs. IV.A.2B; IV.A.3).

V.1.b. Enzimas pertenecientes a la fase I de oxidación: Citocromo P450 monooxigenasas y epóxido hidrolasa

En organismos eucariotas las enzimas que catalizan reacciones de detoxificación y degradación de xenobióticos se clasifican en enzimas de fase I y de fase II. La fase I biotransforma los xenobióticos convirtiéndolos en sustratos de las

enzimas de la fase II, al mismo tiempo que los hacen más hidrofílicos. Las reacciones de la fase II son reacciones de conjugación, en las cuales un metabolito con enlaces de alta energía cede un grupo funcional polar al xenobiótico, o su producto de transformación por la fase I. Las P450 y las EH constituyen importantes grupos de enzimas de la fase I de oxidación; mientras que la glutatión S-transferasa, la NAD(P)H quinona oxidoreductasa y la UDP-glucuronosiltransferasas, entre otras, catalizan reacciones de la fase II. La mayoría de estas enzimas son inducidas por una gran variedad de xenobióticos y su regulación coordinada es fundamental para llevar a cabo en forma eficiente estas reacciones de biotransformación.

Las enzimas involucradas en los pasos iniciales de la degradación de alcanos de cadena mediana y larga por microorganismos eucariotas se conocen sólo en levaduras. Esta vía se inicia por la activación de los HC mediante una oxidación, que puede ser terminal, dterminal o subterminal; sintetizando los correspondientes alcoholes primarios o secundarios. En todos los casos, este paso está catalizado por citocromo P450 monooxigenasas pertenecientes a la familia *CYP52* (van Beilen et al., 2003). Sin embargo, no hay reportes sobre enzimas semejantes degradando HC de muy largas cadenas (más de 20 átomo de carbono) en sistemas biológicos. Para la identificación de genes *CYP* involucrados en la degradación de HC en *B. bassiana*, se diseñaron *primers* degenerados en base a secuencias análogas de levaduras (Tabla III.A.1). Sin embargo, el fragmento clonado a partir de estos *primers* presentó una baja homología de secuencia con la familia *CYP52*. Cuando la búsqueda se amplió a secuencias *CYP* de hongos filamentosos capaces de catalizar reacciones de hidroxilación, una mayor similitud se obtuvo con genes de la familia *CYP53* (Fig. IV.A.10), especialmente con *CYP53A1* de *A. niger* (54% de identidad), que cataliza la hidroxilación en posición *para* del benzoato (van Gorcom et al., 1990). La búsqueda de genes *CYP* en *B. bassiana* también se realizó con *primers* específicos diseñados a partir de secuencias parciales obtenidas de un EST de *M. anisopliae* (Freimoser et al., 2005). Se obtuvieron dos fragmentos adicionales, uno correspondiente a una citocromo P450 y el otro a una EH, según se desprende del análisis por BLASTx. Las EH son enzimas que catalizan la hidrólisis del epóxido, generalmente producto de una P450, para formar un diol vecinal. Estas dos enzimas (P450 y EH) no sólo actuarían concertadamente durante la degradación de los xenobióticos aromáticos (compuesto

insaturado→epóxido→diol), sino que además la EH es activada a través de una interacción física entre ambas enzimas en la membrana microsomal (Taura et al., 2002). Por otra parte, en *C. maltosa* se ha demostrado que una sola P450 (*CYP52A3*), además de catalizar la hidroxilación inicial de *n*-hexadecano, es capaz de llevar a cabo una cascada de oxidación - pasando por los intermediarios *gem*-diol y aldehído - hasta obtener el ácido palmítico (Scheller et al., 1998). La enzima incluso es más versátil y puede sintetizar el ácido α,ω -dioico, a través del intermediario α,ω -diol. Esta vía tiene lugar en los microsomas, aunque también ocurre en peroxisomas con la participación de las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas (Scheller et al., 1998). En *B. bassiana* se obtuvo evidencia de una oxidación completa del [¹⁴C]-hexadecano al ácido [¹⁴C] hexadecanoico utilizando sólo la fracción microsomal fúngica (Fig. IV.A.4). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y habiendo clonado el fragmento de un gen similar a EH a partir de genes diseñados para P450, cabe la posibilidad que sea una única enzima fúngica la responsable de una cascada oxidativa que actúe en el catabolismo de HC de insectos. Además, el fragmento clonado a partir de *primers* diseñados en base a enzimas involucradas en la oxidación de HC alifáticos (*CYP52*) tuvo alta homología con P450's que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos (*CYP53*). De todos modos, no se puede definir esta especificidad de sustratos en términos absolutos, y aunque hasta el momento no haya información al respecto, es posible que los miembros de la familia *CYP53* sean capaces de oxidar compuestos alifáticos, y viceversa.

V.1.b.1. Expresión diferencial

En los ensayos de expresión diferencial de genes (*Northern blot*, *microarray*, RTi-PCR), los valores registrados deben ser normalizados con respecto a determinados genes usados como referencia. La condición que debe cumplir este gen (también llamado *housekeeping*) es que se exprese en forma constante en todas las condiciones estudiadas. En general, los genes elegidos para usar como control interno en estos ensayos son el de la β -actina o el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Sin embargo, los hongos tienen un ciclo de vida complejo (que involucra reproducción sexual y asexual) donde participan distintos tipos de

células (conidios, hifas, blastosporos, etc) y muchas veces estos genes no se expresan en forma constante en estas células. En base a antecedentes previos en *B. bassiana*, el gen elegido como *housekeeping* fue el de la β -tubulina (Tartar y Boucias, 2004). Esta decisión fue respaldada por los resultados de un trabajo reciente donde se estudió la capacidad de 18 genes diferentes de actuar como control interno en reacciones de RTi-PCR en el hongo fitopatógeno *Phytophthora parasitica* (Yan y Liou, 2006). La β -tubulina y la enzima conjugadora de ubiquitina (Ubc) resultaron las mejores opciones tanto para la fase sexual como asexual, mientras que Ubc y WS21 (proteína ribosomal de la subunidad 40S) fueron las ideales para la fase infectiva (Yan y Liou, 2006). Sin embargo, en *B. bassiana* la β -tubulina no resultó un buen *housekeeping* en las condiciones de cultivo ensayadas para los ensayos de *Northern blot* y RTi-PCR. Esta proteína es una de las constituyentes de los microtúbulos que componen el citoesqueleto y está involucrada en el movimiento y transporte intracelular. Los cultivos adaptados mostraron un crecimiento visible recién a los 5-6 días de cultivo mientras que los controles lo hacen a los 2 días. Esta dificultad en crecer debido a la limitación que representa la utilización de una fuente de carbono difícilmente accesible (pág. 62), podría justificar la expresión diferencial de este gen. Posteriormente, para los ensayos de RTi-PCR se eligió el gen codificante para el ARNr de la subunidad 18S de los ribosomas, que al no expresarse diferencialmente en ambas condiciones de cultivo permitió homologar los resultados obtenidos. Mediante RTi-PCR se comprobó que a los 7 días de cultivo el gen similar a EH se expresó 2,7 veces más en los cultivos adaptados a crecer en *n*-octacosano respecto a los controles crecidos en glucosa (Fig. IV.A.13), sugiriendo alguna participación (directa o indirecta) durante la degradación de HC de insecto. En el mismo período de crecimiento, los genes P450 y *53like* se expresaron en niveles similares en ambas condiciones de cultivo (Fig. IV.A.13). Es posible que estos dos genes *CYP* no sean específicamente inducidos por HC alifáticos de muy largas cadenas como el estudiado y puede esperarse que este sustrato induzca la expresión de otros genes *CYP* de *B. bassiana* no identificados hasta el momento. Las variaciones en los niveles de expresión de ciertos genes *CYP* también serían dependientes de las condiciones y el tiempo de cultivo. Por ejemplo, en condiciones de limitación de nutrientes los genes *CYP63A1* y *CYP63A3* de *P. chrysosporium* tienen un máximo nivel de expresión a los

4 días de cultivo, momento en que el hongo pasa del metabolismo primario al secundario. Luego del día 4, la expresión comienza a disminuir hasta alcanzar el mínimo a los 7 días (Yadav et al., 2003; Doddapaneni et al., 2005b). A las 24 horas de cultivo, la expresión del gen PcCYP1f (con alta homología a la familia CYP53) está 2,5 veces aumentada en *P. chrysosporium* (Matsuzaki y Wariishi, 2005). Estos datos indican la necesidad de estudiar la expresión de estos genes CYP clonados de *B. bassiana* a tiempos de cultivo más cortos para comprobar si están o no involucrados en la degradación de HC de muy largas cadenas.

