

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS GENES PRODUCTORES DE
PROTEASAS TIPO SUBTILISINA Y TIPO TRIPSINA EN EL HONGO
Metarhizium anisopliae COMO FACTORES DE VIRULENCIA PARA SU
APLICACIÓN EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS PLAGA”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

BIOL. OSVALDO AVALOS DE LEÓN

Reynosa, Tamps

Noviembre 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG

para examinar la tesis titulada:
Identificación y análisis de los genes productores de proteasas tipo subtilisina y tipo tripsina en el hongo *Metarhizium anisopliae* como factores de virulencia para su aplicación en el control biológico de insectos plaga.

Presentada por el alumno:

Avalos
 Apellido paterno

De León
 Apellido materno

Oswaldo
 Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	7	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dra. Ninfa María Rosas García

Dr. José Luis Hernández Méndez

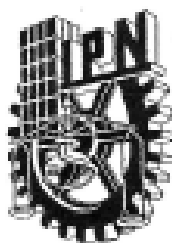
Dra. C. Patricia Larralde Corona

M.C. Elma Laura Salazar Marroquín

M.C. Alejandro Sánchez Varela

PRÉSIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. Ninfa María Rosas García



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa Tam, el día 2 del mes de Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Osvaldo Ávalos de León alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B091479, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Ninfa María Rosas García y cede los derechos del trabajo intitulado "IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS GENES PRODUCTORES DE PROTEASAS TIPO SUBTILISINA Y TIPO TRIPSINA EN EL HONGO *Metarhizium anisopliae* COMO FACTORES DE VIRULENCIA PARA SU APLICACIÓN EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS PLAGA".

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvar. Del Maestro esq. Elias Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México. Tels. 01-8999243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Osvaldo Ávalos de León
Nombre y firma

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE CUADROS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE SIMBOLOS Y/O NOMENCLATURA	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Generalidades de los hongos entomopatógenos	5
2.2 Aspectos a considerar en la aplicación de hongos entomopatógenos a nivel... de campo	6
2.3 Generalidades de <i>Spodoptera exigua</i>	7
2.3.1 Control de <i>Spodoptera exigua</i>	8
2.3.2 <i>M. anisopliae</i> para el control de otras especies de <i>Spodoptera</i>	8
2.4 Generalidades de la “mosca pinta”	9

2.4.1 Control de “mosca pinta”	10
2.4.2 <i>Metarhizium anisopliae</i> para el control de la mosca pinta	11
2.5 Aislamiento de hongos entomopatógenos	12
2.6 Etapas de la infección	12
2.6.1 Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto.....	12
2.6.2 Síntesis de enzimas encargadas de degradar la cutícula del insecto	13
2.6.2.1 Proteasas	15
2.6.2.2 Actividad de proteasas.....	16
2.6.2.3 Clonación del gen <i>pr1</i>	17
2.6.4 Invasión del hongo y expresión de genes.....	17
2.6.5 Regulación de genes durante la conidiogénesis	19
2.7 Mecanismo de defensa del insecto	20
2.7.1 Genes que afectan la virulencia de las cepas	21
2.8 Actividad de los hongos entomopatógenos sobre algunas plagas	22
2.8.1 Pruebas <i>in vitro</i>	22
2.9 Formulaciones	22
2.10 Avances moleculares para incrementar la virulencia en las cepas.....	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	27
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1 Activación de las cepas.....	29
6.1.2 Extracción y cuantificación del DNA Cloroformo-Octanol (24:1).....	29
6.1.3 Corrimiento de electroforesis para visualizar y cuantificar el DNA	30
6.1.4 Diseño de oligonucleótidos.....	31
6.1.5 Estandarización de las condiciones de PCR.....	31
6.1.6 Corrimiento de los productos de PCR.....	31
6.1.7 Secuenciación.....	32
6.1.8 Alineamientos.....	34
6.2 Análisis de la actividad enzimática.....	34
6.2.1 Preparación de los medio de cultivo.....	34
6.2.2 Análisis preliminar de la actividad enzimática.....	35
6.2.3 Análisis con sustratos de la actividad enzimática.....	35
6.3 Bioensayos de patogenicidad.....	36
6.3.1 Obtención de conidias.....	36
6.3.2 Colecta de insectos.....	36
6.3.3 Mosca pinta (<i>Prosapia</i> sp).....	36
6.3.4 Larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	37
7. RESULTADOS.....	39
7.1 Extracción de DNA.....	39
7.1.2 Oligonucleótidos.....	39

7.1.3 Estandarización de la PCR para identificar a los genes <i>pr1</i> y <i>pr2</i>	41
7.1.4 Identificación de los genes <i>pr1</i> por PCR	42
7.1.5 Amplificación del gen <i>pr2</i>	47
7.2 Análisis de las secuencias de los genes <i>pr1</i> y <i>pr2</i>	49
7.2.1 <i>pr1</i>	49
7.2.2 <i>pr2</i>	54
7.3 Motivos de las secuencias promotoras	56
7.4 Búsqueda de los ORF en las secuencias de genes <i>pr1</i> y <i>pr2</i>	57
7.5 Análisis de la actividad de proteasas	58
7.5.1 Análisis preliminar	58
7.5.2 Análisis con sustratos	59
7.6 Bioensayos	72
8. DISCUSIÓN	74
9. CONCLUSIÓN	78
10. RECOMENDACIONES	79
11. BIBLIOGRAFÍA	800
12.1 Anexo 1. Secuencias de genes <i>pr1</i>	98
12.2 Anexo 2. Secuencias de promotores	105
12.3 Anexo 3. Secuencias de gen <i>pr2</i>	1088
12.4 Anexo 4. ORF'S	110

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para desarrollar el programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional durante el periodo 2009-2011, y al Instituto Politécnico Nacional por las becas otorgadas tanto PIFI como Beca Tesis.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Concentración óptima de los reactivos para las reacciones de PCR para amplificar fragmentos de los genes <i>pr1</i> y <i>pr2</i>	41
2 Programa de temperaturas y ciclos empleados en el termociclador PCR System 9700 ® para la amplificación de fragmentos de los genes <i>pr1</i> y <i>pr2</i>	42
3 Reacción de secuenciación.....	33
4 Temperaturas del robocycler para la secuenciación.....	33
5 Oligonucleótidos diseñados para detectar diferentes genes del tipo de las subtilisinas y del tipo de las tripsinas en las cepas de <i>M. anisopliae</i>	40
6 Genes <i>pr1</i> (subtilisinas) y <i>pr2</i> (tripsinas) detectados en las diversas cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> proporcionadas por el ARSEF.....	56
7 Comparación de medias por el método de Tukey al 0.05 para la actividad enzimática de Pr1 en diferentes cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en base a la absorbancia registrada.....	60
8 Comparación de medias por el método de Tukey al 0.05 para la actividad enzimática de Pr2 en diferentes cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en base a la absorbancia registrada.....	61
9 Porcentaje de mortalidad en adultos de mosca pinta causado por diferentes cepas de <i>M. anisopliae</i>	72

10 Porcentaje de mortalidad en larvas de 1^{er} instar de *Spodoptera exigua* a los 10 días después de la inoculación con *M. anisopliae*.....73

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Extracción y cuantificación de DNA de las muestras de hongos Entomopatógenos.....	39
2 Detección por PCR del gen <i>pr1A</i>	43
3 Detección por PCR del gen <i>pr1B</i>	43
4 Detección por PCR del gen <i>pr1C</i>	44
5 Detección por PCR del gen <i>pr1E</i>	44
6 Detección por PCR del gen <i>pr1F</i>	45
7 Detección por PCR del gen <i>pr1G</i>	45
8 Detección por PCR del gen <i>pr1J</i>	46
9 Detección por PCR del gen <i>pr1K</i>	46
10 Detección por PCR del promotor <i>pr1</i>	47
11 Detección por PCR de un fragmento del gen <i>pr2</i>	48
12 Detección por PCR del fragmento restante del gen <i>pr2</i>	48
13 Alineamiento de la secuencia del gen <i>pr1A</i> de las cepas (798, 634 y 6347) de <i>M. anisopliae</i> con secuencias previamente reportadas en el NCBI correspondientes al gen <i>pr1A</i> de cepas de <i>M. anisopliae</i>	49

14 Alineamiento del gen de tripsina de las cepas de <i>M. anisopliae</i> 798, 6345 y 6347, comparadas con la secuencia de <i>M.anisopliae</i> (X78875.1).....	54
15 Motivos encontrados en el promotor del gen <i>pr1A</i>	57
16 Motivos encontrados en el promotor del gen <i>pr2</i>	57
17 Las diferentes cepas crecidas en medio gelatina (análisis preliminar de actividad enzimática).....	58
18 Cinética enzimática de Pr1 de la cepa 798.....	62
19 Cinética enzimática de Pr1 de la cepa 6342.....	63
20 Cinética enzimática de <i>pr1</i> de la cepa 6345.....	64
21 Cinética enzimática de Pr1 de la cepa 6347.....	65
22 Cinética enzimática de Pr1 de la cepa 3019.....	66
23 Cinética enzimática de Pr2 de la cepa 798.....	67
24 Cinética enzimática de Pr2 de la cepa 6342.....	68
25 Cinética enzimática de Pr2 de la cepa 6345.....	69
26 Cinética enzimática de Pr2 de la cepa 6347.....	70
27 Cinética enzimática de Pr2 de la cepa 3019.....	71

LISTA DE SIMBOLOS Y/O NOMENCLATURA

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
λ	Fago lambda
μg	Microgramos
μl	Microlitros
<i>Chit</i>	Gen de quitinasas
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético

EST'S	Expressed sequence tag
h	Horas
ha	Hectáreas
kDa	Kilodaltons
cm	Centímetros
min	Minutos
ml	Mililitros
K_2HPO_4	Fosfato monoácido de potasio
km	Kilómetros
kb	Kilobases
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio

mm	Milímetros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v	Peso volumen
pH	Potencial hidrogeno
<i>PstI</i>	Enzima de restricción
<i>prl</i>	Gen de tipo de las subtilisinas

Pr1 Proteasas del tipo de subtilisinas

pr2 Gen del tipo de las tripsinas

Pr2 Proteasas del tipo de tripsinas

RNAsa Ribonucleasa

rpm Revoluciones por minuto

SDS Docecilsulfato sódico

t Toneladas

TBE Tris borato EDTA

TE Tris EDTA

UV Ultra violeta

V Volt

RESUMEN

En este trabajo se utilizaron 4 cepas de *Metarhizium anisopliae* (798, 6342, 6335 y 6347) proporcionadas por la Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF) a las que se les evaluó los genes de proteasas, los cuales se correlacionaron con la patogenicidad causada por las mismas cepas contra adultos de mosca pinta y larva de *Spodoptera exigua*. Solo en las cepas 798, 6345 y 6347 se detectaron 8 de los 11 genes de subtilisina reportados, de igual manera se encontró un gen de tripsina. Sólo en la cepa 6342 no se detectó ninguno de los genes mencionados. No obstante todas las cepas presentan actividad enzimática cuando son expuestos en medio basal y medio basal suplementado con quitina. Las cepas que presentan mayor actividad de proteasa del tipo de las subtilisinas son las cepas 6347, 798 y 6345, mientras que para el tipo de las tripsinas es la cepa 6342. Para determinar la patogenicidad de las cepas se utilizaron adultos de mosca pinta colectados en la región, *Aeneolamia sp.* y *Prosapia sp.* y larvas del gusano soldado *Spodoptera exigua*. Los resultados de los bioensayos mostraron una mortalidad del 50% para la mosca pinta con la cepa 3019, del 30% con las cepas 798, 6342, y del 20% con las cepas 6345 y 6347. La mortalidad para las larvas de *Spodoptera exigua* son del 73.3% con la cepa 6342, 66.6 % con la cepa 6345, 60% con la cepa 798, 41% y 36% con las cepas 3019 y 6347 respectivamente. Finalmente se concluye que no existe una relación entre la virulencia y la presencia de los genes de proteasas por lo que la patogenicidad puede estar asociada a otros factores no determinados en este trabajo.

ABSTRACT

In this work we used 4 strains of *Metarhizium anisopliae* (798, 6342, 6335 and 6347) provided by the Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF) which protease gene content and pathogenicity were evaluated. The gene content was also correlated with the virulence caused by these strains to adults of the grass spittlebug and the beet armyworm larvae. Only in strains 798, 6345 and 6347 were detected 8 of 11 subtilisin genes previously reported, similarly trypsin gene was also found. Only in the 6342 strain was not detected any of the mentioned genes. All the strains exhibited enzyme activity when growth in basal medium and basal medium supplemented with chitin. The strains with higher subtilisins type protease are 6347, 798 and 6345, while for the trypsin type strain is strain 6342. To determine the pathogenicity of the strains, bioassays were conducted in adults of the grass spittlebug collected in the region, and identified as *Aeneolamia* sp. and *Prosapia* sp., and larvae of the armyworm *Spodoptera exigua*. The results of bioassays showed a mortality of 50% for the grass spittlebug with strain 3019, 30% with strains 798, 6342, and 20% with strains 6345 and 6347. The mortality for the larvae of *Spodoptera exigua* is around 73.3% with strain 6342, 66.6% with the strain 6345, 60% with strain 798, 41% and 36% with strains 3019 and 6347. Finally we conclude that there is no correlation between the virulence and the presence of protease genes so that the virulence may be associated with other factors not determined in this work.

1. INTRODUCCIÓN

Durante varios años el control biológico de plagas ha sido empleado a nivel mundial para combatir principalmente a insectos que atacan cultivos agrícolas de importancia económica. Las principales razones por las que se han buscado alternativas para la reducción del uso de los insecticidas químicos son su alta residualidad en el ambiente, el alto costo de los productos y la presión de selección que ejercen en las poblaciones de insectos cuya capacidad evolutiva les permite el desarrollo de mecanismos de resistencia (Metcalf, 1980). Otro aspecto importante que se debe considerar, es el efecto dañino que estos compuestos causan al hombre, tales como las intoxicaciones provocadas por no hacer uso del equipo necesario al momento de aplicar los productos en campo, o por tener mala o poca información sobre el producto a utilizar. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año, entre 500,000 y 1 millón de personas se envenenan por plaguicidas y entre 5,000 y 20,000 llegan a morir (citado por Valdez-Salas, *et al.*, 2000). También han sido registradas algunas enfermedades en humanos, asociadas a la acumulación en tejidos, de los diferentes grupos químicos que conforman a los plaguicidas (Rugman y Cosstick, 1990).

El término control biológico fue usado por primera vez para referirse al uso de enemigos naturales (introducidos o nativos) para el control de insectos (Smith en 1919 citado por Rodríguez del Bosque y Arredondo Bernal, 2007). En este tipo de control pueden utilizarse diversos agentes tales como bacterias, hongos, virus, nemátodos, protozoarios, parasitoides y depredadores (Rodríguez del Bosque y Arredondo Bernal, 2007).

Particularmente, los hongos existen en casi todos los ambientes, algunos como simbioses, saprófitos o como agentes causales de enfermedades en insectos a los cuales se les denomina hongos entomopatógenos. El modo de acción de los hongos entomopatógenos es por contacto y no requieren ser ingeridos por el hospedero, por esta

razón son útiles para regular poblaciones de insectos plaga que tienen aparatos bucales picadores-chupadores.

En la actualidad se han identificado y estudiado diversas especies de hongos entomopatógenos, los cuales son de interés para combatir a las plagas importantes que afectan a los cultivos. El uso de las nuevas herramientas de biología molecular permite seleccionar cepas fúngicas con características patogénicas particulares, lo que permite obtener cepas más potentes para mejorar la eficacia en campo, es decir obtener cepas más virulentas. En la actualidad se han estudiado diversos genes que intervienen en la virulencia como los genes *pr* y *chit*, que sintetizan enzimas que intervienen en la degradación de la cutícula de los insectos. De ahí la importancia del estudio tanto a nivel de genes como de proteínas. Las proteínas Pr1 y Pr2 son las que se encargan de degradar a las proteínas que componen la estructura de la cutícula, de tal forma que se va perdiendo la rigidez facilitando la penetración del hongo hacia el insecto. Por tal motivo las proteínas Pr1 y Pr2 son señaladas como factores de virulencia ya que se dice que sin éstas el proceso de infección no podría ocurrir. Algunos estudios han demostrado que ciertas cepas mutantes a las cuales se les han insertado múltiples copias de este gen presentan incrementos en la virulencia, siendo más agresivas contra los insectos blancos. De ahí el interés de estudiar estos genes, para poder seleccionar cepas con potencial, como una alternativa de control biológico para regular poblaciones de insectos de cultivos de interés económico en la región.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son organismos de vida libre que pueden encontrarse en hábitats acuáticos, terrestres y subterráneos (Ferron, 1978), sin embargo también se han aislado de cadáveres de insectos. Los hongos entomopatógenos pueden sobrevivir en condiciones poco favorables o en ausencia de su hospedero mediante las esporas que son estructuras de resistencia (Kenneth *et al.*, 1972; Wilding, 1973). Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de infectar cualquiera de las etapas de desarrollo de un insecto y a una gran variedad de órdenes de éstos, algunos hongos son más virulentos hacia ciertos insectos, mientras que para otros no lo son (Freimoser *et al.*, 2003). Algunos de los géneros de hongos entomopatógenos más importantes son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Entomophaga*, *Verticillum*, *Hirsutella*, *Aschersonia* y *Pandora* que pertenecen a los órdenes Entomophthorales, Moniliales y Sphaerosidales (García-Gutiérrez *et al.*, 2009).

Beauveria bassiana fue el primer hongo identificado como patógeno de insectos por Agostino Bassi en 1835 cuando observó al agente causal de la muscardina en el gusano de seda *Bombix mori* (Pramer *et al.*, 1965). Este hongo desarrolla un micelio blanco algodonoso que con el tiempo se torna de color cremoso. Las células conidiógenas se agrupan de forma compacta, y ocasionalmente se presentan en grupos solitarios, las conidias que producen son hialinas y tienen forma de botella (CIP, 2004). *Metarhizium anisopliae* fue aislado por Metschnikoff en 1879, a partir del coleóptero *Anisopliae austriaca* y fue descrito por Sorokin en 1883 (OMS, 1884). Este hongo infecta a más de 200 especies de insectos, distribuidos en más de 50 familias y se puede encontrar en casi todos los ambientes por eso se dice que es cosmopolita, pero es más común encontrarlo en hábitats agrícolas (Bidochka *et al.*, 1998; Samuels *et al.*, 1989; citado por Freimoser *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Sánchez-Peña *et al.*, 2011).