V.2. Hidrocarburos cuticulares y secreciones volátiles de insectos plaga de granos almacenados

Los HC se encuentran en la epicutícula de todos los órdenes de insectos estudiados, siendo en muchos casos la fracción lípidica más abundante (Blomquist y Dillwith, 1985). Comprenden una mezcla variable de compuestos saturados, insaturados y metil-ramificados, en todos los casos de muy largas cadenas (Blomquist et al., 1987; Lockey, 1988; Nelson y Blomquist, 1995). Los HC metil-ramificados son característicos de insecto, y pueden tener de uno a cuatro grupos CH₃ en posiciones terminales o internas (Nelson y Carlson, 1986; Nelson et al., 1988; Juárez et al., 2001). Los HC juegan un papel fundamental en las principales funciones de la epicutícula como restringir la pérdida de agua, controlar la absorción de sustancias químicas y actuar en procesos de comunicación química (Blomquist et al., 1987; Juárez, 1994). La composición de los HC epicuticulares de insecto es fundamental en el rol de barrera que ejerce la cutícula frente a infecciones fúngicas, y es posible determinar una correlación entre esta composición y la susceptibilidad del insecto a los hongos entomopatógenos (Pedrini et al., 2006). En este trabajo se analizaron los HC epicuticulares de *A. obtectus*, comprendiendo una mezcla de 32 alcanos con longitudes de cadena entre 25 y 31 átomos de carbono (Tabla IV.B.1). Los componentes mayoritarios son mono, di y trimetil-ramificados de 27 carbonos. Las ramificaciones encontradas fueron tanto terminales (por ej: 3-metil C27) como internas (por ej: 11-metil C27). En contraste, la epicutícula de otras plagas de granos almacenados, como *Sithophilus* sp. o *Tribolium* sp., tienen en su composición grandes cantidades de HC insaturados. En *S. oryzae* predominan alquenos, alcadienos y alcatrienos de altos pesos moleculares (Baker et al., 1984), mientras que los HC de *T. castaneum* pueden dividirse en dos grupos; uno de HC insaturados y de bajo peso molecular (asociado a secreciones defensivas) y otro formado por componentes estructurales de mayores pesos moleculares (similares a los encontrados en *A. obtectus* y en la mayoría de los insectos), de estructuras lineales y ramificadas (Baker et al., 1978; Villaverde, comunicación personal). Los ejemplares adultos de *T. castaneum* contienen mayoritariamente C15:1 (representa el 70% de los HC epicuticulares), actuando como vehículo de grandes cantidades de derivados de

benzoquinonas con función de defensa liberadas en sus secreciones volátiles (Baker et al., 1984; Villaverde et al., enviado a publicar), además de tener un rol defensivo *per se* (Peschke y Eisner, 1987). Los HC epicuticulares de *U. dermestoides* fueron similares a los de *Tribolium* sp., dividiéndose también en dos grupos de acuerdo a sus pesos moleculares (Fig. IV.B.4). Al igual que en éste, el C15:1 es el componente mayoritario (25% de los HC epicuticulares totales); pero la mayor diferencia es la presencia de un HC de 25 carbonos diinsaturado con una ramificación terminal (no detectado en *Tribolium* sp.) como el tercer componente en importancia (14% de los HC epicuticulares totales) (Tabla IV.B.2). La baja energía de ionización empleada en el análisis por MS con analizador de trampa iónica posiblemente haya contribuido a distorsionar las intensidades relativas de los fragmentos insaturados más cortos, lo que imposibilitó establecer la posición exacta del grupo metilo. Si bien no hay bases de datos empleando como analizador un filtro de masa cuadrupolo, que incluyan espectros de HC ramificados de largas y muy largas cadenas tales como los presentes en insectos, las abundantes publicaciones al respecto han sentado las bases para su interpretación (Nelson y Sukkestad, 1970; Blomquist et al., 1987). Dada la introducción relativamente reciente del analizador de trampa iónica, no existen publicaciones sobre asignación de estructuras ramificadas, ni tampoco comparación de ambas metodologías. Por consiguiente, en el análisis de los HC de *U. dermestoides* sólo se detalla la posición de las ramificaciones cuando el patrón de fragmentación y el IK avalan la estructura propuesta.

Las metil- y etil-1,4-benzoquinonas son producidas y liberadas como secreciones volátiles por todos los tenebriónidos, causando un efecto irritante y repelente a sus predadores. Estos compuestos se sintetizan en glándulas de defensa protorácicas y abdominales, por oxidación de sus precursores metil y etil hidroquinonas (Blum, 1981). No se han detectado hasta el momento cepas de hongos entomopatógenos efectivas contra adultos de *T. castaneum*, los índices de mortalidad son menores al 10% cuando se utilizan formulados comerciales a las dosis usualmente útiles para la mayoría de los insectos susceptibles (Akbar et al., 2004). Sin embargo, los mismos autores reportan 50% de mortalidad en larvas de *T. castaneum* tratadas en similares condiciones (Akbar et al., 2004). Estos estadios exhiben un perfil lipídico más simple que los adultos, y tanto el C15:1 como los derivados de BQ están ausentes de los extractos epicuticulares y de las

secreciones volátiles (Villaverde, comunicación personal). Como se discute más adelante, estos compuestos protegerían al insecto de infecciones fúngicas, provocando una inhibición del desarrollo del hongo sobre la cutícula. Los derivados de BQ también fueron encontrados en las secreciones volátiles de *U. dermestoides* (Villaverde, comunicación personal) donde cumplirían un rol análogo, asignándole así al C15:1 similar función en las secreciones defensivas de este coleóptero. En este trabajo se muestra una importante inhibición de la liberación de metil y etil BQ, C13:1 y C15:1 por parte de *U. dermestoides*, 7 días después del tratamiento con cepas control de *B. bassiana*. La liberación de estas sustancias disminuyó en promedio a un 3% de sus valores normales (Tabla IV.B.3), siendo prácticamente indetectables en los correspondientes cromatogramas (Fig. IV.B.9). Estos resultados permiten suponer que una vez producida la infección, y a pesar de que las mortalidades observadas son bajas (Fig. IV.B.7), el efecto sobre el comportamiento de los insectos debe ser fuertemente alterado al ser incapaces de secretar feromonas de defensa y de agregación. Esto los llevaría a un estado de aislamiento e inanición que alteraría en forma importante su ciclo de vida. La misma disminución en la emisión de volátiles se observó luego del tratamiento con cepas adaptadas a crecer en HC (pág. 90), lo que permite suponer que es la producción de la micosis, y no la magnitud o la rapidez con que ésta se desarrolle, la responsable de este efecto. La cantidad de VOC producidos por *B. bassiana* es muy escasa en comparación con otros hongos filamentosos (Crespo et al., 2006), por lo que no interfirieron en el análisis de los VOC de insectos infectados. En nuestro diseño experimental los VOC de *B. bassiana* fueron detectables por SPME sólo cuando los hongos fueron cultivados en un recipiente *ad-hoc* hermético (vial de SPME). Al crecer en MC, sólo 150 ng de los VOC totales fueron detectados en similares condiciones experimentales a las descritas en este trabajo, la mayoría de ellos correspondientes a derivados alquilo del benceno y naftaleno y a una variedad de sesquiterpenos. Cuando el hongo fue cultivado en HC como única fuente de carbono, la cantidad de VOC disminuyó más de dos veces respecto a los controles; con importantes cambios cualitativos como lo indica el predominio del *n*-decano, que constituyó un 84% del total de VOC liberados (Crespo et al., 2006).