Este hongo se caracteriza por presentar un micelio de color verde olivo, el conidióforo nace del micelio y está irregularmente ramificado con dos o tres ramas en cada septo, las conidias se observan ligeramente pigmentadas de color amarillo a verde olivo y con aspecto algodonoso a compacto, las conidias presentan formas ovoides o cilíndricas, producidas en cadenas muy largas de sucesión basipétala, (Coria-Avalos y Vidales-Fernández, 1997; Padilla-Melo *et al.*, 2000; CIP, 2004).

2.2 Aspectos a considerar en la aplicación de hongos entomopatógenos a nivel de campo

Cuando los hongos entomopatógenos se aplican en campo, la efectividad es regulada por múltiples factores ambientales como la textura del suelo, el contenido de humedad, la aireación, la temperatura, el pH, la densidad poblacional del insecto plaga, la población de insectos hospederos alternantes, la presencia de depredadores, antagonistas entre otros, a diferencia de los estudios en laboratorio en donde prácticamente todos los factores están controlados (Studder *et al.*, 1990). Por citar algunos ejemplos donde el ambiente juega un papel muy importante, factores como, la humedad relativa y la temperatura son muy importantes para que se lleve a cabo el proceso de infección para los hongos entomopatógenos. *M. anisopliae* y *B. bassiana*, requieren de un 50% a un 100% de humedad relativa, y de temperaturas de 15° a 35°C para llevar a cabo su ciclo de vida (Walstad *et al.*, 1970), mientras que *Paecilomyces farinosus* necesita una humedad relativa del 86% al 100% (Dobreski, 1981, Carruthers *et al.*, 1985; Rath *et al.*, 1995; Hart y MacLeod, 1955; Ansaria *et al.*, 2004). Un ejemplo que ilustra la importancia de las condiciones ambientales es el caso del insecto *Hoplia philanthus*, que es una plaga de pastos y cultivos hortícolas, cuyo control con *M. anisopliae* se aplica en base a la temperatura ambiental (Ansaria, *et al.*, 2004).

2.3 Generalidades de *Spodoptera exigua*

Spodoptera exigua es un insecto que pertenece al orden Lepidoptera dentro de la familia Noctuidae y presenta una metamorfosis completa. Este insecto es cosmopolita y ataca a más de 90 especies de plantas ubicadas en Norte América siendo principalmente plantas con grano, y en las cuales las larvas son las causantes del daño en hojas y frutos (Pearson, 1982; Palumbo y Karens, 1996). Según estudios a nivel de campo las poblaciones de este especie (*S. exigua*) se presentan desde finales del verano hasta el otoño (Capinera, 1999). Este insecto comúnmente conocido como gusano soldado es originario de Asia, pero fue descubierto en Norte América alrededor de 1876 (Capinera, 1999).

Este insecto en etapas larvales presenta una coloración de blanca a verdosa y está cubierto por una capa de escamas blanquecinas que le dan el aspecto algodonoso. La hembra coloca alrededor de 300 a 600 huevos, los cuales son depositados sobre la superficie de la hoja, y en ocasiones cerca de la flor, estos huevos pueden eclosionar en 2 a 3 días dependiendo de las condiciones climáticas. Las larvas pasan por 5 estadios que se cumplen aproximadamente en 10 días, las larvas de primer y segundo estadio presentan coloraciones de verde pálido a amarillo, pero adquieren rayas pálidas al tercer estadio. En el cuarto estadio, la parte dorsal toma un color oscuro, presentando una raya lateral negra. Las larvas del quinto estadio son muy variables en apariencia, tendiendo a tener un color verde en la parte dorsal con un color amarillo en la parte ventral y con una raya lateral. En la parte dorsal y dorso lateral presenta unas manchas de color negro. Después llega la etapa de pupación que ocurre en el suelo y tarda aproximadamente 6 a 7 días dependiendo de las condiciones climáticas (clima cálido). La pupa presenta un color marrón claro y mide de 1.5 a 2 cm, posteriormente emergen los adultos, cuyas alas miden alrededor de 2.5 a 3 cm de envergadura. Las alas frontales son de color moteado gris y marrón. Las alas posteriores son más uniformes, de color gris con blanco y con una línea negra en el margen. La oviposición ocurre aproximadamente de 2 a 10 días después del apareamiento (Capinera, 1999).

2.3.1 Control de *Spodoptera exigua*

Para tratar de eliminar las larvas de *S.exigua* se han empleado algunos insecticidas tales como el spinosad, terbufenozide y metoxifenozide, sin embargo debido al surgimiento de individuos resistentes a estos insecticidas, se han implementado otras estrategias como el uso de algunas feromonas que se usan para evitar el apareamiento de adultos y así reducir las poblaciones de larvas. La liberación de parasitoides de las familias Ichneumonidae y Braconidae como por ejemplo *Cotesia marginiventris*, algunos poliedrovirus, e incluso se han empleado ciertos extractos botánicos como hermalina y ricino en combinaciones con *Bacillus thuringiensis* (Guimaraes *et al.*, 1995; Multon *et al.*, 2000; Kerns *et al.*, 2000; Urbaneja *et al.*, 2002; Rizwan-ul-Haq *et al.*, 2009).

2.3.2 *M. anisopliae* para el control de otras especies de *Spodoptera*

Para tratar de controlar a otras especies del género *Spodoptera* se han aplicado formulaciones de *M. anisopliae* sobre *S. frugiperda* en cultivos de maíz a una concentración de 1×10^{12} . El hongo fue aplicado de manera individual y combinado como triclorfón encontrándose en ambos tratamientos una respuesta similar (Lezama *et al.*, 2005). Así mismo se han aplicado *M. anisopliae* y *M. flavoviridae* como agentes de control en larvas de *Spodoptera littoralis* causando una mortalidad del 60% y 55% respectivamente (Amer *et al.*, 2008).

2.4 Generalidades de la “mosca pinta”

La mosca pinta también conocida como salivazo es una plaga muy importante de pastos que son de importancia para la ganadería. Afecta a otras especies de gramíneas, como la caña de azúcar, causando pérdidas de 9 t por ha en México (De la Cruz-Llanas *et al.*, 2005). La mosca pinta es un insecto hemimetábolo que mide de 6 a 9 mm de largo, el ciclo biológico comienza cuando la hembra deposita los huevecillos sobre el suelo (una hembra puede depositar de 40-100 huevecillos) que son de color cremoso, con forma oval, y una longitud promedio de 1.0 mm por 0.3 mm de diámetro, estos huevecillos pueden estar en estado latente hasta por 1 año hasta tener las condiciones ideales para eclosionar, necesitan de un 80-90% de humedad relativa, posteriormente las ninfas eclosionan y se les denomina salivazo debido a que están cubiertas con una espuma formada por una sustancia de consistencia mucilaginosa, secretada por las glándulas de Batelli, que se ubican a los lados del séptimo y octavo segmento abdominal (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1989). Esta espuma protege a las ninfas contra la desecación y del ataque de varios enemigos naturales. Las ninfas pasan por 5 instares, y esta etapa tiene una duración de 45.6 días. La etapa adulta tiene una duración entre 16 y 18 días, y la diferencia entre el macho y la hembra se hace en base a la conformación del genital externo. El ovipositor de las hembras de los cercópodos está conformado por un juego de 2 pares de láminas quitinizadas que se desprenden del octavo y noveno segmento abdominal y presenta una terminación que le sirve para ovipositar dentro del suelo o en lugares estrechos. El genital del macho está formado por la modificación del último segmento abdominal, el cual presenta en la parte ventral dos prolongaciones en forma de láminas cuya terminación, a diferencia de las hembras es roma (Rodríguez *et al.*, 2003; Thompson y León-González, 2005).

Entre los géneros de mayor importancia para la mosca pinta destacan *Prosapia* y *Aeneolamia* pertenecientes a la familia Cercopidae (Thompson y León-González, 2005). Las condiciones ambientales son sumamente importantes para la proliferación y el aumento de la población de este insecto, los daños económicos causados son uniformes

a lo largo del año en lugares húmedos, mientras que es restringido a seis meses en lugares secos (Valerio *et al.*, 2001; Holmann y Peck, 2002), además presenta una distribución neotropical (Brasil, Venezuela, Colombia, Panamá, Trinidad y Tobago, Nicaragua, Honduras, Guatemala, México, y El Salvador (Sáenz *et al.*, 1999; Gómez, 2007).

Prosapia simulans puede ser reconocida por algunas características morfológicas en el aparato reproductor. Presenta 2 dientes en la punta y una ligera banda coloreada que pasa transversalmente por el *pronotum* y otras 2 que pasan por los tergos, aunque esas bandas son generalmente reducidas o ausentes en las hembras, en México y América central los patrones de las bandas van de amarillo a rojo y de rosado a anaranjado. Su distribución es muy amplia, ya que se encuentran desde el nivel del mar hasta 3000 m.s.n.m. El género *Prosapia* se ha reportado en nueve estados de México (Chiapas, Guerrero, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz) (Peck *et al.*, 2001).

El género *Aeneolamia* presenta coloraciones variadas con bandas blancas transversales algunas veces interrumpidas en su área medial, pero algunos pueden carecer de una o las dos bandas, algunos pueden presentar la mancha V en los “hombros”. Para el género *Aeneolamia* se han reportado 2 especies en México *Aenolamia albofasciata* y *Aeneolamia contigua* (Thompson y León-González, 2005; Gómez, 2007).

2.4.1 Control de “mosca pinta”

Para el control de la mosca pinta se recomienda realizar diferentes prácticas culturales como son; buena preparación del suelo con labores de barbecho, cruza y subsuelo en los terrenos destinado a la siembra, destrucción de la maleza, sobre todo los pastos que crecen en los caminos, mejorar el drenaje para eliminar el agua en la

temporada de lluvias, la utilización de trampas amarillas con pegamento (Stickem) la cuales tienen un tamaño de 60X80 cm, el control químico se recomienda cuando se tienen poblaciones muy altas y focos importantes pero teniendo todos los cuidados para evitar efectos negativos, tanto para el medio ambiente como para la salud humana, sobre todo del personal que realiza la aplicación (Sáenz *et al.*, 1999; CESVETAB, 2006). Con la aplicación de *M. anisopliae*, debido a todos los efectos secundarios que trae consigo la aplicación de plaguicidas químicos, en México como en otras partes de América se ha tratado de controlar este insecto. En Costa Rica se han obtenido buenos resultados (Bautista-Gálvez y González-Cortes, 2005) aplicándose a una concentración de 2.5 a 5.0×10^{12} conidias/ha en las regiones cañeras (Sáenz *et al.*, 1999).

2.4.2 *Metarhizium anisopliae* para el control de la mosca pinta

En México se han evaluado aplicaciones con diferentes concentraciones de *M. anisopliae* para tratar a la mosca pinta sobre caña de azúcar (*Saccharum* spp), obteniendo una eficiencia de control del 98.7% cuando se aplica a una concentración de 1.5×10^{12} conidias/ha (Bautista-Gálvez y González-Corte, 2005). Se ha logrado obtener cepas de *M. anisopliae* a partir de muestras de mosca pinta (*Aeneolamia* sp) de diferentes estados de la Republica Mexicana, encontrando diferencias significativas en cuanto al grado de termo-tolerancia, ya que muestran una asociación entre la temperatura y el lugar donde fueron encontradas (Toriello *et al.*, 2008). Algunos datos obtenidos de otro estudio indicaron que después de la primera aplicación causaron una mortalidad del 29 al 37.3% de mortalidad en *Aeneolamia* spp, sin embargo al paso del tiempo el hongo fue infectando un mayor número de ninfas (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999).

2.5 Aislamiento de hongos entomopatógenos

Hay varias técnicas que se utilizan para el aislamiento de hongos entomopatógenos, a partir de muestras de suelo y de insectos muertos (Tajick-Ghanbary *et al.*, 2009) que utilizan la siguiente metodología: tomar 1 kg de diferentes sitios a una profundidad de 0-20 cm, posteriormente realizar diluciones con las muestras (1:5000 y 10000) y a partir de estas suspensiones inocular cajas Petri conteniendo medio de cultivo y estreptomycin como antibiótico, los aislados obtenidos se purifican posteriormente por cultivos monospóricos. (Sánchez-Peña *et al.*, 2011), utilizaron un insecto trampa para aislar hongos entomopatógenos, ellos introdujeron larvas de *Tenebrio molitor* en muestras de suelo que son incubadas a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ por 15 días y las larvas muertas o que presentaban crecimiento micelial fueron removidas y colocadas en otros recipientes de plástico con alta humedad e incubadas por 15 días a temperatura ambiente para la obtención de las conidias. Las conidias crecidas en el insecto trampa fueron sembradas en agar papa dextrosa (PDA) para su análisis. Otra técnica consiste en coleccionar insectos en diferentes estados de desarrollo que presenten signos iniciales o avanzados de estar infectados, después se pasan por varios lavados y con una aguja de siembra se pica el insecto donde presenta la mayor infección debido a la presencia del hongo y enseguida se coloca en un medio de cultivo adecuado (CIP, 2004).

2.6 Etapas de la infección

2.6.1 Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto

La infección comienza cuando la conidia se adhiere a la cutícula del insecto que está compuesta principalmente por proteínas, lípidos y carbohidratos, entre otras

moléculas. En el proceso de infección inicialmente se generan ciertas interacciones hidrofóbicas y fuerzas mecánicas. En este proceso participan las hidrofobinas, las cuales son proteínas que contribuyen a la fijación de las conidias a superficies hidrofóbicas, y cuya síntesis óptima ocurre a pH de 5.0-7.0. Recientemente se han encontrado y caracterizado otro tipo de proteínas como la CWP10, que pertenece a la familia de las hidrofobinas, ésta se encuentra ubicada en la pared de las conidias y está relacionada con la adhesión hidrofóbica (St. Leger, 1998; Wösten, 2001; Li *et al.*, 2010). Así mismo en el 2007 Wang y St. Leger, descubrieron la presencia de la proteína Mad1 en la etapa de adhesión a la cutícula, se considera que esta proteína es la encargada de realizar el proceso de adhesión de la espora a la cutícula y que es uno de los múltiples factores de virulencia del hongo, por lo tanto, si no se lleva a cabo la adhesión de la conidia sobre la cutícula del insecto, no se puede desencadenar todo el proceso de infección. De acuerdo a estudios de laboratorio se ha demostrado que después de la adhesión de las conidias sobre la cutícula del insecto, comienza el proceso de germinación y el desarrollo del apesorio, simultáneamente comienza la secreción de mucílago el cual, posiblemente participa en el transporte de las diferentes enzimas encargadas de la degradación de la cutícula del insecto (St. Leger 1996a; Moino *et al.*, 2002).

2.6.2 Síntesis de enzimas encargadas de degradar la cutícula del insecto

Una vez formado el apesorio ocurre la activación de ciertos genes que producen enzimas como las proteasas, quitinasas, lipasas, fosfolipasas, estererasas y fosfatasas las cuales, se han considerado como importantes factores de virulencia y cuya actividad es la de degradar la cutícula del insecto; sin embargo las proteasas Pr1 se consideran las más importantes para este proceso (Gabriel, 1968; Hajek y St. Leger, 1994; Maniani *et al.*, 2003; Freimoser *et al.*, 2003; Fang, *et al.*, 2009a). La regulación de la expresión de los genes productores de proteasas es inducida por los componentes presentes en la cutícula del insecto como fuente de carbono (Paterson *et al.*, 1993). Se ha encontrado en

M. anisopliae un factor transcripcional denominado PacC el cual es un activador de un gen alcalino y represor para genes ácidos ya que las diferentes proteasas actúan a diferentes pH, regulándose así para cada tipo de enzima, aunado es esto, la producción de ácido en la cepas de *M. anisopliae* se incrementa a pH altos. Por ejemplo las proteasas del tipo de las subtilisinas y tripsinas actúan bajo condiciones alcalinas de pH 8.0, las quitinasas a pH 5.0, las aminopeptidasas y metaloproteasas a pH de 7.0. (St. Leger *et al.*, 1998, 1999).

Se ha observado que las proteasas Pr1 son las más eficientes para degradar la cutícula (St. Leger *et al.*, 1996; Joshi *et al.*, 1995). Sin embargo algunas cepas de *M. flavoviride* producen proteasas del tipo de las subtilisinas (Pr1) y tripsinas (Pr2) que presentan diferencias en la actividad, siendo las proteasas Pr1 las que presentan mayor actividad con respecto a las proteasas Pr2 (St. Leger *et al.*, 1992; St. Leger *et al.*, 1996a; Pinto *et al.*, 2002).

Existen variaciones entre las proteasas de diferentes organismos a nivel de secuencias de aminoácidos (Shimizu *et al.*, 1993), sin embargo comparten secuencias conservadas, por ejemplo la proteasa Pr1 que pertenece al tipo de las subtilisinas, presenta un 61% de similitud con la proteinasa K del hongo *Tritirachium album* y un 56.6% con la proteasa de *B. bassiana*. En la proteasa Pr2, que pertenece al tipo de las tripsinas, se pueden distinguir dos isoformas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Estas isoformas (4.4 y 4.9) están localizadas en la periferia de la pared celular durante el crecimiento del hongo y se considera que las proteasas Pr2 complementan la actividad de las Pr1. Existen otros tipos de proteasas cuyos genes están distribuidos en cromosomas separados (Joshi *et al.*, 1997). Se han logrado identificar 11 proteínas que son expresadas por el hongo durante su crecimiento en la cutícula del insecto como son Pr1A, Pr1B, Pr1C, Pr1D, Pr1E, Pr1F, Pr1G, Pr1H, Pr1I y Pr1J. Todas las Pr1 con excepción de la Pr1C son del tipo de la proteinasa K, esta proteína está muy relacionada a las proteínas de *Bacillus spp.* (Freimoser *et al.*, 2003; Bagga *et al.*, 2004).

Para que se lleve a cabo la degradación de la cutícula del insecto, deben ocurrir ciertas interacciones dependientes del pH, entre aminoácidos libres y los radicales libres

que estén presentes sobre la cutícula (Bidochka y Khachatourians, 1994a; 1994b). Por ejemplo las proteasas de *B. bassiana* cuyas fracciones presentan diferentes pesos moleculares actúan a diferentes pH, la fracción A tiene actividad a un pH ácido (pH 6.0) mientras que la fracción B tiene actividad a pH básico (pH 9.0) (Kucera y Samsinakova, 1968).

En los hongos, las quitinasas se producen cuando su síntesis es inducida por la presencia del sustrato y presentan un papel fisiológico entre el crecimiento de la hifa y la morfogénesis (St. Leger *et al.*, 1996c). Las quitinasas son también producidas por hongos entomopatógenos (Gabriel 1968; St. Leger *et al.*, 1996b; Chaves-Berrato *et al.*, 2003) y éstas presentan actividades de endoquitinasa y exoquitinasa con pesos moleculares de 33-kDa y de 110-kDa respectivamente (St Leger *et al.*, 1986; Havukkala *et al.*, 1993).