En este trabajo también se estudió el efecto de los componentes presentes en las secreciones de tenebriónidos sobre el crecimiento fúngico *in vitro*. Los resultados

muestran que los componentes epicuticulares extraídos con diclorometano, tanto de *T. castaneum* como de *U. dermestoides*, provocan una inhibición en el crecimiento de *B. bassiana* en placas de Petri conteniendo MC, aún cuando se apliquen dosis menores a las liberadas por los insectos (Fig. IV.B.10). Cuando se ensayaron compuestos sintéticos análogos a los presentes en estas secreciones, se comprobó que sólo BQ produce este efecto (Tabla IV.B.3), mientras que tanto su precursor HQ como el C15:1 no provocan ninguna inhibición en el crecimiento. Los extractos epicuticulares del coleóptero *Melolontha melolontha* produjeron una significativa inhibición hifal en *Beauveria* sp. (Lecuona et al., 1997). El efecto de estos compuestos también fue estudiado sobre el hongo entomopatógeno *B. brongniartii*, usado exitosamente en el control de esta plaga en bosques de Alemania (Koller et al., 2005). Los resultados mostraron una inhibición tanto en la germinación como en la elongación de hifas, aunque a dosis mucho mayores que las presentes en insectos, indicando que las cantidades naturales de BQ presentes en las secreciones no son suficientes para producir un efecto protector ante infecciones fúngicas (Ruther et al., 2001a,b). Nuestros resultados de ensayos de zona de inhibición concuerdan con los descritos por Ruther, ya que al comparar los radios de inhibición se observa que las dosis de BQ sintética necesarias para lograr el mismo efecto inhibitorio son mayores que las cantidades presentes en los extractos de los insectos (Tabla IV.B.4).

V.3. Mejoramiento de micoinsecticidas

Los resultados obtenidos en los bioensayos confirman la hipótesis previamente establecida en nuestro laboratorio según la cual un aumento de la virulencia fúngica puede ser obtenida mediante el cultivo de hongos en medios conteniendo alcanos como única fuente de carbono, induciendo los mecanismos de degradación de los HC cuticulares que ocurren en las etapas iniciales de la infección. En este trabajo se utilizaron dos HC análogos a los presentes en la epicutícula de insectos: el *n*-C16, componente minoritario en la composición cuticular de coléopteros; y el *n*-C28, de longitud de cadena similar a la mayoría de los encontrados en insectos plaga de granos almacenados. Con independencia de la cepa usada y el HC adicionado al medio de cultivo, se obtuvo un aumento significativo en el porcentaje de mortalidad a los 7 o 14 días posteriores al tratamiento. Luego del crecimiento en *n*-hexadecano, el aumento en el porcentaje de mortalidad fue al menos duplicado en todos los casos testeados (Fig. IV.B.6), mientras que con Bb GHA crecida en *n*-octacosano se logró aumentar la mortalidad sobre *A. obtectus* de 60 a 100% a los 14 días postratamiento (Fig. IV.B.7). *U. dermestoides* demostró ser poco susceptible a este hongo, posiblemente por la gran cantidad de derivados de BQ presentes en sus secreciones volátiles, como se discutió en el ítem V.2. Otro factor a considerar es la composición de sus HC epicuticulares, donde predominan componentes insaturados, en coincidencia con *T. castaneum* y *S. oryzae*, insectos escasamente susceptibles como se describió en el ítem I.6. Sin embargo, la virulencia fue significativamente aumentada luego de igual período de adaptación en *n*-octacosano, con un aumento de 10 veces en el porcentaje de mortalidad a los 7 días postratamiento (Fig. IV.B.7).

Similares resultados se obtuvieron en bioensayos de mortalidad contra *T. infestans* (Crespo, 2006), el principal vector de la enfermedad de Chagas en Argentina. La virulencia de *B. bassiana* crecida en *n*-octacosano se vió incrementada respecto a los controles cuando se aplicaron en vinchucas de 4^{to} estadio. Empleando la cepa Bb10 (IMYZA, INTA, Castelar, Argentina) en ambas condiciones de cultivo se logró un 100% de mortalidad, pero el tiempo letal medio (TLM) disminuyó un 18% en cultivos adaptados respecto los controles (Crespo, 2006). La definición de virulencia más aceptada actualmente en patología de invertebrados es el grado patogenicidad de

un microorganismo dentro de un grupo o especie (Shapiro-Ilan et al., 2005). En hongos entomopatógenos la virulencia puede variar con distintos sustratos nutritivos, presencia de otros microorganismos, factores climáticos, e incluso cuando se realiza el pasaje sobre insectos de distinta susceptibilidad al patógeno, o cuando se multiplican en medios de cultivo sintéticos (Lecuona y Alves, 1996). De esta manera se puede concluir que es posible aumentar la virulencia favoreciendo las etapas iniciales de la infección. Este incremento fue evidenciado tanto por un aumento en el porcentaje de mortalidad como por una disminución en el TLM. La virulencia de hongos entomopatógenos también es frecuentemente relacionada con la rapidez en la germinación y el crecimiento sobre la cutícula de sus insectos hospedadores. Un alto porcentaje de germinación puede ayudar a incrementar la probabilidad de infección antes que los conidios sean removidos de la cutícula (Altre et al., 1999). Los eventos tempranos en el proceso de germinación de *B. bassiana* requieren de una fuente de carbono exógena (Smith y Gula, 1981; Roberts, 1989), y la germinación de conidios hidrofóbicos es probablemente favorecida al incrementar la afinidad de éstos por los componentes cuticulares. En este sentido, el porcentaje de germinación de *B. bassiana* crecida en *n*-octacosano aumentó 4 veces respecto a los controles (Crespo, 2006), sugiriendo que los HC pueden disparar el proceso germinativo además de servir como sustrato catabólico. Coincidentemente, en el presente trabajo se muestra que a las 24 horas postinfección se produjo una proliferación masiva del hongo adaptado sobre la cutícula de *A. obtectus*, mientras que en los cultivos controles sólo se observa adhesión de conidios con escasas estructuras germinativas (Fig. IV.B.8). Similares resultados se obtuvieron en experimentos sobre cutículas de *T. infestans*, donde los cultivos adaptados mostraron un extenso crecimiento del micelio (Pedrini et al., 2006) y provocaron además una ruptura en forma de grietas en algunas zonas de la superficie cuticular, no detectable en el tratamiento con cultivos controles (Crespo, 2006).

Estudios previos en este laboratorio aportaron las primeras evidencias sobre la capacidad los hongos entomopatógenos para degradar los HC epicuticulares de su insecto hospedador (Napolitano y Juárez, 1997). Los hongos adaptados a crecer en alcanos de muy larga cadena tienen una mayor capacidad de incorporar y metabolizar HC, en comparación con hongos crecidos en glucosa (Juárez et al., 2000; 2004;

Crespo et al., 2000), además de presentar una diferente composición de lípidos totales, ácidos grasos, HC y compuestos orgánicos volátiles (Crespo, 2006; Crespo et al., 2002; 2006). En este trabajo se avanzó en la misma dirección caracterizando algunas de las enzimas involucradas en el catabolismo de HC de insectos. Se demostró la presencia de dos isoformas de catalasa en *B. bassiana*, una de las cuales (de localización peroxisomal) está inducida en hongos adaptados a crecer en HC, por lo que estaría involucrada en el proceso de degradación de HC. Ambas isoformas fueron purificadas y caracterizadas bioquímicamente. Por otra parte, las evidencias obtenidas indican que la oxidación del alcano hasta ácido graso ocurre en la fracción microsomal, siguiendo luego con la β -oxidación peroxisomal, de acuerdo a la hipótesis propuesta por Scheller et al. (1998). Se inició el estudio a nivel molecular de las enzimas responsables de las etapas iniciales de esta vía, a través del clonado de tres fragmentos génicos con alta homología a genes *CYP* y *EH*. Se realizaron además los estudios iniciales de la expresión diferencial de estos genes en hongos adaptados a crecer en alcanos similares a los de insecto como única fuente de carbono. Estos datos preliminares son el punto de partida para futuras investigaciones que ayuden a corroborar las hipótesis propuestas. Estos estudios incluirán la obtención de las secuencias completa de los genes parcialmente identificados, su caracterización y el estudio de su expresión diferencial a diferentes tiempos de cultivo y en presencia de diferentes sustratos, así como la búsqueda de nuevos genes *CYP* de importancia en el catabolismo de HC de insecto.