2.6.2.1 Proteasas

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las cadenas de péptidos (MEROPS) y se encuentran en virus, bacterias y eucariotas (Rawlings y Barrett, 1994). Según al enlace peptídico al que son más activas se clasifican en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas desdoblan los enlaces dentro de la molécula y las exopeptidasas separan un sólo aminoácido del extremo carboxilo (Prieto-Bozano, 1999).

Muchas de las proteasas han sido clasificadas en base a múltiples alineamientos de aminoácidos. De acuerdo a su sitio catalítico se pueden clasificar en: serínproteasas, cisteínproteasas, aspárticoproteasas, metaloproteasas y proteasas de mecanismo catalítico desconocido, dos de las más grandes familias son las quimiotripsinas y las subtilisinas las cuales presentan arreglos similares en los residuos de His, Asp y Ser, pero difieren radicalmente en los plegamientos. Las subtilisinas son enzimas altamente alcalinas que se han encontrado en bacterias y hongos, por otra parte la mayoría de las

quimiotripsinas han sido encontradas en animales, hongos, protozoarios y plantas (Rawlings y Barrett, 1993; Siezen y Leunissen, 1997). La proteasa Pr2 es una proteína del tipo de las tripsinas que se puede expresar cuando la fuente de carbono es una proteína, como la albúmina de suero bovino (Paterson *et al.*, 1993), mientras que la proteína Pr1 es inducida por componentes de la cutícula del insecto. Sin embargo se ha observado que cuando el medio es suplementado con metionina los niveles de Pr1 aumentan y es posible que este aminoácido juegue un papel importante en la regulación de esta proteasa, aunque otros aminoácidos pueden reprimir la síntesis de estas proteínas (Paterson *et al.*, 1994; Tiago *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2005; Donatti *et al.*, 2007).

2.6.2.2 Actividad de proteasas

Para medir la actividad *in vitro* de diferentes proteasas se utiliza una gran variedad de sustratos sintéticos, como por ejemplo la actividad de Pr1 con el sustrato succinil-(alanina)₂-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilida y para Pr2 con el sustrato benzoil-fenilalanina-valina-arginina-*p*-nitroanilida (St. Leger *et al.*, 1987; Da Silvia-Pinto *et al.*, 2002; Tiago *et al.*, 2002; Días *et al.*, 2008; Donatti *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2010). Las proteasas Pr1 y Pr2 son las que presentan mayor actividad proteolítica en la superficie de las conidias, esto es reconocido en las primeras etapas de la infección. Sin embargo, existen toda una amplia variedad de enzimas que son secretadas durante el proceso de patogénesis, lo cual les confiere la habilidad a los hongos entomopatógenos para atacar a sus hospederos (Santi *et al.*, 2010). Ali *et al.*, (2010) utilizaron el filtrado de 3 aislados de *Isaria fumosorosea* crecidos con quitina como única fuente de carbono, este filtrado conservó la virulencia y la capacidad para ocasionar la muerte a larvas de *Plutella xylostella*, aunado a esto el aislado que presentó mayor producción de proteasas Pr1 y Pr2 presentó los tiempos medios de supervivencia más bajos con respecto a los demás aislados. Según Castellanos-Moguel *et al.*, (2007), la cepa de *Paecilomyces fumosoroseus* que presentó mayor actividad de proteasas totales y mayor actividad de

proteasas del tipo Pr1, presentó mayor virulencia con una baja concentración de conidias hacia la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*.

2.6.3.3 Clonación del gen *pr1*

A partir de cDNA, el gen *pr1A* de diferentes cepas de *M. anisopliae* ha podido ser caracterizado, clonado y expresado. Por otra parte se ha secuenciado el promotor de dicho gen, encontrando ciertas secuencias que tienen que ver con su regulación (Screen *et al.*, 1997). El gen *pr1A* presenta 4 exones y tres intrones, la secuencia del cDNA tiene un promedio de 1319 pb, que codifica un polipéptido de 390 aminoácidos aproximadamente, con un peso de 26 kDa. Para llevar a cabo la expresión de este gen se necesitan sistemas que cumplan ciertas características, por ejemplo algunas modificaciones postraduccionales que ocurren en organismos eucariotas y para ello se utiliza el sistema *Pichia pastoris* (Zhang *et al.*, 2008). Por otra parte también se ha clonado y secuenciado el gen *pr1* del hongo *Beauveria brongniartii*, este gen está conformado de 4 exones y 3 intrones que representa un fragmento de 1732 pb, el cDNA tiene un tamaño de 1550 pb y contienen un ORF de 1140 pb codificando a una proteína de 380 aminoácidos, compartiendo una identidad del 67% con la proteína de *M. anisopliae* (Sheng *et al.*, 2006).

2.6.4 Invasión del hongo y expresión de genes

Una vez degradada la cutícula, la hifa comienza el proceso de penetración invadiendo el cuerpo graso que se localiza por debajo de la cutícula, posteriormente las hifas invaden el tejido muscular, el tracto digestivo, el tejido nervioso, así como el epitelio intestinal hasta llegar finalmente al lumen del intestino. Las hifas van utilizando

los nutrientes disponibles y liberando diversos metabolitos secundarios mientras que los niveles de proteasas son regulados durante la etapa de la invasión del hemocele (Sajap y Kaur, 1990; St. Leger y Bidochka, 1996c; Small y Bidochka, 2005). Una vez que el hongo entra al hemocele puede producir otros tipos de metabolitos llamados destruxinas, las cuales se han relacionado con la virulencia y la toxicidad. Estas destruxinas afectan a varios organelos blanco como las mitocondrias, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear. Los síntomas que causan son parálisis de las células, disfunción del intestino medio, de los túbulos de Malpighi y del tejido muscular (Dumas *et al.*, 1994; Kershaw *et al.*, 1999). En *M. anisopliae* se han caracterizado las destruxinas A, B y E, cuya expresión está influida por la fuente de carbono (Wang *et al.*, 2004; Kershaw *et al.*, 1999). La mayoría de los aislados de *M. anisopliae* que son virulentos para *Manduca sexta* producen diferentes tipos y cantidades de destruxinas, sin embargo en un aislado altamente virulento no se observó la producción de destruxinas (Kershaw *et al.*, 1999).

La utilización de los nutrientes disponibles de la hemolinfa del insecto es muy importante para el éxito de la invasión. *M. anisopliae* secreta una enzima llamada trehalasa sintetizada por el gen *atm1* que se encarga de hidrolizar la trehalosa disponible en la hemolinfa de los insectos y cuya presencia se ha detectado en la superficie de la conidia durante la germinación (Xia *et al.*, 2002; Santi *et al.*, 2010). Por otra parte en *M. anisopliae* se ha caracterizado el gen *mos1* que es expresado en la hemolinfa del insecto, se relaciona con la presión osmótica dentro de la hemolinfa, también se ha relacionado con los procesos de desarrollo del apresorio y las hifas (Wang *et al.*, 2008). El gen *mcl1* codifica una proteína con dominios N-terminales hidrofílicos que se presenta en la pared celular por la inducción de una región extendida de colágeno glicosilada, la proteína sintetizada de este gen está relacionada con evitar la fagocitosis de los hemocitos que se encuentran en la hemolinfa (Wang y St. Leger, 2006).

Con la técnica de hibridación supresiva-sustractiva se identificaron los genes expresados en la hemolinfa de la langosta *Locusta migratoria* que fue infectada con *M. anisopliae*, donde resultaron 120 EST's que son reguladas durante la colonización de la hemolinfa. Solamente el 35% de los genes se asoció con alguna función conocida de

procesos celulares. Es posible que el otro 65% de los genes estén involucrados con el proceso de la invasión, ya que presentan una baja similitud con la base de datos “non-redundant (NR)” del National Center for Biotechnology Information (Zhang y Yuxian, 2009). Al hacer comparaciones de los genes que se expresan en la hemolinfa de los insectos, la mayor parte coinciden con secuencias de genes presentes en Basidiomycetes, bacterias y plantas. La expresión de los genes varía según la cepa y probablemente está en función de las condiciones ecológicas de la misma, así mismo se han identificado algunas proteínas con funciones de tripsinas, quimiotripsinas, carboxipeptidasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, fosfatasas, metaloproteasas, aminopeptidasas, aspartilproteasas, etc. (Freimoser, *et al.*, 2003).

Después de la muerte del insecto, el micelio emerge a través de los espiráculos, boca y membranas intersegmentales (Karsahaw *et al.*, 1999; Moino *et al.*, 2002). Los factores abióticos como la lluvia y el viento pueden ayudar a dispersar las conidias las cuales pueden adherirse a otros insectos (Hall y Dunn, 1957; Visser y Hassal, 1987; Gilbert, 1994).

2.6.5 Regulación de genes durante la conidiogénesis

El hongo *Metarhizium anisopliae* presenta 2 patrones de desarrollo bajo la privación de nutrientes: la formación del apresorio y la conidiogénesis. El gen *cag7* se regula según el contenido de nitrógeno en el medio, a mayor contenido de nitrógeno, menor expresión del gen. La proteína sintetizada por el gen *cag7* presenta una homología del 99.7% con la proteasa Pr1, este gen es regulado al menos 2 veces durante el ciclo de la patogénesis, una vez durante las primeras etapas de la infección en la cual, ocurre la formación de apresorio y la otra durante la última etapa de la infección, durante la formación de las conidias (Small y Bidochka., 2005). Durante la conidiogénesis la expresión de algunos genes de mantenimiento (*act*, *gpd*, *tef*, *try*, *ubi* y *18sRNA*) varía de acuerdo a las diferentes etapas de crecimiento del hongo, además de la producción de

una hidrofobina por el gen *ssga* la cual, es también detectada durante esta etapa (Fang y Bidochka, 2006).

2.7 Mecanismo de defensa del insecto

La primera barrera de defensa es la cutícula del insecto, está compuesta principalmente de fibras de quitina embebida en una matriz de proteínas las cuales, varían entre las especies de insectos (Anderson, 1974). Una vez que el hongo rompe la primera barrera, las hifas dentro del hemocele deben superar varios mecanismos inmunodefensivos del insecto constituidos por el sistema humoral y el celular (Maniani *et al.*, 2003; Téllez-Jurado *et al.*, 2009). En el sistema humoral circulan proteínas antibióticas y otras moléculas que circulan en el hemocele como la fenoloxidasa, que es la enzima responsable de la melanización en insectos y otros artrópodos (Söderhäll y Cerenius, 1992). La melanina es un pigmento pardo-negruzco que tiene diversas propiedades biológicas tales como la inhibición de actividades enzimáticas bacterianas y fúngicas (Smith y Söderhäll, 1983). Se ha observado que en el proceso de melanización en el hospedero se distinguen tres patrones de intensidad de la melanización de la cutícula del integumento y de la pared traqueal lo que indica un proceso de defensa del insecto (Fuguet y Vey, 2004). El sistema celular lo constituyen los hemocitos que son células que circulan en la hemolinfa con capacidad de fagocitar sustancias extrañas (Lavina y Strand, 2002).

El gusano de seda *Bombyx mori* libera ciertos inhibidores de proteasas denominados A, E, F y D, presentan mayor actividad contra las proteasas de *Aspergillus melleus* y *B. bassiana* (Yoshida *et al.*, 1990). La dieta en los insectos es otro factor que puede afectar el desarrollo de la enfermedad ya que se ha determinado que algunos compuestos en las dietas pueden inhibir la infección, causando diferencias en la mortalidad de los insectos (Tefera y Pringle, 2003).

2.7.1 Genes que afectan la virulencia de las cepas

En el hongo *M. anisopliae* se ha caracterizado un gen llamado *cag 8* que sintetiza una proteína G, la cual, está relacionada con la producción de conidias tanto en medios de cultivo como en el insecto. Esta proteína está formada por 441 aminoácidos con una masa molecular aproximadamente de 49.9 kDa, presenta dos intrones uno de 451 y otro de 122 pb. La proteína sintetizada por este gen es ortóloga con otras proteínas como las RGS encontradas en hongos filamentosos como *Aspergillus* sp. En algunos experimentos con cepas transformantes, donde el gen *cag8* es interrumpido, la mortalidad de los insectos se ve disminuida, este gen está involucrado en la formación de conidias, contrastando con los porcentajes de mortalidad de la cepa silvestre. Además la interrupción de este gen (*cag8*) afecta a la expresión del gen *ssgA* que codifica para una hidrofobina, mientras que la expresión del gen *pr1A* no se ve afectada. Por otra parte la proteína del gen *mapka1*, *Metarhizium anisopliae* proteína quinasa A1 que está compuesta de 522 aminoácidos, juega un papel importante en la regulación de muchos procesos celulares incluyendo los de aquellos genes que están relacionados con la virulencia y que son expresados una vez que hace contacto la conidia con la cutícula (Fang *et al.*, 2007, 2009b).

Otro factor sumamente importante es la composición química de la cutícula del insecto, la cual varía según el tipo de insecto, sin duda es de gran importancia ya que si la conidia no logra adherirse a la superficie de la cutícula, la patogenicidad se verá afectada (Gillespie *et al.*, 1998; Lord y Howard, 2004). Otro aspecto importante según Shah *et al.*, (2007) al hacer repetidos subcultivos se ve afectada la virulencia y así mismo la producción de las proteasas Pr1 y la capacidad de adhesión de la conidia al insecto, pero esto se incrementa la adhesión y la virulencia cuando se utilizan sustratos a base de cutícula y en aquellos medios con extracto de levadura.

2.8 Actividad de los hongos entomopatógenos sobre algunas plagas

2.8.1 Pruebas *in vitro*

Las pruebas *in vitro* sobre citotoxicidad son necesarias para definir la concentración de algún compuesto con potencial para inducir la muerte celular (Eisenbrand *et al.*, 2002). La elección de los insectos apropiados para la evaluación de los metabolitos fúngicos es algo que se debe de considerar, ya que hay diferencias entre las cepas y la susceptibilidad del insecto (Pangrahi, 1993). Algunos metabolitos de diferentes hongos importantes para la agricultura incluyendo los de los hongos entomopatógenos, se han probado en la línea celular SF-9 de *Spodoptera frugiperda* y se ha observado sensibilidad a fusarenon X (FUS), diacetoxyscirpenol (DAS), nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON) pertenecientes a los tricotecenos producidos por *Fusarium sp* y algunos otros metabolitos como beauvericina (BEA) por *Beauveria sp*, eniantina (ENN) por *Fusarium sp*, gliotoxina (GL) por *Aspergillus sp*, y zearalenona (ZEA) por *Fusarium sp* (Fornelli *et al.*, 2004).

2.9 Formulaciones

La mayoría de las formulaciones basadas en hongos que existen para controlar diferentes plagas están elaborados a base de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. (Monzón 2001; de Feria y Wraight, 2007). Existen diferentes tipos de formulaciones para llevar a cabo la aplicación en campo, en donde la formulación consiste en mezclar el ingrediente activo con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos siempre y cuando estos compuestos no tengan algún efecto desfavorable para el ingrediente activo. La formulación puede ser seca o en polvo humectable en donde se

utiliza un vehículo, el cual puede ser de origen vegetal. Líquida o emulsificable en donde se utiliza un líquido solvente y un emulsificante. El líquido debe evitar la absorción de agua por parte de las conidias y mantener su viabilidad. Otro factor importante es tomar en cuenta la temperatura de almacenamiento de las esporas, por ejemplo a 8°C éstas pueden permanecer viables por lo menos 1 año, mientras que a altas temperaturas se puede afectar su viabilidad (Walstad *et al.*, 2004). Otro dato que puede ser considerado para tratar de activar la cepas es el que Rodríguez-Colorado *et al* (2002), mencionan que las conidias almacenadas, durante 3 meses en agua destilada a una temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, presentan porcentajes de germinación por arriba del 90%.

La forma de almacenamiento y los aditivos que se utilizan en las formulaciones para la aplicación de *M. anisopliae* son de suma importancia para que no pierdan la virulencia, las conidias deben conservar una capacidad de germinación entre el 80 y el 90 %, sin embargo esta capacidad declina con el tiempo y con las temperaturas de almacenamiento. Es importante considerar, de acuerdo a Rangel *et al.*, (2008) que las conidias son sometidas a cierto nivel de estrés durante su obtención en el laboratorio lo que influye en el aumento o disminución de la virulencia y la capacidad de germinación y la adherencia al insecto.

Algunas formulaciones a base de *B. bassiana* se pueden aplicar en seco sobre la superficie del agua para matar larvas de *Anopheles albimanus*, *Culex pipiens*, y *C. tarsalis*. En los adultos de *C. pipiens*, *C. tarsalis*, *Aedes aegypti*, *A. sierrensis*, *A. nigromaculis* y *A. albimanus* expuestos a las conidias se ha observado una mortalidad del 100% a los 5 días después de la aplicación (Clark *et. al.*, 1968).

La palomilla del manzano *Cydia pomonella*, es una de las principales plagas que ataca al manzano y el fruto es penetrado por más de una larva (Geier, 1963). Se ha determinado la eficacia de *B. bassiana* contra la palomilla del manzano *C. pomonella* al causar únicamente un 2.38% de daños. *B. bassiana* también puede actuar con capacidad ovicida para *Tetranychus cinnabarinus* (García-Gutiérrez, *et al.*, 2004; Shi y Feng, 2004; Falcon y Huber, 1991).

2.10 Avances moleculares para incrementar la virulencia en las cepas

Con las técnicas de biología molecular se han obtenido cepas recombinantes que son más eficientes para utilizarlas como agentes de control hacia insectos plaga. La sobreexpresión del gen *pr1* produce una proteína del tipo de las subtilisinas lo cual incrementa la virulencia de *M. anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1996d), así mismo la sobreexpresión del gen de quitinasa (*chit1*) incrementa la virulencia de las cepas de *B. bassiana* hacia áfidos (Fang *et al.*, 2005). La fusión de estos dos genes resulta en un efecto sinérgico para la degradación de la cutícula del insecto, obteniendo una cepa recombinante en donde se sobreexpresan los genes de *chit* y *pr1* resultando en un incremento en la virulencia de *B. bassiana* al degradar *in vivo* la cutícula del insecto más eficientemente que la cepa silvestre (Fang *et al.*, 2009a). Por otra parte se ha obtenido una cepa de *B. bassiana* la cual es capaz de expresar el gen *aaIT*, que codifica para una neurotoxina de alacrán y el gen *pr1* de *M. anisopliae*, pero cuando se expresan en la misma cepa no presentan actividad sinérgica, en cambio cuando se expresa por sí sola la neurotoxina se reducen los tiempos letales medios en *Dendrolimus punctatus* y *Galleria mellonella* (Lu *et al.*, 2008).

El hongo *Verticillum lecanii* se usa para controlar áfidos causando epizootias con resultados favorables (Yokomi y Gottwald, 1998; Hsiao *et al.*, 1992). Algunos polimorfismos en las regiones IGS (espacios intergénicos) de *V. lecanii* se han relacionado con la patogenicidad del hongo; éstos fueron clasificados en 3 grupos según los productos amplificados por PCR en productos de 4.0 kb (IGS tipos L), 3.0 kb (tipo M) y 2.3 kb (tipo S). Los aislados IGS-L causaron mayor mortalidad en áfidos. (Sugimoto *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos entomopatógenos en la actualidad son de gran importancia para controlar las poblaciones de insectos plaga, esto es debido a su modo de acción con respecto a otros microorganismos, y que a su vez está relacionada con la biología del insecto a tratar, es por ello que son fuente de investigación para poder comprender y determinar los factores que intervienen en el proceso de patogenicidad. A la fecha se han empleado diversas técnicas de biología molecular para tratar de dilucidar este proceso.

Diversos autores han propuesto que los principales factores de virulencia de estos hongos son las proteínas con actividad enzimática que intervienen en la degradación de la cutícula, debido a su composición la cual es una matriz de filamentos de quitina que embeben proteínas y lípidos entre otras moléculas (St. Leger *et al.*, 1992; St. Leger 1996b). Estas enzimas marcan la pauta para que el hongo pueda penetrar la cutícula del insecto y alimentarse de los nutrientes que están en el hemocele provocando un desequilibrio por la producción de diferentes metabolitos sintetizados por el hongo causando la muerte, lo que se ve reflejado en la disminución de la población y en el daño causado a la planta.

Algunos autores han reportado que los genes de mayor importancia son los *pr1* que codifican para enzimas del tipo de las subtilisinas que se expresan en las primeras etapas de la infección, cuando empieza a formarse el apresorio y son localizadas en la periferia del mismo. Estas enzimas se encargan de degradar a las proteínas que conforman la barrera de protección (cutícula), quedando de alguna manera debilitada la barrera física que hay entre el insecto y el medio exterior (St. Leger *et al.*, 1992). Se estima que la cutícula está compuesta de un 70% de proteínas (St. Leger *et al.*, 1986). Por otra parte la expresión de los genes *pr2* que codifican para enzimas del tipo de las tripsinas complementan la función de las proteínas Pr1 cuya expresión esta inducida por componentes presentes en la cutícula del insecto (Paterson *et al.*, 1994; St. Leger *et al.*, 1996b).

Otros estudios señalan la gran importancia de estas proteínas para ser consideradas como indicativo de la virulencia del hongo debido a su gran potencial para causar la reducción de poblaciones en insectos (Ali *et al.*, 2010).

En algunos trabajos en los cuales se ha llevado a cabo la sobreexpresión del gen *pr1* se ha obtenido un incremento en la velocidad de muerte del insecto y por ende en la disminución del daño del insecto hacia la planta (St Leger., 1996d).

Por estas razones consideramos que la caracterización molecular de los genes *pr* en diferentes cepas de *M. anisopliae* así como la asociación a su virulencia permitirá conocer la capacidad del hongo para controlar una plaga y así poder establecer un potencial biotecnológico, para evitar pérdidas económicas importantes en la agricultura de la región y de México.

4. HIPÓTESIS

- Las cepas de *Metarhizium anisopliae* poseen al menos un gen asociado a la producción de proteasas tipo subtilisina y tripsina.
- La producción de proteasas en *M. anisopliae* está asociada a la virulencia del hongo.

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar los genes productores de proteasas en cepas de *Metarhizium anisopliae*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar genes productores de proteasas tipo subtilisinas y tripsinas.
- Caracterizar molecularmente los genes encontrados de proteasas.
- Analizar la relación entre la presencia del gen y la virulencia del hongo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Activación de las cepas.

Las cepas de los hongos entomopatógenos fueron proporcionadas por la Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal (ARSEF), aislados a partir de mosca pinta con las siguientes claves 798, 6342, 6345, 6347, 3019 y 3345, esto con la finalidad de tener cepas patógenas para este insecto (mosca pinta). Las cepas se activaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) enriquecido con extracto de levadura al 1% y 25 µg/ml de estreptomicina para evitar el crecimiento de bacterias, los matraces se incubaron por 48h a 28°C con una agitación de 200 rpm.

6.1.2 Extracción y cuantificación del DNA Cloroformo-Octanol (24:1)

(Raeder y Broda, 1985)

Para la extracción del DNA de cada cepa se utilizó el método de Cloroformo-Octanol (24:1), primero se tomó 1 ml de un cultivo de 48 h, se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se realizaron 3 lavados con agua mili Q estéril para obtener el micelio y eliminar los restos del medio de cultivo, estos lavados consistieron en resuspender las células en agua mili Q y centrifugar y desechar el sobrenadante. Posteriormente en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, se colocaron 100 µl de micelio (por cada muestra) y se resuspendió en 300 µl de agua miliQ. Los tubos con la biomasa se colocaron en nitrógeno líquido por 20 min y se maceraron con un pistilo estéril por 5 min o hasta obtener la muestra homogénea. A cada tubo se agregaron 500 µl del buffer de extracción (Tris-HCl 200mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5%), se

homogenizaron las muestras y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se agregaron 500 µl de cloroformo-octanol (24:1) a cada tubo y se mezclaron en el votrex (Genie 2 G-560, N.Y., EE.UU.) a velocidad máxima por 5 min. Los tubos fueron sometidos a centrifugación (Hemle Z160M, Wehingen, Alemania) a 13,000 rpm por 30 min. y se transfirió la fase acuosa a otro tubo de 1.5 ml realizando estos lavados 3 veces. Posteriormente se agregaron 4 µl de RNAsa (20 mg/ml) y cada tubo se incubó en un termomixer (Eppendorf 22331, Westbury N.Y., EE.UU.) a 37°C por 30 min. Enseguida se adicionaron 500 µl de isopropanol, para precipitar el DNA y se mezcló por inversión incubando a -20°C por 30 min, nuevamente se volvió a centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se agregó etanol al 70% y se mezcló por inversión suavemente para lavar la pastilla de DNA. Posteriormente se volvió a centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Después se dejó secar la pastilla manteniendo el tubo invertido, y por último se resuspendió en 50 µl de TE1X y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.1.3 Corrimiento de electroforesis para visualizar y cuantificar el DNA

Para visualizar el DNA obtenido y cuantificarlo se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer de TBE 0.5X, se dejó solidificar a temperatura ambiente y se colocó en una cámara de electroforesis Mini Sub Cell (Modelo MGU-102T, Del Mar, CA.). Como marcador de masa se utilizó 1µl de DNA del fago lambda a 500 ng/µl y 2 µl de buffer de xilencianol-bromofenol en glicerol al 30% de acuerdo a Sambrook y Russell (2001) y 2µl de Sybr® Gold (Molecular Probes, Invitogen, Carlsbad, California EE.UU.). Se mezclaron 1 µl de cada muestra y 2 µl del Sybr® Gold, y se colocaron en los carriles del gel de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V por 1 h. Una vez terminado el tiempo de corrimiento, el gel se visualizó con luz UV en un fotodocumentador con el programa Kodak Molecular Imaging, se analizó la imagen para ver la masa estimada de cada una de las muestras y la calidad de las mismas.

6.1.4 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos se realizó con el programa Lasergene 8 de DNAStar® con la opción PrimerSelect, a partir de las secuencias disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar un fragmento de los genes *pr1* que expresa una proteína del tipo de las subtilisinas y otro llamado *pr2* que sintetiza una proteína de tipo tripsina. Los oligonucleótidos elegidos fueron sintetizados por Biosynthesis Inc. EE.UU..

6.1.5 Estandarización de las condiciones de PCR

La estandarización para las condiciones de PCR, se realizó ajustando las concentraciones de los reactivos (*taq* DNA polimerasa, buffer de *taq* DNA polimerasa, dNTP's, y oligonucleótidos) como se observa en el Cuadro 1. Posteriormente se optimizaron las temperaturas del termociclador en base a la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, por cada reacción se colocó un control (agua miliQ) Cuadro 2. Las reacciones de PCR se corrieron en un termociclador (Gen Amp PCR System 9700, Singapore).

6.1.6 Corrimiento de los productos de PCR

A partir del producto de PCR se tomó 1 µl y se mezcló con 2 µl de Sybr® Gold. Como estándar de masa molecular se utilizó el marcador, λPstI mezclado con 2 µl de Sybr® Gold y posteriormente se cargaron tanto las muestras como el marcador en un gel de agarosa al 1.5%, colocado en la cámara de electroforesis. El buffer de corrida fue

TBE al 0.5X y la electroforesis se corrió a 80 V durante 1 h. Los resultados se visualizaron en un foto-documentador con luz UV acoplado al programa Kodak Molecular Imaging.

6.1.7 Secuenciación

Los productos de PCR que mostraron una sola banda se purificaron para ser secuenciados con el kit Big Dye terminator v3.1 (Applied, Biosystems, California, EE.UU.). Como primer paso, se purificó el producto de PCR, se tomaron 5 μ l directamente del producto amplificado y se agregaron a un nuevo tubo conteniendo 2 μ l de EXOSAP, esta reacción se incubó a 37°C por 15 min, con agitación a 400 rpm en un termomixer (Eppendorf 22331, Westbury N.Y., EE.UU.) después la reacción fue inactivada a una temperatura de 80°C durante 15 min con la misma agitación.

De la mezcla que contenía el producto de PCR purificado con el EXOSAP, se tomaron 3 μ l para la reacción de secuenciación a un volumen final de 10 μ l como se muestra en el siguiente, Cuadro 3, cada reacción se llevó a cabo con los oligonucleótidos ya sea con el sentido y/o antisentido según el caso tomando en cuenta el tamaño de la amplificación, la reacción se colocó en el termociclador robocycler gradient 96 (Stratagene, Ceder Creek, Texas) programado con las temperaturas que se muestra en el Cuadro 4. Después de terminar el programa del termociclador se llevó a cabo la purificación de la reacción de secuenciación, para lo cual se tomaron 10 μ l de la reacción más 2 μ l de xterminador y 9 μ l de SAM y se mezcló en un vortex. La mezcla se incubó en un termomixer (Eppendorf 22331, Westbury N.Y., EE.UU.) bajo estas condiciones 1300 rpm por 30 min a 25°C. Posteriormente la mezcla se volvió a homogenizar y se centrifugó (Hemle Z160M, Wehingen, Alemania) a 13,000 rpm por 2 min. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y éstos fueron colocados en una gradilla cubierta con papel aluminio para realizar la secuenciación en un secuenciador automático (Applied Biosystem 3130, Japón).

Cuadro 3.- Reacción de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Volumen en μl
Buffer big dye v 3.1.	5X	2
Agua milli Q.	-	2.5
Big dye v3.1 ready mix		2
Oligonucleótido	5 μ M	5
Templado		3
Volumen final		10

Cuadro 4.- Temperaturas del robocycler para la secuenciación.

Temperatura en $^{\circ}$C	Tiempo	Ciclos
96	1 min	1
96	10 s	
55	5 s	25
62	4 min	
62	1 min	1
6	5 min	1

Los electroferogramas obtenidos de cada una de las muestras se visualizaron y se editaron con el programa Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Minnesota, EE.UU.). El ensamble de las secuencias se realizó en el programa Lasergene 8 DNASTar® (Madison Wi53705, EE.UU.).

6.1.8 Alineamientos

Las secuencias editadas de cada uno de los genes, fueron alineadas para determinar los porcentajes de identidad entre ellas y con las reportadas en la base de datos del NCBI, utilizando los programas ClustalX2, Gene Doc 2.7 y BioEdit versión 7.0.0 que son de acceso libre. Posteriormente se obtuvieron las secuencias aminoacídicas para su comparación con otras proteínas de la base de datos del NCBI.

6.2 Análisis de la actividad enzimática

6.2.1 Preparación de los medio de cultivo

Cada cepa fue sembrada en cajas petri con PDA mas extracto de levadura al 1% y estreptomicina (25 µg/ml). Las cajas se incubaron a una temperatura de 25 °C por 18 días o hasta observar la esporulación, posteriormente se seleccionaron 2 cajas por cada cepa a las cuales se les agregó 1 ml de Tween al 0.05% para recuperar y resuspender las conidias. A partir de la suspensión homogénea de conidias se realizó una dilución 1:10 para realizar su conteo en la cámara de Neubauer. La concentración se ajustó a 1×10^9 conidias/ml, para inocular 50 ml de medio basal (MgSO_4 0.02 p/v, K_2HPO_4 0.01% p/v) suplementado con 1% p/v de quitina de camarón y un medio basal sin quitina que fue utilizado como control. Los matraces se incubaron en un agitador orbital (Lab-line®, Illinois, EE.UU.), a 180 rpm, a 30°C por 4 días. Cada 24 h se tomaron alícuotas de 3 ml para extraer el extracto crudo. Cada alícuota previamente filtrada a través de una gasa se colocó en un tubo y se centrifugó, (Beckman Coulter) a 2,500 rpm por 10 min a una temperatura de 4°C. A partir de las alícuotas antes señaladas se llevo a cabo el análisis de actividad.

6.2.2 Análisis preliminar de la actividad enzimática

Se realizó un ensayo preliminar para observar la producción de proteasas en las cepas seleccionadas. Para ello se utilizó agar-gelatina en tubos de ensaye con tapón de rosca. Los tubos se inocularon con las cepas, dejando un tubo sin inocular como control y se incubaron a temperatura ambiente, por 7 días. Después fueron colocados en refrigeración por 10 min para determinar la licuefacción del medio.

6.2.3 Análisis con sustratos de la actividad enzimática

Para medir la actividad de las proteasas Pr1 y Pr2 se utilizaron los siguientes sustratos succinyl-(alanina) 2-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilida y benzoilfenilalanina-valina-arginina-*p*-nitroanilida respectivamente. Para el análisis se utilizaron 0.05 ml de sustrato (1 mmol), 0.85 ml de buffer Tris HCl 15 mmol pH 8.5 y 0.1 ml de enzima cruda. La mezcla se incubó a 28°C por 1 h y la reacción se detuvo agregando 0.25 ml de ácido acético al 30% y se colocó en hielo por 15 min, posteriormente las muestras se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a una celda de cuarzo de 1 ml para medir la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro GBC (Cintra 10e, Australia). Con los datos de absorbancia se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas utilizando la Prueba de Tukey a un nivel de significancia del 0.05.

6.3 Bioensayos de patogenicidad

6.3.1 Obtención de conidias

Para la obtención de conidias se tomó 1 ml de micelio de 48 h cultivado en CDS enriquecido con extracto de levadura al 1% y se colocó en una caja de Petri. A cada caja se agregaron aproximadamente 20 ml de PDA conteniendo extracto de levadura al 1%, con 25 µg/µl de estreptomycin, en total se utilizaron 20 cajas para cada cepa. Después de solidificar el medio en las cajas se sellaron con papel Parafilm® y se incubaron a 24°C hasta su esporulación (21 días aproximadamente). Posteriormente a las cajas se les agregó 1ml de Tween 80 al 0.05 % (estéril) y con una espátula se raspó la superficie del medio cuidando de no desprenderlo y el raspado de cada caja se concentró en un recipiente de plástico con tapa de rosca. De la suspensión de conidias se tomó una alícuota para hacer diluciones y determinar la concentración en la cámara de Neubauer.

6.3.2 Colecta de insectos

6.3.3 Mosca pinta (*Prosapia* sp)

Para la colecta de mosca pinta (*Prosapia* sp.) se realizó un monitoreo en algunas malezas que rodeaban los cultivos de sorgo, en el km 50 a orilla de la carretera Reynosa-San Fernando en el estado de Tamaulipas. Los adultos de mosca pinta se colectaron con una red de golpeo y fueron trasladados en cajas de plástico transparentes (56X26X38 cm) hasta el laboratorio. Por otra parte se colectaron gramíneas del lugar donde habitaban estos insectos, estas plantas fueron extraídas con la ayuda de una pala de jardín para obtenerlas con la raíz, posteriormente fueron colocadas en recipientes de

poliestireno expandido de 500 ml. La raíz se cubrió con suelo y se agregó agua hasta su hidratación completa.

En el laboratorio se separaron los insectos en 6 lotes de 10 individuos cada uno para probar cada una de las cepas y el control. Para pasar los insectos a lotes se utilizó un pincel de pelos de camello. Cada lote de insectos se sumergió en 1 ml de la suspensión de conidias a una concentración de 10^9 conidias/ml durante 20s, después estos insectos fueron colocados en jaulas de madera (30X30X30 cm) con paredes de tela mosquitera en cuyo interior se colocó un recipiente con una planta de la familia Poaceae (no identificada), extraída del hábitat donde se colectaron los insectos. Al final el bioensayo (7 días), los insectos muertos se tomaron con unas pinzas de disección y se colocaron en cámaras húmedas consistentes en una cajas petri con el fondo cubierto de papel filtro humedecido con 800 μ l de agua estéril miliQ. Las cámaras húmedas se incubaron a 25°C por 7 días hasta observar la emergencia de las conidias o micosis.

6.3.4 Larvas de *Spodoptera exigua*

Para este bioensayo, las larvas de *S.exigua* fueron proporcionadas por el área de cría de insectos del Laboratorio de Biotecnología Ambiental, CBG-IPN. Se preparó una dieta artificial (Rosas-García y Villegas-Mendoza, 2008) de la cual se vertieron 5 ml en vasos de plástico del número cero (Solo® P100,EE.UU.), con tapa y se dejó solidificar. De cada cepa se agregaron 100 μ l de una suspensión 3×10^8 conidias/ml en cada vaso sobre la superficie de la dieta y se dejaron secar durante 1 h. Posteriormente con un pincel ultra fino, redondo, de pelo de camello, se colocó una larva de 1^{er} instar. Por cada cepa se utilizaron 3 lotes de 25 insectos (1 larva por vaso) y un control igual de 3 lotes de 25 insectos.

Todos los bioensayos se incubaron a temperatura ambiente y la mortalidad se registró diariamente. Se registró el número de larvas vivas, muertas y perdidas y se determinó el porcentaje de mortalidad causado por cada cepa. Sólo para los bioensayos

de *S. exigua* se registró la mortalidad a partir del 3^{er} día de allí diariamente hasta el 8^o día, se dejó correr el ensayo por otros 10 días y se registraron las larvas que llegaron a pupar.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de DNA

Las concentraciones obtenidas del DNA fluctuaron en un rango de 8 a 40 ng/ μ l, sin embargo la cantidad recuperada fue suficiente para realizar las reacciones de PCR, obteniendo productos con una buena calidad. En la Fig. 1 se muestra el DNA extraído de las muestras utilizadas así como la concentración de cada una de ellas.