Hace 25 años se publicó la primera patente en biotecnología que incluía el uso de microorganismos genéticamente modificados que expresaban enzimas degradadoras de alcanos, utilizados en bioremediación (Chakrabarty, 1981). La eficiencia de los micoinsecticidas también puede ser mejorada por modificación genética, así como por una optimización de la formulación. Actualmente se dispone de múltiples herramientas para el mejoramiento genético de cepas, y recientemente varios métodos de transformación fueron utilizados para la inserción de genes homólogos o heterólogos en hongos utilizados en control biológico (Valadares-Inglis y Inglis, 1997; Inglis et al., 2000, Fang et al., 2004). La adición y expresión de genes insecticidas en *M. anisopliae* y *B. bassiana* ha sido exitosamente utilizada en el mejoramiento genético de cepas que sobreexpresan proteasas y quitinasas que

degradan la cutícula de sus insectos hospedadores, resultando en una disminución en el tiempo de mortalidad (St. Leger et al., 1996b; Hu y St. Leger, 2002; Fang et al., 2005). Sin embargo, la sobreexpresión de una quitinasa (CHIT1) en *M. anisopliae* no se correlacionó con un aumento de virulencia (Screen et al., 2001). Durante los eventos de penetración, las quitinasas aparecen con posterioridad a las proteasas en el escenario cuticular, según se desprende de evidencias tanto bioquímicas como ultraestructurales (St. Leger et al., 1996a). Sin embargo, el hecho de que la sobreexpresión de CHIT1 no incremente la virulencia sugiere que esta quitinasa *wild-type* y su modo de regulación no sea un factor limitante en la penetración del hongo a través de la cutícula. Otro factor importante es que CHIT1 fue clonada a partir de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, y posteriormente sobreexpresada en *M. anisopliae* var. *acridum* (Screen et al., 2001). Ambas cepas poseen un diferente mecanismo de acción en cuanto a su patogenicidad: la primera mata por toxemia y es más inespecífica en cuanto a su rango de insectos hospedadores (Samuels et al., 1989), mientras que *M. anisopliae* var. *acridum* produce su efecto letal por una rápida invasión al hemocele del insecto y lo hace sobre un rango más acotado de hospedadores (Inglis et al., 2001). En base a estos resultados es posible suponer diferentes roles durante la penetración para las quitinasas CHIT1 de *M. anisopliae* (Screen et al., 2001) y Bbchit1 de *B. bassiana* (Fang et al., 2005), y por lo tanto diferente regulación para su actividad. CHIT1 y Bbchit1 son endoquitinasas pertenecientes a la misma familia, contienen similares sitios de unión al sustrato y dominios catalíticos. Sin embargo tienen muy baja homología de secuencia y diferentes estructuras tridimensionales, lo que sugiere que esta distancia filogenética podría ser una de las causas de la diferente virulencia de ambas cepas transformadas contra su insecto hospedador (Fang et al., 2005).

En base a todo lo descrito en este trabajo, las etapas iniciales de la interacción hongo-insecto hospedador serían cruciales en el éxito de la infección fúngica. Particularmente, las enzimas involucradas en la degradación de la barrera más externa de la epicutícula serían el blanco más adecuado para el mejoramiento genético de hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano. A partir del presente trabajo de tesis se continuarán las investigaciones tendientes a la expresión heteróloga de los genes *CYP* a fin de facilitar la caracterización bioquímica de las citocromo P450 monooxigenasas. Posteriormente la adición de copias

adicionales de genes *CYP* y la selección de cepas transformadas, estables genéticamente, permitirán evaluar la virulencia de las cepas modificadas; así como su adaptabilidad y comportamiento en ensayos a campo. Estos conocimientos pretenden aportar nuevas evidencias que ayuden a contribuir en el mejoramiento de micoinsecticidas basado en favorecer las etapas iniciales de la interacción hongo entomopatógeno-insecto hospedador.

Capítulo VI

CONCLUSIONES DE ESTE TRABAJO

En el presente trabajo de tesis se avanzó en el estudio de la ruta metabólica propuesta para la degradación de hidrocarburos cuticulares de insecto por hongos entomopatógenos, caracterizando por primera vez algunas de las enzimas fúngicas involucradas en este proceso. Se profundizó además en el conocimiento de la bioquímica de la interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula de su insecto hospedador. Las principales conclusiones fueron las siguientes:

- Se demostró la presencia de dos isoformas de catalasa en *B. bassiana*. La catalasa peroxisomal está inducida en cultivos adaptados, participando en las etapas finales de la oxidación de HC; mientras que la isoforma citosólica no está involucrada en este proceso.
- De acuerdo a su peso molecular, la catalasa peroxisomal corresponde al grupo de las catalasas de subunidades pequeñas, mientras que la citosólica se ubica en el grupo de subunidades grandes. Las propiedades físicoquímicas y cinéticas de cada una de ellas confirman esta clasificación.
- La medida de la actividad de catalasa peroxisomal sería un parámetro bioquímico de utilidad para evaluar la capacidad de oxidación de HC vía β -oxidación.
- La oxidación del HC hasta ácido graso ocurre en la fracción microsomal fúngica.
- Se clonaron 3 fragmentos de genes correspondientes a enzimas involucradas en las etapas iniciales del catabolismo de HC. Estos genes tienen alta homología de secuencia con genes que expresan citocromos P450 (*CYP*) y epóxido hidrolasa (EH).
- La expresión del gen homólogo a EH está más de dos veces aumentada en cultivos adaptados, mientras que los genes homólogos a *CYP* se expresan en la misma magnitud en hongos control y adaptados.

- La composición de HC epicuticulares de *A. obtectus* corresponde a estructuras saturadas y metil-ramificadas, desde 25 a 31 átomos de carbono. Diferencialmente, los HC epicuticulares de *U. dermestoides* se dividen en dos grupos de acuerdo a peso molecular. Los de cadena más corta (de 13 a 15 C) son insaturados; mientras que los de mayor peso molecular corresponden a estructuras más variadas, con cadenas saturadas, insaturadas y metil-ramificadas.
- La composición de los HC epicuticulares, al igual que la de las secreciones volátiles de defensa, son importantes en la susceptibilidad de los insectos a los hongos entomopatógenos.
- La liberación de compuestos volátiles de defensa de *U. dermestoides* está fuertemente inhibida luego de la infección con *B. bassiana*.
- Los extractos cuticulares de *U. dermestoides* conteniendo los compuestos volátiles y la benzoquinona sintética inhiben el crecimiento fúngico *in vitro*.
- El crecimiento fúngico *in vivo* sobre la cutícula de *A. obtectus* está favorecido en cultivos adaptados respecto a los controles.
- Es posible incrementar la virulencia de cepas fúngicas adaptadas a crecer en un medio de cultivo conteniendo HC análogos a los cuticulares de insecto como única fuente de carbono.

Capítulo VII

BIBLIOGRAFÍA

- Adane, K, Moore, D., Archer, S.A. 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. J. Stored Prod. Res. 32:105-113.
- Akbar, W., Lord, J.C., Nechols, J.R., Howard, R.W. 2004. Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. J. Econ. Entomol. 97:273-280.
- Akbar, W, Lord, J.C, Nechols, J.R, Loughin, T.M. 2005. Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. J. Econ. Entomol. 98:683-688.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. Introductory mycology, 4th ed. New York: John Wiley and Sons.
- Altre, J.A., Vanderberg, J.D., Cantone, F.A. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. J. Invertebr. Pathol. 73, 332-338.
- Augustynowicz M., Malinski E., Warnke Z., Szafranek J., Nawrot J. 1987. Cuticular hydrocarbons of the German cockroach, *Blattella germanica* L. Comp. Biochem. Physiol. 86B:519-523.
- Baker, J.E., Sukkestad, D.R., Woo, S.M., Nelson, D.R. 1978. Cuticular hydrocarbons of *Tribolium castaneum*: effects of the food additive tricalcium phosphate. Insect Biochem. 8:159-167.
- Baker, J.E., Nelson, D.R., Fatland, C.L. 1979. Developmental changes in cuticular lipids of the black carpet beetle, *Attagenus megatoma*. Insect Biochem. 9:335-339.
- Baker, J.E., Woo, S.M., Nelson, D.R., Fatland, C.L. 1984. Oleofins as major components of epicuticular lipids of three *Sitophilus* weevils. Comp. Biochem. Physiol. 77B:877-884.
- Bateman, R.P., 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). Biocontrol Sci. Technol. 6:549 - 560.
- Beers, R.F., Sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the

- breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195:133-140.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J., Joshi, L., Roberts, D.W. 1995. The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycol. Res.* 99:403-406.
- Bing, L.A., Lewis, L.C. 1991. Suppression of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Environ. Entomol.* 20:1207-1211.
- Blomquist, G.J. 2003. Biosynthesis and ecdysteroid regulation of housefly sex pheromone production. En: Blomquist, G.J., Vogt, R.G., editors. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*. Elsevier Academic Press: London, p 231-252.
- Blomquist, G.J., Jackson, L.L. 1979. Chemistry and biochemistry of insect waxes. *Prog. Lipid Res.* 17: 319-345.
- Blomquist, G.J., Dillwith, J.W. 1985. Cuticular lipids. En: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., editores. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol 3. Pergamon Press: Oxford, p 117-154.
- Blomquist, G.J., Nelson, D.R, de Renobales, M. 1987. Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 6:227-265.
- Blum, M.S. 1981. *Chemical Defenses of Arthropods*. New York: Academic Press.
- Boucias, D.G., Latgé, J.P. 1988. Non-specific induction of germination of *Coridiobolus obscurus* and *Nomurea rileyii* host and non-host cuticle extracts. *J. Invertebr. Pathol.* 51:168-171.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C, Latgé, J.P. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1795-1805.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. 1991. The fungal cell wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts. En: Latgé, J.P., Boucias, D.G., editores. *Fungal cell wall and immune response*, vol. H 53. Springer-Verlag:Berlin, p 303-316.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*

72:248-254.

- Brower, J.H., Smith, L., Vail, P.V., Flim, P.W. 1995. Biological control. En: Subramanyam B, Hagstrum, D.W., editores. Integrated management of insects in stored products. New York: Marcel Dekker Inc. p 223 - 286.
- Brown-Peterson, N.J., Salin, M.L. 1995. Purification and characterization of a mesohalic catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 177:378-384.
- Bussink, H-J, Oliver, R. 2001. Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. Eur. J. Biochem. 268:15-24.
- Calderón Fernández, G., Juárez, M.P., Ramsey, J., Salazar Schettino, P.M., Monroy, M.C., Ordoñez, R., Cabrera, M. 2005. Cuticular hydrocarbon variability among *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Mexico and Guatemala. J. Med. Entomol. 42:780-788.
- Caputo, B., Dani, F.R, Home, G.L, Petrarca, V., Turillazzi, F., Coluzzi, M., Priestman, A.A., della Torre, A. 2005. Identification and composition of cuticular hydrocarbons of the major Afrotropical malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae): analysis of sexual dimorphism and age-related changes. J. Mass Spectrom. 40:1595-604.
- Carlson, D.R., Bernier, U.R., Sutton, B.C. 1998. Elution pattern from capillary GC for methyl-branched alkanes. J. Chem. Ecol. 24:1845–1865.
- Chakrabarty, A.M. 1981. Microorganisms having multiple compatible degradative energy-generating plasmids and preparation. US Patent # 4259444.
- Chamley, A.K. 1991. Microbial pathogens and insect pest control. Lett. Appl. Microbiol. 12:149-157.
- Chary, P., Natvig, D.O. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. J. Bacteriol. 171:2646-2652.
- Coon, M.J., Ding, X., Pernecky, S.J., Vaz, A.D.N. 1992. Cytochrome P450: progress and predictions. FASEB J. 6:669-673.
- Craft, D.L, Madduri, K.M., Eshoo, M., Wilson, C.R. 2003. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to alpha,omega-

- dicarboxylic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5983-5991.
- Crespo, R. 2006. Bioquímica de la interacción hongo entomopatógeno-cutícula de triatomino. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
- Crespo, R., Juárez, M.P., Cafferata, L.F.R. 2000. Biochemical interaction between entomopatogenous fungi and their host-like hydrocarbons. *Mycologia* 92: 528-536.
- Crespo, R., Juárez, M.P., Dal Bello, G., Padín, S., Calderón Fernández, G., Pedrini N. 2002. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl* 47:685-696.
- Crespo, R., Pedrini, N., Juárez, M.P., Dal Bello, G. 2006. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol. Res.*, doi: 10.1016/j.micres.2006.03.013.
- Dal Bello, G., Padín, S., López Lastra, C., Fabricio, M. 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. *J. Stored Prod. Res.* 37:77-84.
- Dal Bello, G., Padín, S., Juárez, M.P., Pedrini, N., De Giusto, M. 2006. Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus oryzae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains. *Biocontrol Sci. Technol.* 16:215-220.
- Díaz, A., Rangel, P., Montes de Oca, Y., Lledías, F., Hansberg, W. 2001. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1323-1333.
- Doddapaneni, H., Yadav, J.S. 2005. Microarray-based global differential expresión of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol. Gen. Genomics* 274:454-466.
- Doddapaneni, H., Chakraborty, R., Yadav, J.S. 2005a. Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence for gene duplications and extensive gene clustering. *BMC Genomics* 6.
- Doddapaneni, H., Subramanian, V., Yadav, J.S. 2005b. Physiological regulation, xenobiotic induction, and heterologous expression of P450 monooxygenase gene *pc-3* (CYP63A3), a new member of the CYP63 gene cluster in the white-

- rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Microbiol.* 50:292-298.
- Fang, W., Zhang, Y., Yang, X., Zheng, X., Duan, H., Li, Y., Pei, Y. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *J. Invertebr. Pathol.* 85:18-24.
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Yin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, X., Yang, X., Zhang, Y., Pei, Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 363-370.
- Fargues, J. 1984. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. En: Roberts D.W, Aist, J.R, editores. *Infection processes of fungi*. New York: The Rockefeller Foundation. p 90-110.
- Fargues, J., Delmas, J.C., LeBrun, R.A. 1994. Leaf consumption by larvae of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) infected with the entomopathogen, *Beauveria bassiana*. *J. Econ. Entomol.* 87:67-71.
- Ferron, P., 1985. Fungal control. En: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Academic Press:New York, p 313-346.
- Fiedurek, J., Gromada, A. 2000. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *J. Appl. Microbiol.* 89:85-89.
- Folch, J., Lees, M. Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Fraaije, M.W., Roubroeks, H.P., Hagen, W.R., van Berkel, J.H. 1996. Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur. J. Biochem.* 235:192-198.
- Freimoser, F.M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G., St. Leger, R.J. 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.
- Freimoser, F.M., Hu, G., St. Leger, R.J. 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. *Microbiology* 151:361-371.