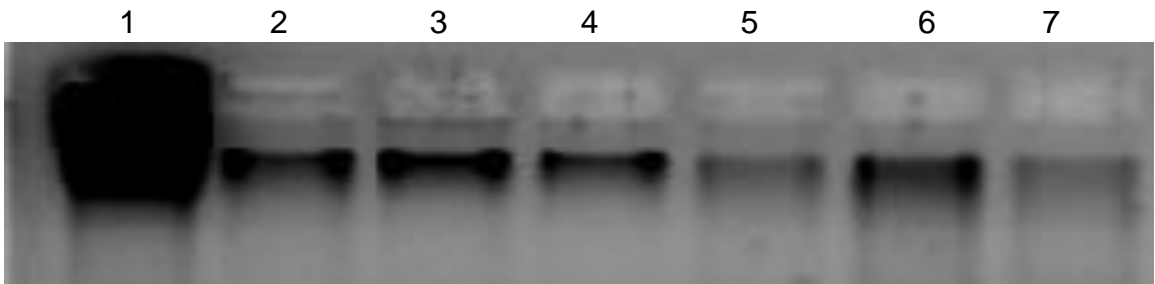


Figura 1.- Extracción y cuantificación de DNA de *Metarhizium anisopliae*. Carril 1, marcador λ 500ng, carriles 2-5, cepas de *M. anisopliae* 798 (34ng/ μ l), 6345 (40ng/ μ l), 6347 (22ng/ μ l), 6342 (10ng/ μ l), carril 6, *Beauveria bassiana* 3019 (31ng/ μ l) y carril 7, *Fusarium* sp 3345 (8ng/ μ l).

7.1.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se diseñaron para detectar los genes que pertenecen al tipo de las subtilisinas *pr1* (A, B, C, D, E, G, H, I y J) y para el tipo de las tripsinas *pr2*, se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5.- Oligonucleótidos diseñados para detectar diferentes genes del tipo de las subtilisinas y del tipo de las tripsinas en las cepas de *M. anisopliae*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño esperado pb.
<i>pr1A</i>	SubPr1F SubPr1R	5'TGTCTGCCCTTCTCACTCTTCTCC3' 5'AGCCAATCGCCGTCTCTTCACTG3'	1,421
PRO	PRO1F PRO1R	5'TGTTGGTTTGGCAGGCTATG3' 5'CGGGAATCGACGCTCAAT3'	588
PRO	PRO2F PRO2R	5'TCGCCGACAGAGCCACTTC3' 5'CAGCGGGTCAGCAACAAACAC3'	732
<i>pr1B</i>	Pr1BF Pr1BR	5'AGCGCCGGCGAAGGAACA3' 5'CGCCGCCACCGAGACAAAC3'	444
<i>pr1C</i>	PR1CF PR1CR	5'CACGCCCAGTCTCAGCAAGTAT3' 5'CTCAGAGCGCCGCCAGTAATG3'	321
<i>pr1D</i>	PR1DF PR1DR	5'CAAATATCCGCGCCTCCAATGT3' 5'ACGCCCGTCCCTCAAACCTCC 3'	508
<i>pr1E</i>	PR1EF PR1ER	5'TACCCTCGCGCCTCTTGAAC3' 5'TCGGAATATCGGTGTCGGTAAT3'	563
<i>Pr1F</i>	PR1FF PR1FR	5'TGCTACCGGGGAGGATGACT3' 5'CTGGGGCAAAAATGGTGACA3'	446
<i>pr1G</i>	PR1GF PR1GR	5'GCCGGCACCGCTGATTATTC3' 5'GGGGGTGCTTACGGGATGTG3'	472
<i>pr1H</i>	PR1HF PR1HR	5'GCTGGAGATGCCGATGAGGATG3' 5'CCGCGGCAGCAGGAGAGTAG3'	376
<i>pr1I</i>	PR1IF PR1IR	5'CTTGGGGTCTGTCTCGCATTTTC3' 5'CTTGGGGCAGCCTCGTGTT3'	435
<i>pr1J</i>	PR1JF PR1JR	5'GACGCAGGCAGCACCAATGA3' 5'CGGCCAGCCCAGCAACA3'	409
<i>pr1K</i>	PR1KF PR1KR	5'TCCCGGCTCCAGTCCTTGTT3' 5'CTCGCCAGCGCTATCATCGTA3'	402
<i>pr2</i>	TrypPr21F Trypr2 2R	5'ACACCTGCCGTTTTAAGCCGACTA3' 5'AACAAGACACCGCCGCACCAATG3'	419
<i>pr2</i>	TrypPr21F TryPr2 3R	5'ACACCTGCCGTTTTAAGCCGACTA3' 5'CTTATAACCCCATGACACAACCTCC3'	1086
<i>pr2</i>	TryPAR2F TRYPAR2R	5'CGGCTCGCATACCCTACG3' 5'CAGCAGCAAAATCTCCTACTCAA3'	439

7.1.3 Estandarización de la PCR para identificar a los genes *pr1* y *pr2*

Los Cuadros 1 y 2 se muestran las condiciones óptimas para el desarrollo de las PCR para amplificar los fragmentos de los genes *pr1* (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K) y *pr2*.

Cuadro 1.- Concentración óptima de los reactivos para las reacciones de PCR para amplificar fragmentos de los genes *pr1* y *pr2*.

Reactivo	Concentración óptima
DNA	
Buffer Go Taq.	1X
dNTP'S	0.2mM
Oligonucleótidos F y R	0.2mM
Go Taq polimerasa	1.25 U
H ₂ O mili Q	-
Volumen total	25 µl

Cuadro 2.- Programa de temperaturas y ciclos empleados en el termociclador PCR. System 9700 ® para la amplificación de fragmentos de los genes *pr1* y *pr2*.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C	2 min	1
94°C	45 s	
60/55°C	1 min	30
72°C	1 min	
72°C	7 min	1
4°C	30 s	1

7.1.4 Identificación de los genes *pr1* por PCR

En las cepas 798, 6345 y 6347 se logró identificar la presencia de los genes *pr1* (A, B, C, E, F, G, J y K). Las cepas 3345 y 3019 correspondientes a *Fusarium* sp. y *B. bassiana* fueron utilizadas como controles (Figs. 2-9).

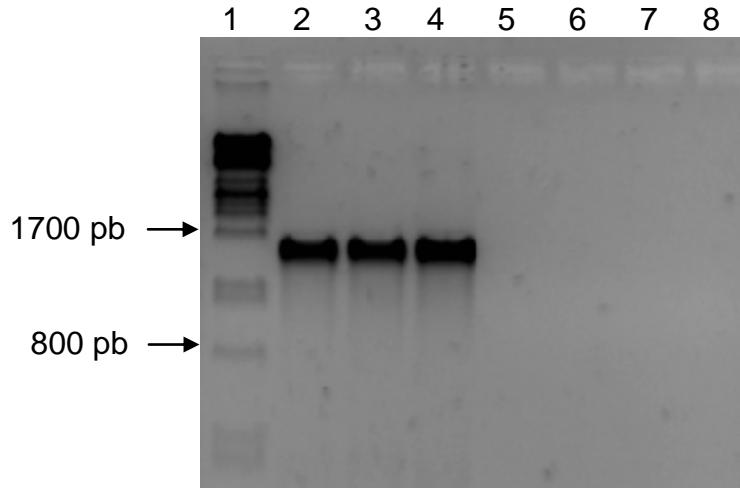


Figura 2.- Amplificación de un fragmento del gen *pr1A* con un tamaño aproximado de 1421 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; Carril 1, λ PstI, carriles 2-5, cepas de *M. anisopliae* 798, 6347, 6345, 6342; carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

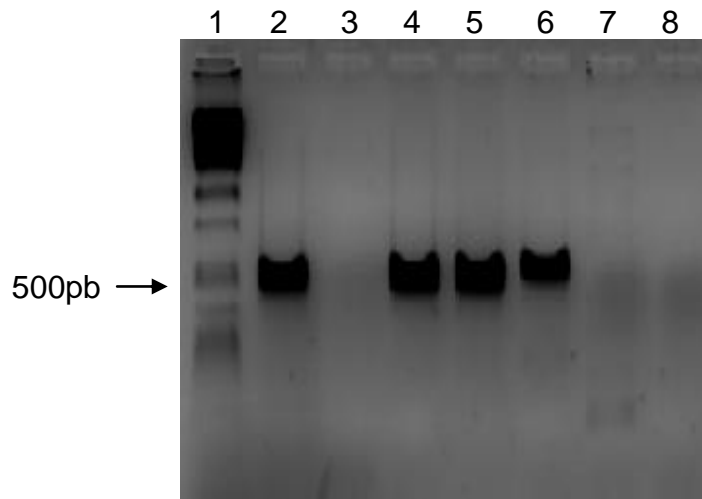


Figura 3.- Amplificación de un fragmento correspondiente al gen *pr1B* con un tamaño aproximado 490 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

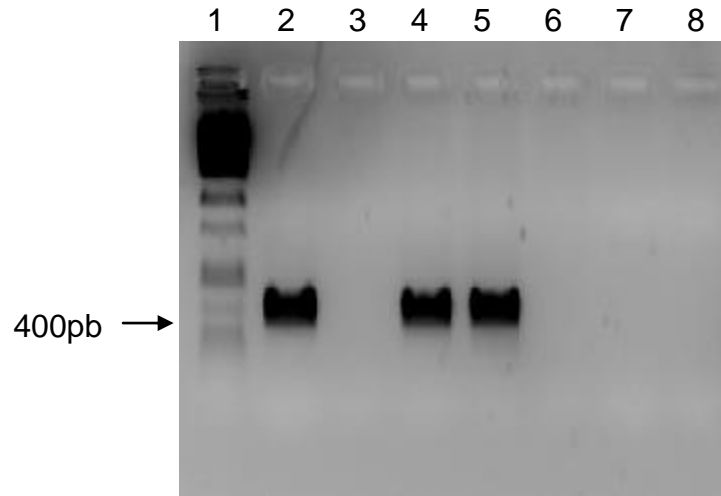


Figura 4.- Amplificación de un fragmento del gen *prIC* con un tamaño aproximado 400 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

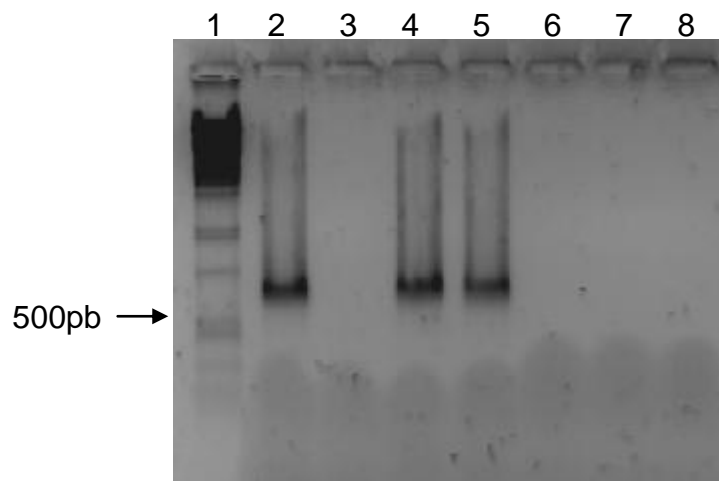


Figura 5.- Amplificación de un fragmento del gen *prIE* con un tamaño aproximado 570 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

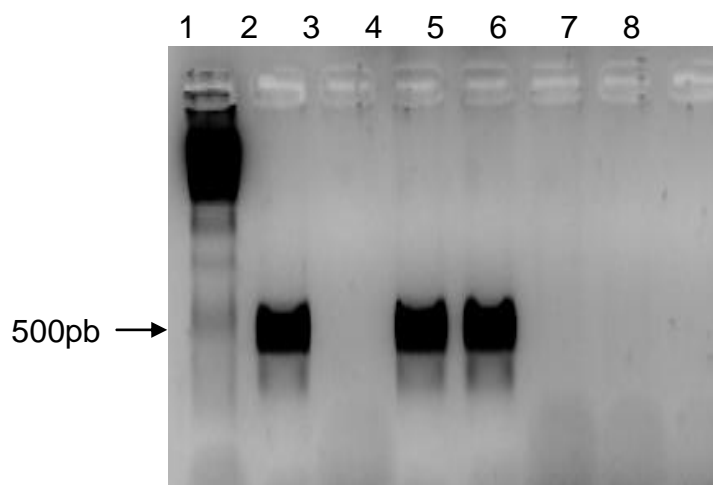


Figura 6.- Amplificación de un fragmento del gen *prIF* con un tamaño aproximado 400 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

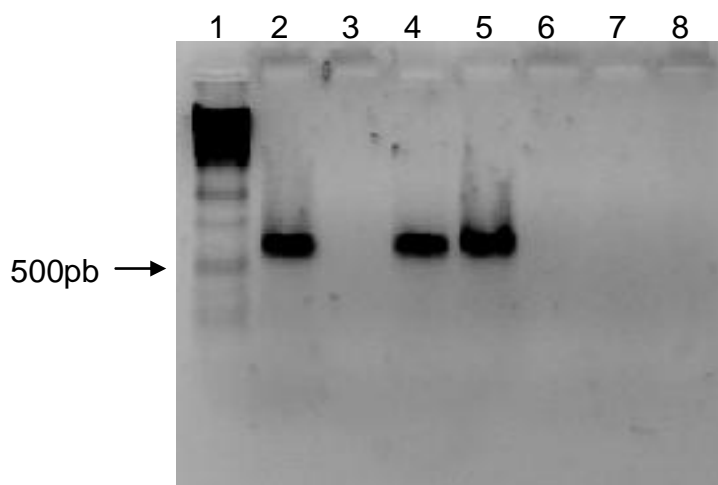


Figura 7.- Amplificación de un fragmento del gen *prIG* con un tamaño aproximado 550 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; Carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

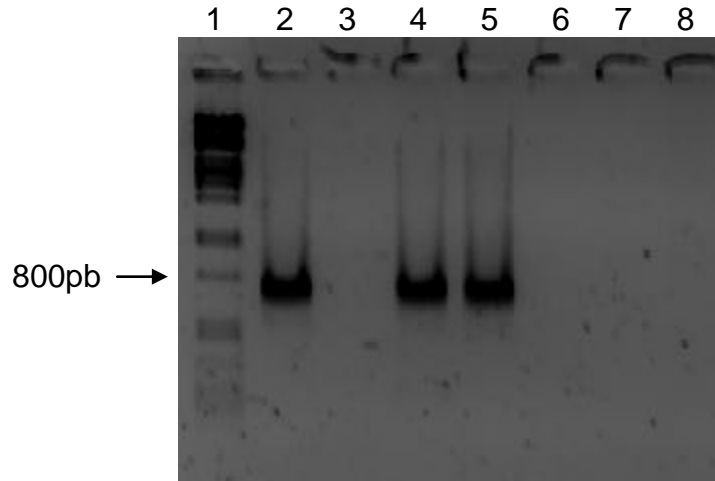


Figura 8.- Amplificación de un fragmento del gen *prIJ* con un tamaño aproximado 600 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

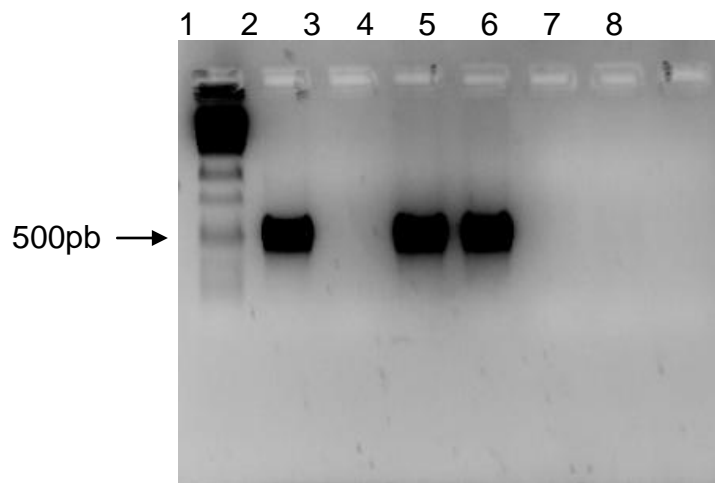


Figura 9.- Amplificación de un fragmento del gen *prIK* con un tamaño aproximado 400 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

Con los oligos para PRO1F y PRO1R, PRO2F y PRO2R se logro amplificar una parte del promotor y otra parte de la secuencia del codón de iniciación del gen *pr1A*, en la Fig.13. donde muestra la amplificación del posible promotor, en dos partes y después de realizó el ensamble (Fig. 10).

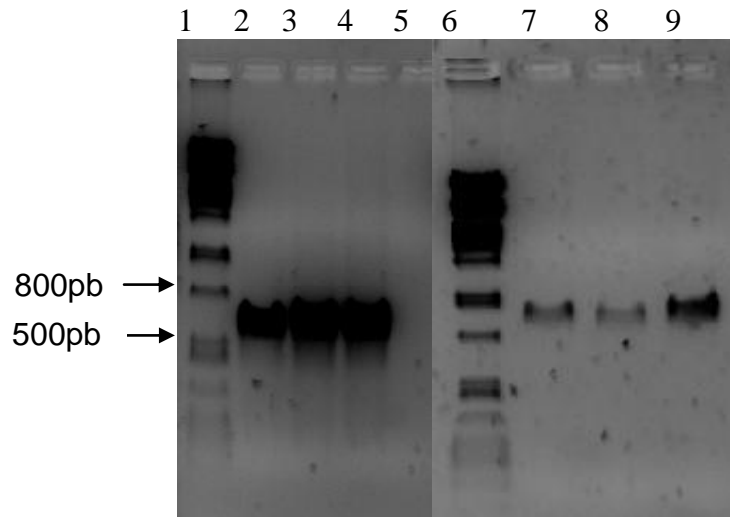


Figura 10.- Amplificación de la parte del promotor con un tamaño aproximado 1332 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1 y 6.- λ PstI, carril 2-4.- muestras de *M. anisopliae* 798, 6345 y 6347, utilizando los oligonucleótidos PRO1F y PRO1R dando un fragmento de 572 pb; carril 7-9 muestras de *M. anisopliae* 798, 6345 y 6347 utilizando los oligonucleótidos PRO2F y PRO2R dando un fragmento de 900 pb.

7.1.5 Amplificación del gen *pr2*

Para detectar el gen *pr2* se utilizaron los 2 pares de oligonucleótidos, primer par TryPR21F y TryPR22R, segundo par TryPr21F y TryPr23R, obteniendo fragmentos de aproximadamente 419 pb para el primer juego de oligonucleótidos en las cepas 798, 6345 y 6347, mientras que para las cepas 6342, 3019 amplificó bandas muy débiles de aproximadamente 1700 pb y para la cepa 3345 una banda de 1600 pb. El segundo juego

de oligonucleótidos sólo amplificó una banda muy fuerte de 1080 pb en las cepas 798, 6345 y 6347 (Fig. 11).