- Fukui, S., Tanaka, A. 1979. Peroxisomes of alkane- and methanol-grown yeasts. J. Appl. Biochem. 1:171-201.
- Ghosh, M.K., Hajra, A.K. 1986. A rapid method for the isolation of peroxisomes from rat liver. Anal. Biochem. 159:169-174.
- Gotoh, O. 1993. Evolution and differentiation of P450 genes. En: Omura, T., Ishimura, Y., Fujii Kuriyama, Y., editores. Cytochrome P450, Second ed. Tokio: Kodansha. p 255-272.
- Guengerich, F.P. 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. Chem. Res. Toxicol. 14:611-650.
- Hajek, A.E. 1999. Pathology and epizootiology of *Entomophaga maimaiga* infections in forest Lepidoptera. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:814-835.
- Haverty, M.I., Grace, J.K., Nelson, L.J., Yamamoto, R.T. 1996. Intercaste, intercolony, and temporal variation in cuticular hydrocarbons of *Coptotermes formosanus shiraki* (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Chem. Ecol. 22:1813-1834.
- Hebanowska, E., Maliński, E., Nawrot, J., Ruszkowska, M, Pihlaja, K., Szafranek, J. 1989. The composition of cuticular hydrocarbons of the cereal aphids *Sitobion avenae* F. (Homoptera, aphididae). Comp. Biochem. Physiol. 94B:723-727.
- Hewald, S., Josephs, K., Bolker, M. 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. Appl. Environ. Microbiol. 71:3033-3040.
- Hernández Salas, R. 2000. Evaluación del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) para el control del insecto *Triatoma dimidiata* (adultos) <http://www.ina.go.cr/agropecuario/evaluaciondelhongo99.html>
- Hidalgo, E, Moore, D., Le Patourel, G. 1998. The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. J. Stored Prod. Res. 34:171-179.
- Hodge, K. 2003. Clavicipitaceous anamorphs. En: White, J.F., Bacon, C.W., Hywel-Jones, N.L., Spatafora, J.W., editores. Clavicipitalean fungi: evolutionary, biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts. Nueva York: Marcel Dekker. p 75-123.
- Horne, G.L., Priestman, A.A. 2002. The chemical characterization of the epicuticular hydrocarbons of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Bull. Entomol. Res. 92:287-294.

- Howard, R.W. 1993. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. En: Stanley-Samuelson, D.W., Nelson, D.R., editores. Insect lipids: Chemistry, biochemistry and biology. Nebraska: University of Nebraska Press. p 179-226.
- Howard, R.W., Liang, Y. 1993. Cuticular hydrocarbons of winged and wingless morphs of the ectoparasitoid *Choetospila elegans* westwood (Hymenoptera: Pteromalidae) and its host, larval lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*) (Coleoptera: Bostrichidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 106B:407-414.
- Hu, G., St. Leger, R.J. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6383-6387.
- Huang, B., Li, C-R., Li, Z-G., Fan, M-Z., Li, Z.Z. 2002. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. *Mycotaxon* 81: 229-236.
- Humber, R.A. 1998. Collection of entomopathogenic fungal cultures. USDA-ARS (Suppl.to the 1992 Catalog), Ithaca, NY, USA.
- Iida, T., Sumita, T., Ohta, A., Takagi, M. 1998. Cloning and characterization of an *n*-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for *n*-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14:1387-1397.
- Inglis, P.W., Aragão, F.J.L., Frazão, B.P., Magalhães, M.C., Valadares-Inglis, M.C. 2000. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiol. Lett.* 191:249-254.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N., editores. *Fungi as biocontrol agents*. Wallingford: CAB International. p. 23-69.
- Juárez, M.P. 1994. Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25:177-191.
- Juárez, M.P., Brenner, R.R., Labayén, I.L., Gros, E.G. 1984. Bioquímica del ciclo evolutivo del *Triatoma infestans*. VII. Composición de los lípidos de la superficie de la cutícula extraíbles con hexano. *Acta Physiol. Pharmac. Latinoam.* 35:223-236.
- Juárez, M.P., Brenner, R.R. 1985. The epicuticular lipids of *Triatoma infestans*-II. Hydrocarbon dynamics. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B:793-803.

- Juárez, M.P., Blomquist, G.J. 1993. Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *T. mazzottii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B:667-674.
- Juárez, M.P., Crespo, R., Calderón Fernández, G., Lecouna, R., and Cafferata, L.F.R. 2000. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas Disease Vector. *J. Invertebr. Pathol.* 76:198-207.
- Juárez, M.P., Blomquist, G.J., Schofield, C.J. 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B:733-746.
- Juárez, M.P., Pedrini, N., Crespo, R. 2004. Mycoinsecticides against Chagas disease vectors: Biochemistry involved in insect host hydrocarbon degradation. En: Mas-Comas, S., editor. *Multidisciplinarity for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases*. Bologna: Monduzzi Editore. p 137-142.
- Juárez, M.P., Calderón Fernández, G. 2006. Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp. Biochem. Physiol. A*, doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.031.
- Jurenka, R.A., Subchev, M. 2000. Identification of cuticular hydrocarbons and the alkene precursor to the pheromone in hemolymph of the female gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 43:108-115.
- Kaaya, G.P. 1989. *Glossina morsitans morsitans*: mortalities host in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. *Acta Trop.* 46:107-114.
- Kawasaki, L., Aguirre, J. 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 183:1434-1440.
- Klotz, M.G., Klassen, G.R., Loewen, P.C. 1997. Phylogenetic relationship among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* 14:951-958.
- Koller, R., Jung, K., Scheu, S., Zimmermann, G., Ruther, J. 2005. Biocontrol of the forest cockchafer (*Melolontha hippocastani*): Experiments on the applicability of the "Catch and Infect"-Technique using a combination of attractant traps with the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *IOBC/wprs Bulletin* 28:37-44.
- Kovats, E. 1965. Gas chromatographic comparison of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* 1:229-247.
- Kunau, W-H., Dommès, V., Schulz, H. 1996. β -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipids Res.* 34:267-342.

- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 27:95-125.
- Lacey, L.A, Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol. Control* 21:230-248.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- LeConte, J.L. 1874. Hints for the promotion of economic entomology. *Am. Assoc. Adv. Sci.* 22:11-22.
- Lecuona, R.E. 1996. Control Microbiano, utopía o realidad. En: Lecuona, R.E., editor. *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.* Buenos Aires: M. Mas. p 13-15.
- Lecuona, R.E., Riba, G., Cassier, P., Clement, J.L. 1991. Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. *J. Invertebr. Pathol.* 58:10-18.
- Lecuona, R.E, Alves, S.B. 1996. Epizootiología. En: Lecuona, R.E., editor. *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.* Buenos Aires: M. Mas. p 17-34.
- Lecuona, R.E., Tigano, M.S., Diaz, B.M. 1996. Characterization and pathogenicity of *Beauveria* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25:299-307.
- Lecuona, R.E., Clement, J-L., Riba, G., Joulie, C., Juárez, M.P. 1997. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *J. Econ. Entomol.* 89:119-123.
- Lecuona, R.E., Turica, M., Tarocco, F., Crespo, D.C. 2005. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. *J. Med. Entomol.* 42:332-336.
- Lindquist, R. 1996. Microbial control of greenhouse using entomopathogenic fungi in the USA. En: Smith, P.H., editor. *Insect pathogens and insect parasitic nematodes.* IOBC Bulletin19, p. 153-156.
- Lledías, F., Rangel, P., Hansberg, W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273:10630-10637

- Locke, M. 1965. Permeability of insect cuticle to water and lipids. *Science* 147:295-298.
- Lockey, K.H. 1976. Cuticular hydrocarbons of *Locusta*, *Schistocerca* and *Periplaneta*, and their role in waterproofing. *Insect Biochem.* 6:457-472.
- Lockey, K.H. 1978. The adult cuticular hydrocarbons of *Tenebrio molitor* L. and *Tenebrio obscurus* F. (Coleóptera: Tenebrionidae). *Insect Biochem.* 8:237-250
- Lockey, K.H. 1985. Cuticular hydrocarbons of adults *Eurychora* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B:223-227.
- Lockey, K.H. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B:595-645.
- Lomer, C.J., Prior, C., Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium anisopliae* ssp. For the control of grasshoppers and locusts. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 171:265-286.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Dent, D., De Geroote, H., Douro-Kpindou, O-K., Kooyman, C., Langewald, J., Ouambama, Z., Peveling, R., Thomas, M. 1999. Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers. *Agric.Forest Entomol.* 1:71-88.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Ann. Rev. Entomol.* 46:667-702.
- Lord, J.C. 2001. Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on stored-grain beetles. *J. Econ. Entomol.* 94:367-372.
- Lord, J.C. 2005a. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J. Invertebr. Pathol.* 89:19-29.
- Lord, J.C. 2005b. Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). *Biol. Control* 34:180-186.
- Luz, C., Tigano, M.S., Silva, I.G., Cordeiro, C.M.T., Aljanabi, S.M. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93:839-846.

- Luz, C., Rocha, L.F.N., Nery, G.B., Magalhães, B.P., Tigano, M.S. 2004. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in central Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92:211-218.
- Margoliash, E., Novogrodzky, A., Schejter, A. 1960. Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4 triazole and related inhibitors with the protein catalase. Biochem. J. 74:339-348.
- Martínez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., Rokhsar, D. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. Nat. Biotechnol. 22:695-700.
- Matsuzaki, H., Wariishi, H. 2005. Molecular characterization of cytochrome P450 catalyzing hydroxylation of benzoates from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 334:1184-1190.
- Metchnikoff, O. 1921. En: Life of Elie Metchnikoff, 1845-1916. Houghton Mifflin, Londres, p. 297.
- Moino, J.R.A., Alves, S.B., Pereira, R.M. 1998. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. J. Appl. Entomol. 122:301-305.
- Nadler, V., Goldberg, I., Hochman, A. 1986. Comparative study of bacterial catalases. Biochim. Biophys. Acta 882:234-241.
- Napolitano, R., Juárez, M.P. 1997. Entomopathogenic fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. Arch. Biochem. Biophys. 344:208-214.
- Nation, J.L. 2002. Insect Physiology and Biochemistry. Boca Raton: CRC Press.
- Natvig, D.O., Sylvester, K., Dvorachek, W.H., Baldwin, J.L. 1996. Superoxide dismutases and catalases. En: Brambl R, Marzluf, G.A., editores. The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology. Berlin: Springer-Verlag. p 191-209.
- Nelson, D.R., Sukkestad, D.R., Terranova, A.C. 1971. Hydrocarbon composition of the integument, fat body hemolymph and diet of the tobacco hornworm. Life Sci. 10:411-419.
- Nelson, D.R., Sukkestad, D.R. 1970. Normal and branched aliphatic hydrocarbons from the eggs of the tobacco hornworm. Biochemistry 9: 4601-4611.

- Nelson, D.R., Fatland, C.L., Howard, R.W., McDaniel, C.A., Blomquist, G. J. 1980. Re-analysis of the cuticular methylalkanes of *Solenopsis invicta* and *S. richteri*. *Insect Biochem.* 10:409-418.
- Nelson, D.R., Dillwith, J.W., Blomquist, G.J. 1981. Cuticular hydrocarbons of the house fly, *Musca domestica*. *Insect Biochem.* 11:187-197.
- Nelson, D.R., Carlson, D.A. 1986. Cuticular hydrocarbons of the tse tse flies *Glossina morsitans morsitans*, *G. austeni* and *G. pallidipes*. *Insect Biochem.* 16:403-416.
- Nelson, D.R., Carlson, D.A., Fatland, C.L. 1988. Cuticular hydrocarbons of tsetse flies II: *Glossina fuscipes fuscipes*, *G. palpalis palpalis*, *G. p. gambiensis*, *G. tachinoides*, and *G. brevipalpis*. *J. Chem. Ecol.* 14:963-987.
- Nelson, D.R., Blomquist, G.J., 1995. Insect Waxes. En: Hamilton, R.J., editor. *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. W. W. Christie, The Oily Press: London, p 1-90.
- Nelson, D.R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* 369:1-10.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J. Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42.
- Nelson, D.R., Adams, T.S., Fatland, C.L. 2003. Hydrocarbons in the surface wax of eggs and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134B:447-466.
- Neville, A.C. 1975. *Biology of the Arthropod Cuticle*. Berlin: Springer-Verlag.
- Okada, H., Ueda, M., Sugaya, T., Atomi, H., Mozaffar, S., Hishida, T., Teranishi, Y., Okazaki, K., Takechi, T., Kamiryo, T., Tanaka, A. 1987. Catalase gene of the yeast *Candida tropicalis*. *Eur. J. Biochem.* 170:105-110.
- Padín, S., Dal Bello, G., Vasicek, A.L. 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for adults of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) in stored grains. *Entomophaga* 42:569-574.
- Padín, S., Dal Bello, G., Fabrizio, M. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *J. Stored Prod. Res.* 38:69-74.

- Pedrini, N., Crespo, R., Juárez, M.P. 2006. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.08.003.
- Pereira, R.M, Stimac, J.L., Alves, S.B. 1993. Soil antagonism affecting the dose-response of workers of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. *J. Invertebr. Pathol.* 61:156-161.
- Peschke, K., Eisner, T. 1987. Defensive secretion of the tenebrionid beetle, *Blaps mucronata*: physical and chemical determinants of effectiveness. *J. Comp. Physiol. A* 161:377-388.
- Petruccioli, M., Fenice, M., Piccioni, P., Federici, F. 1995. Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by *Penicillium variable* (P16) in benchtop bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 17:336-339.
- Quesada-Moraga, E., Vey, A. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locust secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* 108:441-452.
- Ratault, C., Vey, A. 1977. Production d'estérasés et de N-acetyl-beta-D-glucosaminidase dans le tégument du coléoptère *Oryces rhinoceros* par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Entomophaga* 22:289-294.
- Rice, W.C., Cogburn, R.R. 1999. Activity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against three Coleopteran pests of stored grain. *J. Econ. Entomol.* 92:691-694.
- Roberts, D.W. 1989. Picture of biological control of insects by fungi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 89-100.
- Roberts, D.W., Gupta, S., St. Leger, R.J. 1992. Metabolite production by entomopathogenic fungi. *Pes. Agr. Bras.* 27:325-347.
- Romaña, C. A., Fargues, J. 1992. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87:363-368.
- Rose, T.M., Henikoff, J.G., Henikoff, S. 2003. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res.* 31:3763-3766.

- Ruther, J., Reinecke, A., Tolasch, T., Hilker, M. 2001a. Make love not war: A common arthropod defence compound as sex pheromone in the forest cockchafer *Melolontha hippocastani* Fabr. *Oecologia* 128:44-47
- Ruther, J., Podsiadlowski, L., Hilker, M. 2001b. Quinones in cockchafers: additional function of a sex attractant as an antimicrobial agent. *Chemoecology* 11:225-229.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 2000. Molecular cloning, a laboratory manual (3rd Ed). Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuels, R.I., Charnley, A.K., Reynolds, S.E. 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia* 104:51-58.
- Samuels, K.D.Z., Pinnock, D.E., Allsopp, P.G. 1989. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina, Hyphomycetes) as a biological control-agent of *Inopus rubriceps* (Macquart) (Diptera, Stratiomyidae). *J. Aust. Entomol. Soc.* 28:69-74.
- Scheller, U., Zimmer, T., Kargel, M., Schunck, W.-H. 1996. Characterization of the *n*-alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4. *Arch. Biochem. Biophys.* 328:245-254.
- Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F., Schunck, W.-H. 1998. Oxygenation cascade in conversion of *n*-alkanes to α,ω -dioic acids catalized by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* 273:32528-32534.
- Scholte E-J, Knols, B.G.J, Samson R.A, Takken W., 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. 24pp. *J. Insect Sci.* 4:19, Available online: insectscience.org/4.19
- Screen, S.E., Hu, G., St Leger, R.J. 2001. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* 78:260-266.
- Seghezzi, W., Sanglard, D., Flechter, A. 1991. Characterization of a second alkane inducible cytochrome P450-encoding gene, CYP52A2, from *Candida tropicalis*. *Gene* 106:51-59.
- Seghezzi, W., Melli, C., Roffiner, R., Kunzi, R., Sanglard, D. Flechter, A. 1992.

- Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family CYP52 of *Candida tropicalis*. DNA Cell. Biol. 11:757-780.
- Shapiro-Ilan, D.I., Fuxa, J.R., Lacey, L.A., Onstad, D.W., Kaya, H.K. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. J. Invertebr. Pathol. 88:1-7.
- Small, G.M., Burdett, K., Connock, M.J. 1985. A sensitive spectrophotometric assay for peroxisomal acyl-CoA oxidase. Biochem. J. 227:205-210.
- Smith, R.J., Grula, A. 1981. Nutricional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 37, 222-230.
- Smith, S.M., Oduor, G.I., Moore, D. 1998. Preliminary investigations into the potential of entomopathogenic fungi for the control of pests of stored maize. En: Smith, P.H., editor. Insect pathogens and insect parasitic nematodes: Bulletin IOBC/SROP. p 53-60.
- Soliday, C.L., Blomquist, G.J., Jackson, L.L. 1974. Cuticular lipids of insects. VI. Cuticular lipids of the grasshoppers *Melanoplus sanguinipes* and *Melanoplus packardii*. J. Lipid Res. 15:399-405.
- Sosa-Gómez, D.R., Gazzoni, D.L., Correa Ferreire, B.S., Moscardi, F. 1993. Pragas da soja e seu controle. En: Cultura da soja nos cerrados. Arantes, N.E., de Souza, P.I.M, editores. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Sao Paulo. p. 299-331.
- Sosa-Gómez, D.R., Boucias, D.G., Nation, J.L. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to de southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J. Invertebr. Pathol. 69:31-39.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. J. Gen. Microbiol. 132:1509-1517.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. J. Invertebr. Pathol. 47, 167-177.

- St. Leger, R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M. 1986c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 48, 85-95.
- St. Leger, R.J., Durrands, P.K., Cooper, R.M., Charnley, A.K. 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Microbiol.* 150:413-416.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K. 1993. Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 139:237-243.
- St. Leger, R.J., Bidochka, M.J., Roberts, D.W. 1994. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 313:1-7.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W., Roberts, D.W. 1996a. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:907-912.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Roberts, D.W. 1996b. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6349-6354.
- Sun, J., Fuxa, J.R., Henderson, G. 2003. Virulence and in vitro characteristics of pathogenic fungi isolated from soil by baiting with *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Entomol. Sci.* 38:342-358.
- Szafranek, B., Maliński, E., Nawrot, J., Sosnowska, D., Ruskowska, M., Pihlaja, K., Trumpakaj, Z., Szafranek, J. 2001. In vitro effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *ARKIVOC (iii)*:81-84.
- Tanaka, A., Osumi, M., Fukui, S. 1982. Peroxisomes of alkane-grown yeast: Fundamental and practical aspects. *Ann. New York Acad. Sci.* 386:183-199.
- Tanaka A, Fukui S. 1989. Metabolism of *n*-alkanes. En: Tanaka, A., Fukui, S., editors. The yeast, 2nd edition, vol 3. Academic Press:New York, p 261-287.
- Tanaka, A., Ueda, M. 1993. Assimilation of alkanes by yeasts: functions and

- biogenesis of peroxisomes. *Mycol. Res.* 97:1025-1044.
- Tartar, A., Boucias, D.G. 2004. A pilot-scale Expressed Sequence Tag analysis of *Beauveria bassiana* gene expression reveals a tripeptidyl peptidase that is differentially expressed in vivo. *Mycopathologia* 158:201-209.
- Taub, J., Lau, J.F., Ma, C., Hahn, J.H., Hoque, R., Rothblatt, J., Chalfie, M. 1999. A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* daf-C and clk-1 mutants. *Nature* 399:162-166.
- Taura, K., Yamada, H., Naito, E., Ariyoshi, N., Mori, M., Oguri K. 2002. Activation of microsomal epoxide hydrolase by interaction with cytochromes P450: kinetic analysis of the association and substrate-specific activation of epoxide hydrolase function. *Arch. Biochem. Biophys.* 402:275-80.
- Teranishi, Y., Tanaka, A., Osumi, M., Fukui, S. 1974. Catalase activities of hydrocarbon-utilizing *Candida* yeasts. *Agr. Biol. Chem.* 38:1213-1220.
- Valadares-Inglis, M.C., Inglis, P.W. 1997. Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* strain CG423 to benomyl resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:199-202.
- van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M, Witholt, B. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.* 58:427-440.
- van den Brink, H.J.M., van Gorcom, R.F.M., van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 23:1-17.
- van Gorcom, R.F., Boschloo, J.G., Kuijvenhoven, A., Lange, J., van Vark, A.J., Bos, C.J., van Balken, J.A., Pouwels, P.H., van den Hondel, C.A. 1990. Isolation and molecular characterisation of the benzoate-para-hydroxylase gene (bphA) of *Aspergillus niger*: a member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 223: 192-197.
- Vey, A., Hoagland, B., Butt, T.M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N., editores. *Fungi as biocontrol agents progress: problems and potential*. CAB International: Wallingford, p 311-346.
- Villaverde, M.L., Juárez, M.P., Mijailovsky, S. Detection of *Tribolium castaneum* volatile defensive secretions by SPME-CGC analysis. *J. Stored Prod. Res.*, enviado a publicar.

- Wang, C., Typas, M.A., Butt, T.M. 2002. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 213:251-255.
- Wang, C., St Leger, R.J. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:6647-6652.
- Witteveen, C.F.B., Veenhuis, M., Visser, J. 1992. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. 58:1190-1194.
- Wraight, S.P., Carruthers, R. I. 1999. Production, delivery and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops. En: Hall, F.R., Menn, J.J., editores. Biopesticides Use and Delivery. New Jersey: Humana Press. p 233-269.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A., Kock, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N., editores. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Wallingford: CAB International. p 253-287.
- Yadav, J.S., Loper, J.C. 1999. Multiple P450alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Gene 226:139-146.
- Yadav, J.S., Soellner, M.B., Loper, J.C., Mishra, P.K. 2003. Tandem cytochrome P450 monooxygenase genes and splice variants in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: cloning, sequence analysis, and regulation of differential expression. Fungal Genet. Biol. 38:10-21.
- Yan, H-Z., Liou, R.F. 2006. Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. Fungal Genet. Biol. 43:430-438.
- Zurek, L., Wes Watson, D., Schal, C. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against the German Cockroach (Diptoptera: Blattellidae). Biol. Control 23:296-302.

Publicaciones científicas derivadas de este trabajo de tesis:

1) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. N. Pedrini, R. Crespo, MP. Juárez. *Comparative Biochemistry and Physiology part C*, en prensa, doi: 10.1016/j.cbpc.2006.08.003 (2006).

2) Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. R. Crespo, N. Pedrini, MP. Juárez, GM. Dal Bello. *Microbiological Research*, en prensa, doi: 10.1016/j.micres.2006.03.013 (2006).

3) Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. N. Pedrini, MP. Juárez, R. Crespo, MJ. Tacconi de Alaniz. *Mycologia* 98(4): 528-534 (2006).

4) Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus orizae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains. GM. Dal Bello, S. Padín, MP. Juárez, N. Pedrini, M. De Giusto. *Biocontrol Science and Technology*, 16(2): 215-220 (2006).

5) Mycoinsecticides against Chagas disease vectors: Biochemistry involved in insect host hydrocarbon degradation. MP. Juárez, N. Pedrini, R. Crespo. En: S. Mas-Comas (Ed.), *Multidisciplinarity for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases*. Monduzzi Editore, Bologna, pp. 137-142 (2004).

6) Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. R. Crespo, MP. Juárez, G. Dal Bello, S. Padín, G. Calderón Fernández, N. Pedrini. *BioControl*, 47(6): 685-696 (2002).