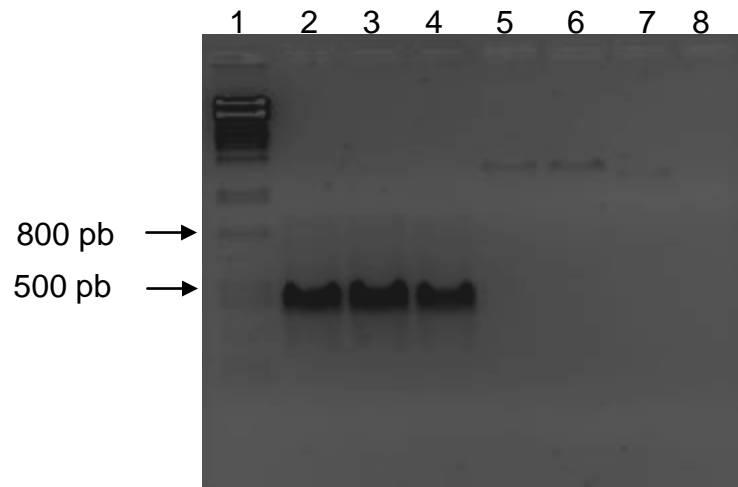


Figura 11.- Amplificación de un fragmento del gen *pr2* con un tamaño aproximado 419 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6342, 6345, 6347, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

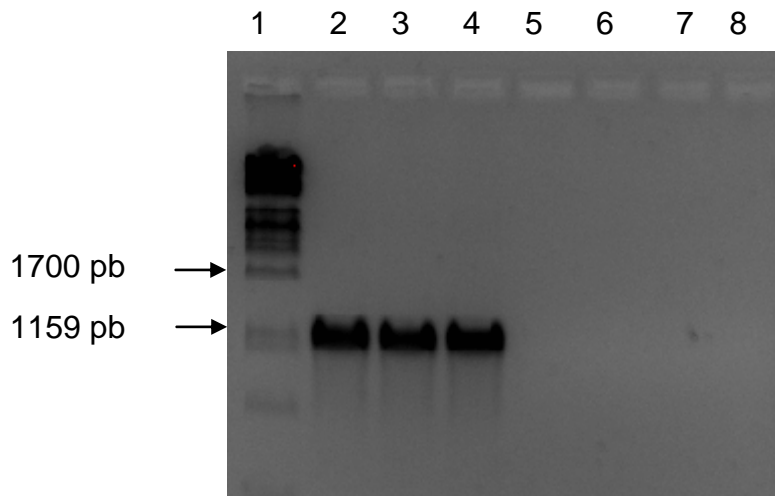


Figura 12.- Amplificación de un fragmento del gen *pr2* con un tamaño aproximado a 1086 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%; carril 1.- λ PstI, carril 2-5, muestras de *M. anisopliae* 798, 6345, 6347, 6342, carriles 6-7, controles negativos *Fusarium* sp 3345, *B. bassiana* 3019, y carril 8, control (agua).

7.2 Análisis de las secuencias de los genes *pr1* y *pr2*

7.2.1 *pr1*

Los genes detectados fueron *pr1A*, *pr1B*, *pr1C*, *pr1E*, *pr1F*, *pr1G*, *pr1J* y *pr1K* sólo en las cepas 798, 6345 y 6347, las secuencias de los genes se encuentran en el Anexo 1, de lo contrario en la cepa 6342 no se detectó ningún gen de los antes mencionados.

El análisis de las secuencias del gen *pr1A* de las cepas 798 y 6345 permitió obtener una parte del promotor y los codones de iniciación y de terminación, el codón de terminación no se determinó en la cepa 6347 debido a que no se logró secuenciar el fragmento de 61 pb. Sin embargo el análisis permitió determinar los porcentajes de similitud para el gen *pr1A* entre las cepas 798, 6345 y 6347 que correspondieron del 94 al 99% de similitud entre ellas; la cepa 6345 con la 798 comparten un 99% de identidad, las cepa 6345 y 6347 comparten un 95% de identidad, mientras que las cepas 6347 y 798 un 94%. Cuando se realizó el alineamiento con la base de datos del NCBI las secuencias de los genes *pr1A* presentaron porcentajes de identidad del 99%, con las secuencias *M. anisopliae* cepa ARSEF 794 (GQ226044.1), *M. anisopliae* cepa CG31 (FJ659188.1) y *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ416688.1) entre otros (Fig. 13).

	*	20	*	40	*	60	*	80	
798pr1A.1	:	-----	-----	-----	-----	ATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTC	:	30	
6347pr1A.3	:	-----	-----	-----	-----	ATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTC	:	30	
6345pr1A.2	:	-----	-----	-----	-----	ATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTC	:	30	
FJ659188.1	:	-----	-----	-----	-----	ATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTC	:	30	
GQ226044.1	:	-----	-----	-----	-----	-----GCCCTTTTCTCACTCTTCTC	:	20	
AJ416688.1	:	CGGTTCTGCCACACCTCTGGTCTTTGGTCCCGTACTAGAATTGCAATCATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTC	:	80					
		CGGTTCTGCCACACCTCTGGTCTTTGGTCCCGTACTAGAATTGCAATCATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTC							
	*	100	*	120	*	140	*	160	
798pr1A.1	:	CCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTATTGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTCTTCACTCCTCATGCTGAGAGCAT	:	110					
6347pr1A.3	:	CCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTATTGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCAT	:	110					
6345pr1A.2	:	CCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTATTGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCAT	:	110					
FJ659188.1	:	CCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTATTGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCAT	:	110					
GQ226044.1	:	CCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTATTGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCAT	:	100					
AJ416688.1	:	CCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTATTGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCAT	:	160					
		CCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTATTGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCAT							

	*	180	*	200	*	220	*	240		
798pr1A.1	:	CATTGCCGACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTGAGCGCTCTTACCT							:	190
6347pr1A.3	:	CATTGCCGACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTGAGCGCTCTTACCT							:	190
6345pr1A.2	:	CATTGCCGACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTGAGCGCTCTTACCT							:	190
FJ659188.1	:	CATTGCCGACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTGAGCGCTCTTACCT							:	190
Q226044.1	:	CATTGCCGACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTGAGCGCTCTTACCT							:	180
AJ416688.1	:	CATTGCCGACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTGAGCGCTCTTACCT							:	240
		CATTGCCGACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTGAGCGCTCTTACCT								

	*	260	*	280	*	300	*	320		
798pr1A.1	:	CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCGCTTCCATGGGTTGCGAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGT							:	270
6347pr1A.3	:	CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCGCTTCCATGGGTTGCGAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGT							:	270
6345pr1A.2	:	CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCGCTTCCATGGGTTGCGAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGT							:	270
FJ659188.1	:	CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCGCTTCCATGGGTTGCGAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGT							:	270
Q226044.1	:	CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCGCTTCCATGGGTTGCGAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGT							:	260
AJ416688.1	:	CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCGCTTCCATGGGTTGCGAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGT							:	320
		CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCGCTTCCATGGGTTGCGAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGT								

	*	340	*	360	*	380	*	400		
798pr1A.1	:	GAGCACCOCGGTGAAGCACCOCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTG-ACCCCT							:	349
6347pr1A.3	:	GAGCACCOCGGTGAAGCACCOCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTG-ACCCCT							:	350
6345pr1A.2	:	GAGCACCOCGGTGAAGCACCOCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTG-ACCCCT							:	349
FJ659188.1	:	GAGCACCOCGGTGAAGCACCOCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTG-ACCCCT							:	349
Q226044.1	:	GAGCACCOCGGTGAAGCACCOCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTG-ACCCCT							:	339
AJ416688.1	:	GAGCACCOCGGTGAAGCACCOCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTG-ACCCCT							:	399
		GAGCACCOCGGTGAAGCACCOCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTGACCCCT								

	*	420	*	440	*	460	*	480		
798pr1A.1	:	GCGCCATAGGTTGATTTTCATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGG							:	429
6347pr1A.3	:	GCGCCATAGGTTGATTTTCATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGG							:	430
6345pr1A.2	:	GCGCCATAGGTTGATTTTCATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGG							:	429
FJ659188.1	:	GCGCCATAGGTTGATTTTCATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGG							:	429
Q226044.1	:	ACGCCATAGGTTGATTTTCATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGG							:	419
AJ416688.1	:	GCGCCATAGGTTGATTTTCATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGG							:	479
		GCGCCATAGGTTGATTTTCATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGG								

	*	500	*	520	*	540	*	560		
798pr1A.1	:	TCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACCTATCGTACGATGATAGTGTGGTGAGGGTACTTGCCTAT							:	509
6347pr1A.3	:	TCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACCTATCGTACGATGATAGTGTGGTGAGGGTACTTGCCTAT							:	510
6345pr1A.2	:	TCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACCTATCGTACGATGATAGTGTGGTGAGGGTACTTGCCTAT							:	509
FJ659188.1	:	TCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACCTATCGTACGATGATAGTGTGGTGAGGGTACTTGCCTAT							:	509
Q226044.1	:	TCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACCTATCGTACGATGATAGTGTGGTGAGGGTACTTGCCTAT							:	499
AJ416688.1	:	TCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACCTATCGTACGATGATAGTGTGGTGAGGGTACTTGCCTAT							:	559
		TCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACCTATCGTACGATGATAGTGTGGTGAGGGTACTTGCCTAT								

	*	580	*	600	*	620	*	640		
798pr1A.1	:	ATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA							:	589
6347pr1A.3	:	ATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA							:	590
6345pr1A.2	:	ATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA							:	589
FJ659188.1	:	ATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA							:	589
Q226044.1	:	ATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA							:	579
AJ416688.1	:	ATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA							:	639
		ATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA								

	*	660	*	680	*	700	*	720		
798pr1A.1	:	ACAATATCATCCAGGAGTTTGGGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTCAAGAAACTGATGGCCACGGC							:	669
6347pr1A.3	:	ACAATATCATCCAGGAGTTTGGGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTCAAGAAACTGATGGCCACGGC							:	670
6345pr1A.2	:	ACAATATCATCCAGGAGTTTGGGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTCAAGAAACTGATGGCCACGGC							:	669
FJ659188.1	:	ACAATATCATCCAGGAGTTTGGGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTCAAGAAACTGATGGCCACGGC							:	669
Q226044.1	:	ACAATATCATCCAGGAGTTTGGGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTCAAGAAACTGATGGCCACGGC							:	659
AJ416688.1	:	ACAATATCATCCAGGAGTTTGGGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTCAAGAAACTGATGGCCACGGC							:	719
		ACAATATCATCCAGGAGTTTGGGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTCAAGAAACTGATGGCCACGGC								

	*	740	*	760	*	780	*	800		
798pr1A.1	:	CATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGT							:	749
6347pr1A.3	:	CATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGT							:	750
6345pr1A.2	:	CATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGT							:	749
FJ659188.1	:	CATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGT							:	749
Q226044.1	:	CATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGT							:	739
AJ416688.1	:	CATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGT							:	799
		CATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGT								

	*	820	*	840	*	860	*	880		
798pr1A.1	:	TCTTGACAACCAGGGCAGTGGTTCCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTACTCCAAGACCCGG							:	829
6347pr1A.3	:	TCTTGACAACCAGGGCAGTGGTTCCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTACTCCAAGACCCGG							:	830
6345pr1A.2	:	TCTTGACAACCAGGGCAGTGGTTCCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTACTCCAAGACCCGG							:	829
FJ659188.1	:	TCTTGACAACCAGGGCAGTGGTTCCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTACTCCAAGACCCGG							:	829
Q226044.1	:	TCTTGACAACCAGGGCAGTGGTTCCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTACTCCAAGACCCGG							:	819
AJ416688.1	:	TCTTGACAACCAGGGCAGTGGTTCCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTACTCCAAGACCCGG							:	879
		TCTTGACAACCAGGGCAGTGGTTCCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTACTCCAAGACCCGG								

	*	900	*	920	*	940	*	960		
798pr1A.1	:	GCTGCCCAAAAGGGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGCGTCCGTCACCAAGGTTGCTGTGCTTTG							:	909
6347pr1A.3	:	GCTGCCCAAAAGGGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGCGTCCGTCACCAAGGTTGCTGTGCTTTG							:	910
6345pr1A.2	:	GCTGCCCAAAAGGGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGCGTCCGTCACCAAGGTTGCTGTGCTTTG							:	909
FJ659188.1	:	GCTGCCCAAAAGGGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGCGTCCGTCACCAAGGTTGCTGTGCTTTG							:	909
Q226044.1	:	GCTGCCCAAAAGGGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGCGTCCGTCACCAAGGTTGCTGTGCTTTG							:	899
AJ416688.1	:	GCTGCCCAAAAGGGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGCGTCCGTCACCAAGGTTGCTGTGCTTTG							:	959
		GCTGCCCAAAAGGGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGCGTCCGTCACCAAGGTTGCTGTGCTTTG								

```

798pr1A.1 : GTGAATTGGGTGCTTCCTTGCCTGCGCGTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTCCGAGCC : 989
6347pr1A.3 : GTGAATTGGGTGCTTCCTTGCCTGCGCGTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTCCGAGCC : 990
6345pr1A.2 : GTGAATTGGGTGCTTCCTTGCCTGCGCGTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTCCGAGCC : 989
FJ659188.1 : GTGAATTGGGTGCTTCCTTGCCTGCGCGTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTCCGAGCC : 989
GQ226044.1 : GTGAATTGGGTGCTTCCTTGCCTGCGCGTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTCCGAGCC : 979
AJ416688.1 : GTCAATTCTGGTGTCTTCCTTGCCTGCGCGTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTCCGAGCC : 1039
GTGAATTGGGTGCTTCCTTGCCTGCGCGTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTCCGAGCC

*          980          *          1000          *          1020          *          1040

798pr1A.1 : TTTCGCCTGCACCTGTTGGTGCCACTGATTCAAAGTGACAGACGATCTTCCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTCGATATTT : 1069
6347pr1A.3 : TTTCGCCTGCACCTGTTGGTGCCACTGATTCAAAGTGACAGACGATCTTCCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTCGATATTT : 1070
6345pr1A.2 : TTTCGCCTGCACCTGTTGGTGCCACTGATTCAAAGTGACAGACGATCTTCCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTCGATATTT : 1069
FJ659188.1 : TTTCGCCTGCACCTGTTGGTGCCACTGATTCAAAGTGACAGACGATCTTCCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTCGATATTT : 1069
GQ226044.1 : TTTCGCCTGCACCTGTTGGTGCCACTGATTCAAAGTGACAGACGATCTTCCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTCGATATTT : 1059
AJ416688.1 : TTTCGCCTGCACCTGTTGGTGCCACTGATTCAAATGACAACCGATCTTCCTTCTCCAACCTACGGCAAACTGTCGATATTT : 1119
TTTCGCCTGCACCTGTTGGTGCCACTGATTCAAAGTGACAGACGATCTTCCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTCGATATTT

*          1060          *          1080          *          1100          *          1120

798pr1A.1 : TCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAG : 1149
6347pr1A.3 : TCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAG : 1150
6345pr1A.2 : TCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAG : 1149
FJ659188.1 : TCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAG : 1149
GQ226044.1 : TCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAG : 1139
AJ416688.1 : TCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAG : 1199
TCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAG

*          1140          *          1160          *          1180          *          1200

798pr1A.1 : ACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCTAACAAAGTTTAGAACCACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCATATTGC : 1229
6347pr1A.3 : ACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCTAACAAAGTTTAGAACCACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCATATTGC : 1230
6345pr1A.2 : ACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCTAACAAAGTTTAGAACCACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCATATTGC : 1229
FJ659188.1 : ACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCAA--AAGTTTAGAACCACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCATATTGC : 1227
GQ226044.1 : ACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCTAACAAAGTTTAGAACCACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCATATTGC : 1219
AJ416688.1 : ACACGCTTTTGCTTCAGCACCAGCTCTAACAAAGTTTAGAACCACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCATATTGC : 1279
ACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCTAACAAAGTTTAGAACCACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCATATTGC

*          1220          *          1240          *          1260          *          1280

798pr1A.1 : CGGTCTGGTGCCTACCTCAGTGGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCAGGACACTGCTA : 1309
6347pr1A.3 : CGGTCTGGTGCCTACCTCAGTGGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCAGGACACTGCTA : 1310
6345pr1A.2 : CGGTCTGGTGCCTACCTCAGTGGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCAGGACACTGCTA : 1309
FJ659188.1 : CGGTCTGGTGCCTACCTCAGTGGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCAGGACACTGCTA : 1307
GQ226044.1 : CGGTCTGGTGCCTACCTCAGTGGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCAGGACACTGCTA : 1299
AJ416688.1 : CGGCTGGTGCCTACCTCAGTGGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCAGGACACTGCTA : 1359
CGGTCTGGTGCCTACCTCAGTGGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCAGGACACTGCTA

*          1300          *          1320          *          1340          *          1360

798pr1A.1 : CCAAGAACGCGCTCTCCAGTGTCCCTCTGGCACTGTCAACTACCTTGCTTACAACGGCAACGGTGCCTAAATCTTAAC : 1389
6347pr1A.3 : CCAAGAACGCGC----- : 1320
6345pr1A.2 : CCAAGAACGCGCTCTCC--GTGTTCCCTCTGGCACTGTCAACTACCTTGCTTACAACGGCAACGGTGCCTAAATCTAAAC-- : 1387
FJ659188.1 : CCAAGAACGCGCTCACCGGTGTTCCCTCTGGCACTGTCAACTACCTTGCTTACAACGGCAACGGTGCCTAA----- : 1378
GQ226044.1 : CCAAGAACGCGCTCACCGGTGTTCCCGCTGGCACTGTCAAC----- : 1340
AJ416688.1 : CCAAGAACGCGCTCAACGGTGTCCCTCTGGCACTGTCAACTACCTTGCTTACAACGGCAACGGTGCCTAAATCTTAAC : 1439
CCAAGAACGCGCTCACCGGTGTTCCCTCTGGCACTGTCAACTACCTTGCTTACAACGGCAACGGTGCCTAAATCTTAAC

*          1380          *          1400          *          1420          *          1440

798pr1A.1 : GAGCTGGT----- : 1398
6347pr1A.3 : ----- : -
6345pr1A.2 : ----- : -
FJ659188.1 : ----- : -
GQ226044.1 : ----- : -
AJ416688.1 : TTGAGCAGGGGGGAACCTTCAGTGAAGAGACGGCGATTGGTTGGTTGTATATTGAGACGATTTCACACGCTCGAATC : 1519
GAGAGCAGGGGGGAACCTTCAGTGAAGAGACGGCGATTGGTTGGTTGTATATTGAGACGATTTCACACGCTCGAATC

*          1460          *          1480          *          1500          *          1520

798pr1A.1 : ----- : -
6347pr1A.3 : ----- : -
6345pr1A.2 : ----- : -
FJ659188.1 : ----- : -
GQ226044.1 : ----- : -
AJ416688.1 : ----- : -

*          1540          *          1560          *          1580

798pr1A.1 : ----- : -
6347pr1A.3 : ----- : -
6345pr1A.2 : ----- : -
FJ659188.1 : ----- : -
GQ226044.1 : ----- : -
AJ416688.1 : CCCCCAAAGGTATATATTTATATTTCTATATTTCTTGACCAAGTACATTATGATGATGGA : 1581
CCCCCAAAGGTATATATTTATATTTCTATATTTCTTGACCAAGTACATTATGATGATGGA

```

Figura 13.- Alineamiento de la secuencia del gen *pr1A* de las cepas (798, 634 y 6347) de *M. anisopliae* con secuencias previamente reportadas en el NCBI correspondientes al gen *pr1A* de cepas de *M. anisopliae*. Los codones de iniciación y de terminación están señalados con un rectángulo rojo. Las secuencias conservadas se indican en color negro y en gris algunas variantes.

El fragmento secuenciado del gen *prIB* de las cepas 798, 6345 y 6347 muestran porcentajes de identidad entre ellas del 96% para las cepas 6347 y 798, un 98% para 6345, 798 y 6347, con las cepas reportadas en el NCBI muestran porcentajes de identidad del 100% con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ416690.1) y 97% *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ289823.1).

Los fragmentos secuenciados del gen *prIC* muestran porcentajes de identidad del 99% para las cepas 798 y 6345 y un 97% para las cepas 798, 6345 y 6347. Al hacer los alineamientos con las secuencias disponibles del NCBI se obtuvo un 97% con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ419628.1).

La secuencia del fragmento del gen *prIE* muestra porcentajes de identidad del 98% para las cepas 798 y 6347, 96% para las cepas 6345 y 798, y un 96%, para las cepas 6345 y 6347. Con las secuencias disponibles del NCBI se obtuvo un 96% de identidad con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ547864.1) y 96% de identidad con la cepa *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ251967.1).

El fragmento del gen *prIF* presenta porcentajes del 98% para las cepas 798, 6345 y 6347, un 97% para las cepas 798 y 6347. Con las secuencias del reportadas en el NCBI comparten un 96% con las cepas de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ547864.1 y AJ251967.1) y un 95% con la cepa de *M. anisopliae* var. *acridium* (AJ431637.1).

Las secuencias del gen *prIG* presentan porcentajes de identidad entre ellas del 99% para las cepas 6345 y 6347, un 98% para las cepas 798, 6345 y 6347, los porcentajes de identidad para las secuencias del NCBI para este gen son del 99% con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ251964.1) y 98% con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ431639.1).

Los fragmentos correspondientes al gen *prIJ* de las cepas 798, 6345 y 6347 muestran un porcentaje del 100% de identidad entre ellas, al hacer un alineamiento con los de la base de datos del NCBI presentan un porcentaje del 97% con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ416687.1), 96% con la cepa de *M. anisopliae* var.

acridium (AJ416694.1) y un 98% con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ269535.1).

Los fragmentos secuenciados del gen *prIK* presentan porcentajes de identidad entre ellos del 100% para las cepas 6347 y 6345, un 97% para las cepas 798, 6345 y 6347, con respecto a los porcentajes de identidad con las secuencias del NCBI con la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AJ293220.1).

7.2.2 pr2

Las secuencias del gen de tripsina *pr2* obtenidas de las cepas de *M. anisopliae* 798, 6345 y 6347 presentan un porcentaje de similitud del 97% cuando se compararon con la secuencia de *M. anisopliae* (X78875.1) de la base de datos del NCBI. Con la cepa de *M. anisopliae* (X78875.1) que se tiene de referencia se determinaron el codon de iniciación situado en la posición 245 y el codón de terminación en la posición 1174, como se muestra en el siguiente alineamiento Fig. 14. Las secuencias se observan en el Anexo3.

798	:	-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----	CTTGTGTCGATCACCCTCCCGTGCAGA	:	26
6347	:	-----	GCGAGCTTGTGTCGATCACCCTCCCGTGCAGA	:	31
6345	:	-----	CGATCACCCTCCCGTGCAGA	:	21
X78875.1	:	CGCCGACTTGTTTACACCTGCCGTTTAAAGCCGACTAGGACGCTTTGCCACGGAGCTTGTGTCGATCACCCTGC-GTGCAGA	cttgtcGATCACCCTGCgTGCAGA	:	81
798	:	-----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----	CGAGCATGGCGTAGAGTATACGAGCTGGGAACGCTGTATAACGAAACGATTCGCATATAAAATACGACTAGTCTTCCAACAT	:	108
6347	:	-----	CGAGCATGGCGTAGAGTATACGAGCTGGGAACGCTGTATAACGAAACGATTCGCATATAAAATACGACTAGTCTTCCAACAT	:	113
6345	:	-----	CGAGCATGGCGTAGAGTATACGAGCTGGGAACGCTGTATAACGAAACGATTCGCATATAAAATACGACTAGTCTTCCAACAT	:	103
X78875.1	:	-----	CGAGCATGGCGTAGAGTATACGAGCTGGGAACGCTGTATAACGAAACGATTCGCATATAAAATACGACTAGTCTTCCAACAT	:	163
798	:	-----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----	GGGAGTTGACTTTTGTAACTCTAATAACAAGCTTCTTCATATATTCCTTGTCCCTTTGGATCATCGCCATTTCCATCACTACA	:	190
6347	:	-----	GGGAGTTGACTTTTGTAACTCTAATAACAAGCTTCTTCATATATTCCTTGTCCCTTTGGATCATCGCCATTTCCATCACTACA	:	195
6345	:	-----	GGGAGTTGACTTTTGTAACTCTAATAACAAGCTTCTTCATATATTCCTTGTCCCTTTGGATCATCGCCATTTCCATCACTACA	:	185
X78875.1	:	-----	GGAA-TTGACTTTGTAACTCTAATAACAACCTTCTTCATATATTCCTTGTCCCTTTGGATCATCGCCATTTCCATCACTACA	:	244
			GGgAgTTGACTTtTgTAACTCTAATAACAAGCTTCTTCATATATTCCTTGTCCCTTTGGATcATCGCCATTTCCATCACTACA		
798	:	-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----	ATGGAGCTCAAGTCCCTATTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGCTGCACGACCTGCATCAAATGCAG	:	272
6347	:	-----	ATGGAGCTCAAGTCCCTATTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGCTGCACGACCTGCATCAAATGCAG	:	277
6345	:	-----	ATGGAGCTCAAGTCCCTATTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGCTGCACGACCTGCATCAAATGCAG	:	267
X78875.1	:	-----	ATGGAGCTCAAGTCCCTACTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGCTGCACGCGCTGCATCAAATGCAG	:	326
			ATGGAGCTCAAGTCCCTATTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGCTGCACGaCCTGCATCAAATGCAG		
798	:	-----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400-----*	TGTTTATGTTGGCGGATCGCTGCTGAGGCCGGTGAATTCCTTCATCGTCAGCACGTTGCGTAACGGGCGCCATTGGTG	:	354
6347	:	-----	TGTTTATGTTGGCGGATCGCTGCTGAGGCCGGTGAATTCCTTCATCGTCAGCACGTTGCGTAACGGGCGCCATTGGTG	:	359
6345	:	-----	TGTTTATGTTGGCGGATCGCTGCTGAGGCCGGTGAATTCCTTCATCGTCAGCACGTTGCGTAACGGGCGCCATTGGTG	:	349
X78875.1	:	-----	TGTTTATGTTGGCGGATCGCTGCTGAGGCCGGTGAATTCCTTCATCGTCAGCACGTTGCTTAACGGGCGCCATTGGTG	:	408
			TGTTTATGTTGGCGGATCGCTGCTGAGGCCGGTGAATTCCTTCATCGTCAGCACGTTGcGTAACGGGCGCCATTGGTG		
798	:	-----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----*	CGCCGGTGTCTTGTGAACGCCAATACGGTCTCACCCGGCTCATTGCGTCGAGTCACAACCAGCCATCTCGCAGGTCGCC	:	436
6347	:	-----	CGCCGGTGTCTTGTGAACGCCAATACGGTCTCACCCGGCTCATTGCGTCGAGTCACAACCAGCCATCTCGCAGGTCGCC	:	441
6345	:	-----	CGCCGGTGTCTTGTGAACGCCAATACGGTCTCACCCGGCTCATTGCGTCGAGTCACAACCAGCCATCTCGCAGGTCGCC	:	431
X78875.1	:	-----	CGCCGGTGTCTTGTGAACGCCAATACGGTCTCACCCGGCTCATTGCGTCGAGTCACAACCAGCCATCTCGCAGGTCGCC	:	490
			CGCCGGTGTCTTGTGAACGCCAATACGGTCTCACCCGGCTCATTGCGTCGAGTCaCaACCAGCCATCTCGCAGGTCGCC		
798	:	-----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----*	GCCGGTCTCTCGTAAGTTGTGTTGCTTCTT---GTATCAATGGGAGGATTGCTGTCTTTTGACTTCCACTGCCACAAC	:	515
6347	:	-----	GCCGGTCTCTCGTAAGTTGTGTTGCTTCTT---GTATCAATGGGAGGATTGCTGTCTTTTGACTTCCACTGCCACAAC	:	520
6345	:	-----	GCCGGTCTCTCGTAAGTTGTGTTGCTTCTT---GTATCAATGGGAGGATTGCTGTCTTTTGACTTCCACTGCCACAAC	:	510
X78875.1	:	-----	GCCGGTCTCTCGTAAGTTATGTTGCTTCTTCTTGTATCAATGGGAGGATTGCTGTCTTTTGACTTCCACTGCCACAAC	:	572
			GCCGGTCTCTCGTAAGTTgTGTGCTTCTT GTATCAATGGGAGGATTGCTGTcCTTTTGaCTTCCAcTGCCACAAC		
798	:	-----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640-----*	TCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCCCATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAA	:	597
6347	:	-----	TCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCCCATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAA	:	602
6345	:	-----	TCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCCCATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAA	:	592
X78875.1	:	-----	CCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCCCATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAA	:	654
			tCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCCCATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAA		
798	:	-----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----*	TACGAAGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCACCATCGGCTACGCCACAT	:	679
6347	:	-----	TACGAAGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCACCATCGGCTACGCCACAT	:	684
6345	:	-----	TACGAAGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCACCATCGGCTACGCCACAT	:	674
X78875.1	:	-----	TATGAAGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCACCATCG--TACGCCACAT	:	734
			TAcGAAGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCACCATCGgcTACGCCACAT		

```

40      *      760      *      780      *      800      *      820
798    : TGCCAGAGGGGGCTCAGACCCTGTGGCTGGCGCCGACGCAACTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACCAAGCGGCTCGCATA : 761
6347   : TGCCAGAGGGGGCTCAGACCCTGTGGCTGGCGCCGACGCAACTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACCAAGCGGCTCGCATA : 766
6345   : TGCCAGAGGGGGCTCAGACCCTGTGGCTGGCGCCGACGCAACTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACCAAGCGGCTCGCATA : 756
X78875.1 : TGCCAGAGGC---TCAGACCCTGTGGCTGGCGCCGACGCAACTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACCAAGCGGCTCGCATA : 812
          TGCCAGAGGCGggcTCAGACCCTGTgGcTGGCGCCGACGCAACTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACcAAGCGGCTCGCATA

*      840      *      860      *      880      *      900
798    : CCTACGTGTATTTCGGGAGATGAAATACTGATTTTGAAC TAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAGATT : 843
6347   : CCTACGTGTATTTCGGGAGATGAAATACTGATTTTGAAC TAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAGATT : 848
6345   : CCTACGTGTATTTCGGGAGATGAAATACTGATTTTGAAC TAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAGATT : 838
X78875.1 : CCTACGTGTATTTCAGAGATGAAATACTGATTTTGAAC TAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAGATT : 894
          CCTACGTGTATTTCgGgAGATGAAATACTGATTTTGAAC TAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAGATT

*      920      *      940      *      960      *      980
798    : GCAAAGGTTACTGTGCCCGTCGTTGATCGTGCACATGCTCTGCGGCATATCAAGCGATCCCCAACATGCCGAATGTCACG : 925
6347   : GCAAAGGTTACTGTGCCCGTCGTTGATCGTGCACATGCTCTGCGGCATATCAAGCGATCCCCAACATGCCGAATGTCACG : 930
6345   : GCAAAGGTTACTGTGCCCGTCGTTGATCGTGCACATGCTCTGCGGCATATCAAGCGATCCCCAACATGCCGAATGTCACG : 920
X78875.1 : ACAAAGGTTACTGTGCCCGTcTTGATCGTGCACATGCTCTGCGGCATATCAAGCGATCCCCAACATGCCGAATGTCACG : 976
          gCAAAGGTTACTGTGCCCGTcTTGATCGTGCACATGCTCTGCGGCATATCAAGCGATCCCCAACATGCCGAATgTCACG

*      1000     *      1020     *      1040     *      1060
798    : GACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGGAGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATACCG : 1007
6347   : GACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGGAGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATACCG : 1012
6345   : GACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGGAGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATACCG : 1002
X78875.1 : GACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGGAGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATACCG : 1058
          GACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGGAGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATACCG

*      1080     *      1100     *      1120     *      1140
798    : AAACCAGAGTTCATCGAGTGTGTCTATGGGGTTATAAGTGTGCGGGCCCAATGCTTATGGAGTCTATACCAGGCTGGG : 1089
6347   : AAACCAGAGTTCATCGAGTGTGTCTATGGGGTTATAAGTGTGCGGGCCCAATGCTTATGGAGTCTATACCAGGCTGGG : 1094
6345   : AAACCAGAGTTCATCGAGTGTGTCTATGGGGTTATAAGTGTGCGGGCCCAATGCTTATGGAGTCTATACCAGGCTGGG : 1084
X78875.1 : AAACCAGAGTTCATCGAGTGTGTCTATGGGGTTATAAGTGTGCGGGCCCAATGCTTATGGAGTCTATACCAGGCTGGG : 1140
          AAACCAGAGTTCATCGAGTGTGTCTATGGGGTTATAAGTGTGCGGGCCCAATGCTTATGGAGTCTATACCAGGCTGGG

*      1160     *      1180     *      1200     *      1220     *
798    : CGCGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAABCCGAGAGTCGGACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGCACTTTGAGT : 1171
6347   : CGCGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAABCCGAGAGTCGGACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGCACTTTGAGT : 1176
6345   : CGCGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAABCCGAGAGTCGGACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGCACTTTGAGT : 1166
X78875.1 : CGCGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAABCCGAGAGTCGGACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGCACTTTGAGT : 1222
          CGCGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAABCCGAGAGTCGGACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGcACTTTGAGT

1240      *      1260      *      1280      *      1300      *
798    : AGGAGATTTTGC----- : 1183
6347   : AGGAGATTTTGCCTGCTGA----- : 1194
6345   : AGGAGATTTTGCCTGCTGA----- : 1184
X78875.1 : AGGAGATTTTGCCTGAAGTCTGGTGTTCAGTACAATACGACATCTGTGAGCAATATCTCATCATCTCATCTTGAATTCC : 1304
          AGGAGATTTTGCtGctga

1320      *      1340      *
798    : ----- : -
6347   : ----- : -
6345   : ----- : -
X78875.1 : AGTCTCAAATTTACATTCGACATGGCCCTCCTGCTGGTTGAGC : 1347

```

Figura 14.- Alineamiento del gen de tripsina de las cepas de *M. anisopliae* 798, 6345 y 6347, comparadas con la secuencia reportada en el NCBI que pertenece a una cepa de *M. anisopliae* (X78875.1). En negro se muestran las secuencias de los genes altamente conservados, en gris y blanco las secuencias variables, los codones de inicio y de terminación se muestran encerrados en un cuadro.

A continuación se muestra los genes que se pudieron detectar en cada una de las cepas con las que se trabajó (Cuadro 6).

Cuadro 6.- Genes *pr1* (subtilisinas) y *pr2* (tripsinas) detectados en las diversas cepas de *Metarhizium anisopliae* proporcionadas por el ARSEF.

Cepa	Gen
798	<i>pr1A, pr1B,pr1C pr1E, pr1F, pr1G, pr1J, pr1K y pr2</i>
6342	Ninguno
6345	<i>pr1A, pr1B,pr1C pr1E, pr1F, pr1G, pr1J, pr1K y pr2</i>
6347	<i>pr1A, pr1B,pr1C pr1E,pr1F pr1G, pr1J, pr1K y pr2</i>
3019	Ninguno

7.3 Motivos de las secuencias promotoras

El análisis de estas secuencias por una base de datos buscadora de motivos, arroja una serie de secuencias donde se corrobora que pertenecen a secuencias de promotores de otros organismos, en la Fig.15 está las secuencias correspondientes al promotor de *pr1A* y en la Fig.16 al gen *pr2*. Las secuencias promotoras se observan en el Anexo 2.

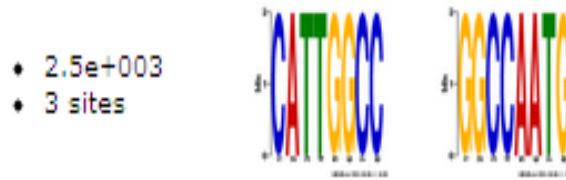


Figura 15.- Secuencia del fragmento del promotor del gen *pr1A* encontrando varios motivos en la secuencia analizada, por ejemplo en el motivo (secuencia de bases marcadas en colores) según la base de datos de la página footprintdb corresponde a una secuencia de la caja CAAT de muchos genes de Eucariotes.

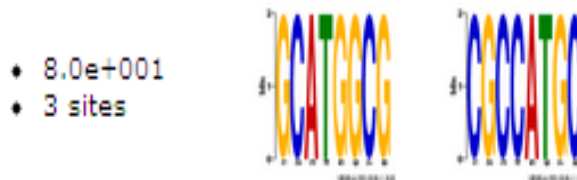


Figura 16.- Secuencias del gen *pr2* se encontraron algunos motivos que corresponden al promotor por ejemplo en la base de datos footprintdb el motivo (secuencia de bases marcadas en colores) corresponde al promotor de varias plantas como *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum*. El motivo 7 presenta una similitud con el promotor de una cisteín proteinasa que posiblemente se ancle un factor de transcripción.

7.4 Búsqueda de los ORF en las secuencias de genes *pr1* y *pr2*

De todas las secuencias de los genes *pr1* y *pr2* de las diferentes cepas de *M. anisopliae* 798, 6345 y 6347, se obtuvieron los marcos abiertos de lectura (ORF'S). Todas las secuencias de aminoácidos se muestran en el Anexo 4. Las secuencias de aminoácidos marcadas con amarillo corresponden al centro activo (histidina). Todas las secuencias de aminoácidos presentan similitud con las proteasas subtilisinas y tripsinas disponibles del NCBI.

7.5 Análisis de la actividad de proteasas

7.5.1 Análisis preliminar

La actividad de las proteasas también se comprobó cuando estas mismas cepas fueron inoculadas en tubos con gelatina, al transcurrir un lapso de 7 días se observó la licuefacción del medio como positivo, que comparado con el control, el cual permaneció sólido a temperatura de 4°C Fig. 17.

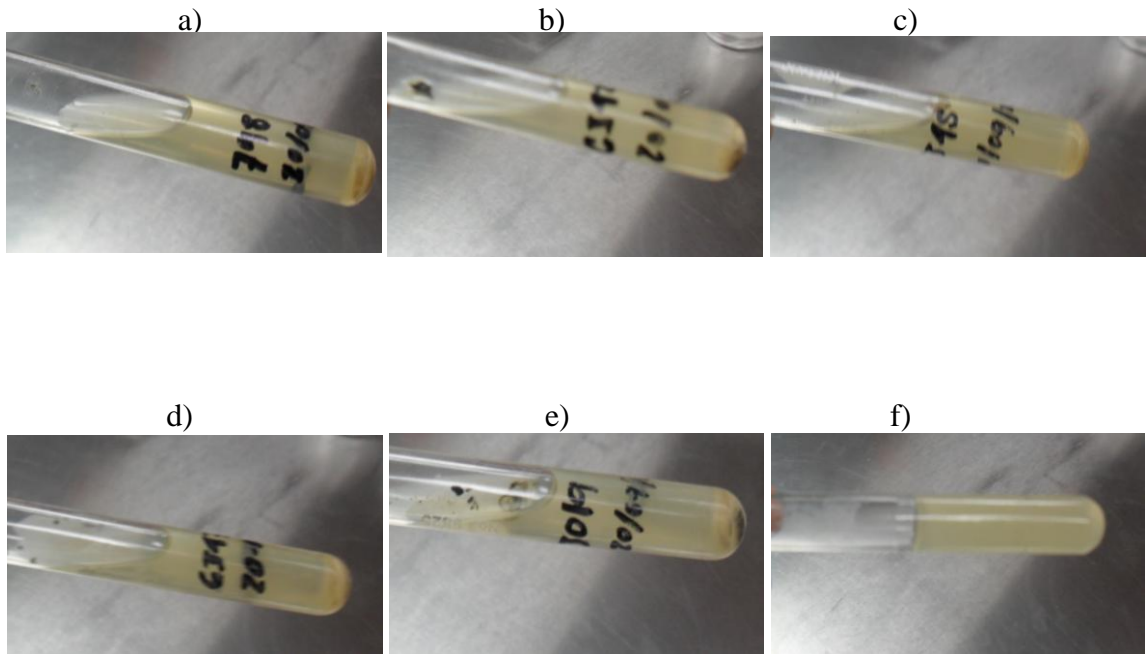


Fig. 17.- Fotografías de las diferentes cepas de *M.anisopliae* cultivadas en medio a base de gelatina en donde se muestra la capacidad de licuar el medio comparado con el control, el cual se observa solido; a) 798, b) 6342, c) 6345, d) 6347, e) 3019, f) testigo.

7.5.2 Análisis con sustratos

Las cepas estudiadas presentan diferentes patrones de absorbancia con los sustratos cromogénicos. En todos los casos donde se adicionó la quitina como fuente de carbono se detectó un incremento en la absorbancia para los dos tipos de proteasas. El tiempo de absorbancia máxima es diferente para cada cepa y puede observarse en las Figs. 17-26. El análisis de varianza no indica una diferencia significativa ($F= 201.50$, $gl= 120$ y $P= .05$) entre las cepas 798, 6345 y 6347 en la capacidad de producción de las enzimas Pr1, sin embargo se encontró diferencia significativa ($F=292.63$, $gl=120$ y $P=.05$) para la cepa 6342 en su capacidad para producir Pr2. En los Cuadros 7 y 8 se muestran los análisis de comparación de medias.

Cuadro 7.- Comparación de medias por el método de Tukey al 0.05 para la actividad enzimática de Pr1 en diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* en base a la absorbancia registrada.

Cepa	Absorbancia			
	24 h	48 h	72h	96h
798 Pr1Q	0.1779 ± 0.002 L,K,M	0.5983 ± 0.008 A	0.3314 ± 0.003 E,D,F	0.4511 ± 0.004 B
798 Pr1	0.1236 ± 0.043 P,Q,N,O,M	0.1593 ± 0.040 L,N,K,M	0.1311 ± 0.005 P,Q,N,O,M	0.1372 ± 0.018 P,L,N,O,M
6342Pr1Q	0.2893 ± 0.008 E,G,H,F	0.2044 ± 0.058 I,K,J	0.1924 ± 0.005 L,K,J	0.3717 ± 0.014 C,D
6342 Pr1	0.0531 ± 0.001 R	0.1125 ± 0.001 P,Q,N,O,R	0.1935 ± 0.004 L,K,J	0.1960 ± 0.002 L,K,J
6345 Pr1Q	0.0714 ± 0.007 Q,R	0.5466 ± 0.005 A	0.2931 ± 0.006 E,G,H,F	0.4354 ± 0.002 C,B
6345 Pr1	0.0755 ± 0.020 Q,R	0.0866 ± 0.003 P,Q,O,R	0.0756 ± 0.001 Q,R	0.0775 ± 0.003 P,Q,R
6347 Pr1Q	0.3417 ± 0.004 E,D	0.6007 ± 0.053 A	0.2808 ± 0.005 G,H,F	0.4082 ± 0.004 C,B
6347 Pr1	0.1404 ± 0.003 L,N,O,M	0.2778 ± 0.000 G,H,F	0.4069 ± 0.002 C,B	0.2621 ± 0.002 I,G,H
3019 Pr1Q	0.3035 ± 0.028 E,G,H,F	0.3209 ± 0.059 E,G,D,F	0.4448 ± 0.005 B	0.3038 ± 0.004 E,G,H,F
3019 Pr1	0.0546 ± 0.002 R	0.1189 ± 0.023 P,Q,N,O,M	0.2849 ± 0.037 E,G,H,F	0.2464 ± 0.015 I,H,J

Las medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes; ± indica el error estándar basado en 2 repeticiones con 2 con 2 lecturas.

Cuadro 8.- Comparación de medias por el método de Tukey al 0.05 para la actividad enzimática de Pr2 en diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* en base a la absorbancia registrada

Cepa	Absorbancia			
	24h	48h	72h	96h
798 Pr2Q	0.3169 ± 0.007 F	0.4661 ± 0.026 C,B	0.4342 ± 0.002 C,D	0.4643 ± 0.007 C,B
798 Pr2	0.1329 ± 0.001 K,J,L	0.1344 ± 0.04 K,J,L	0.2544 ± 0.010 G,I,H	0.2744 ± 0.007 G,F,H
6342Pr2Q	0.5538 ± 0.073 A	0.1369 ± 0.004 K,J,L	0.1480 ± 0.006 K,J	0.1475 ± 0.006 K,J
6342 Pr2	0.0490 ± 0.009 O	0.1038 ± 0.002 N,K,M,L	0.1020 ± 0.004 N,K,M,L	0.0989 ± 0.001 N,K,M,L
6345 Pr2Q	0.0782 ± 0.01 N,M,O	0.4216 ± 0.011 C,E,D	0.3906 ± 0.019 E,D	0.4388 ± 0.002 C,B,D
6345 Pr2	0.0757 ± 0.001 N,O	0.0771 ± 0.002 N,M,O	0.0925 ± 0.007 N,M,O,L	0.1117 ± 0.007 N,K,M,L
6347 Pr2Q	0.1621 ± 0.009 J	0.4876 ± 0.028 B	0.3783 ± 0.002 E	0.3986 ± 0.001 E,D
6347 Pr2	0.1171 ± 0.006 N,K,M,J,L	0.1254 ± 0.004 K,M,J,L	0.2234 ± 0.007 I	0.2873 ± 0.009 G,F
3019 Pr2Q	0.3057 ± 0.016 F	0.4051 ± 0.018 E,D	0.3827 ± 0.017 E	0.4103 ± 0.010 E,D
3019 Pr2	0.0808 ± 0.014 N,M,O	0.0980 ± 0.009 N,M,O,L	0.2261 ± 0.037 I,H	0.2827 ± 0.024 G,F

Las medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes; ± indica el error estándar basado en 2 repeticiones con 2 con 2 lecturas.

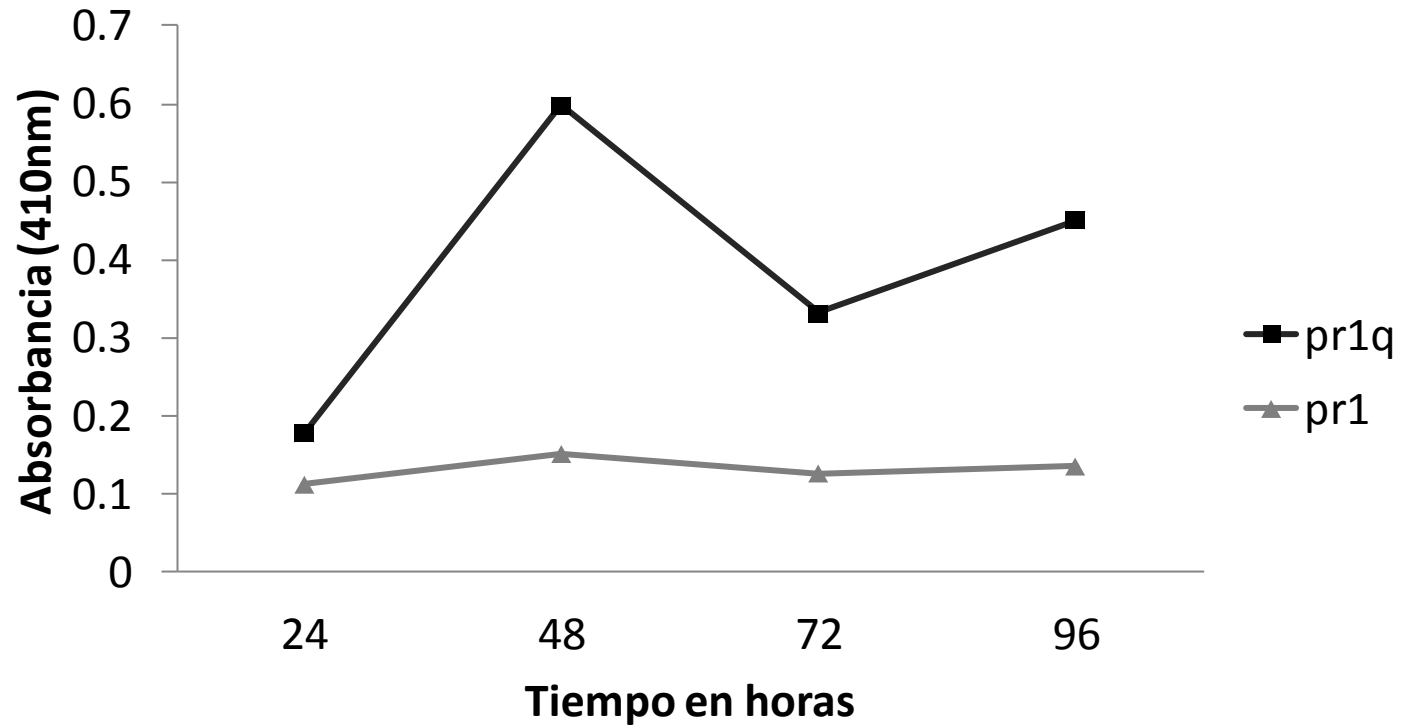


Fig. 18.- Cinética enzimática de Pr1 de la cepa de *M.anisopliae* 798 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

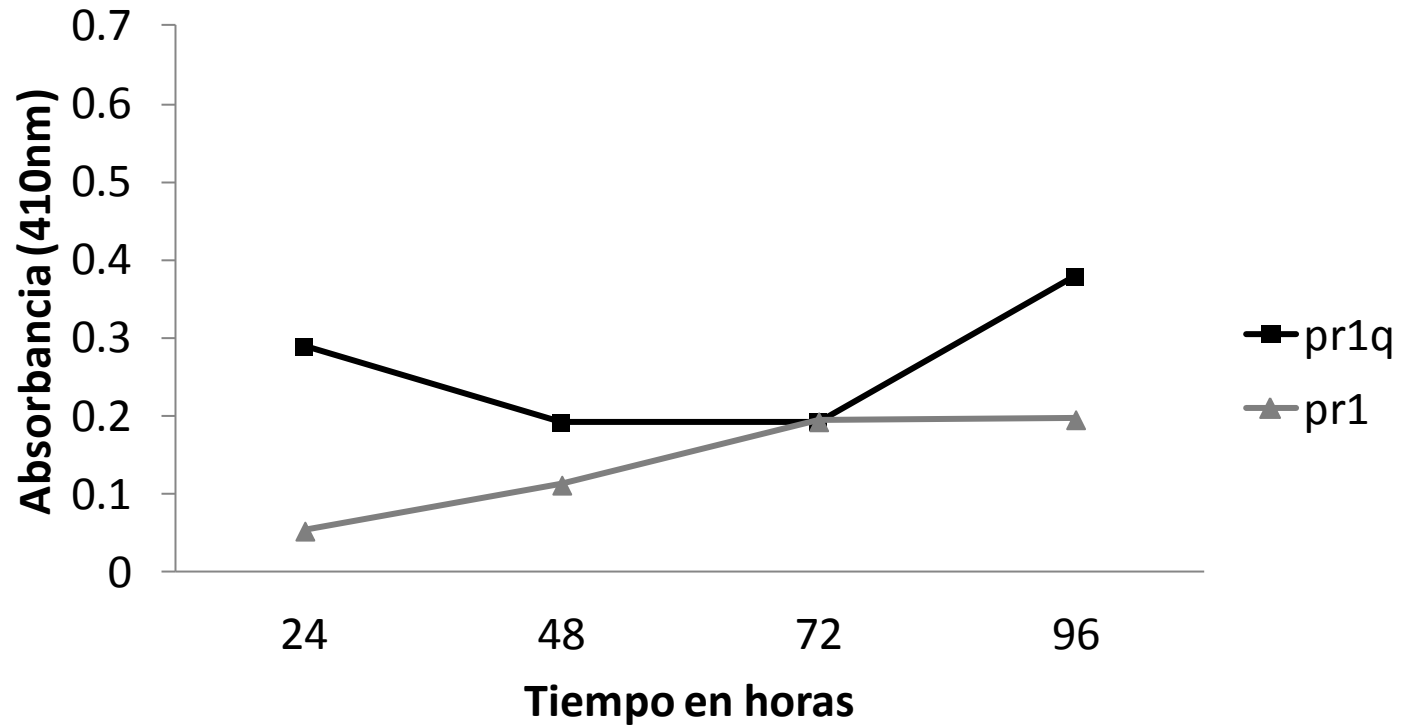


Fig. 19.- Cinética enzimática de Pr1 de la cepa de *M.anisopliae* 6342 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

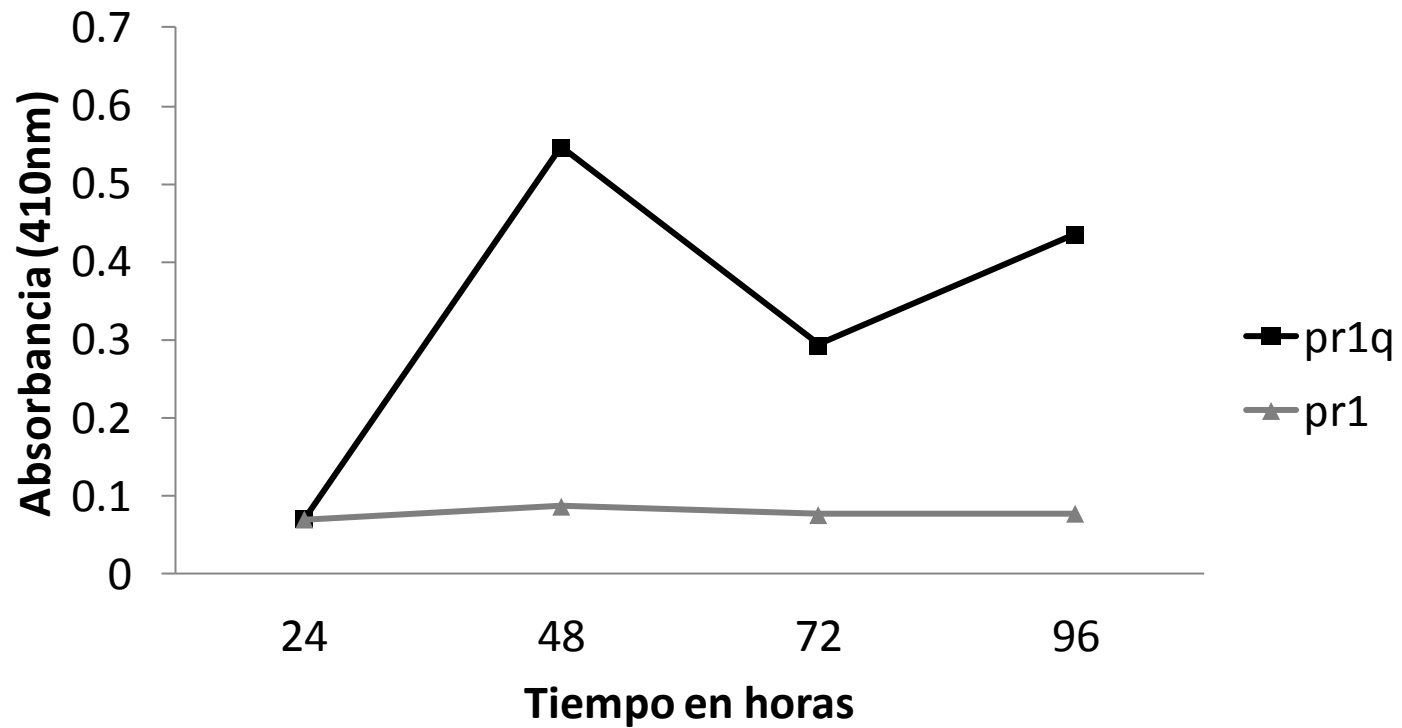


Fig. 20.- Cinética enzimática de Pr1 de la cepa de *M.anisopliae* 6345 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

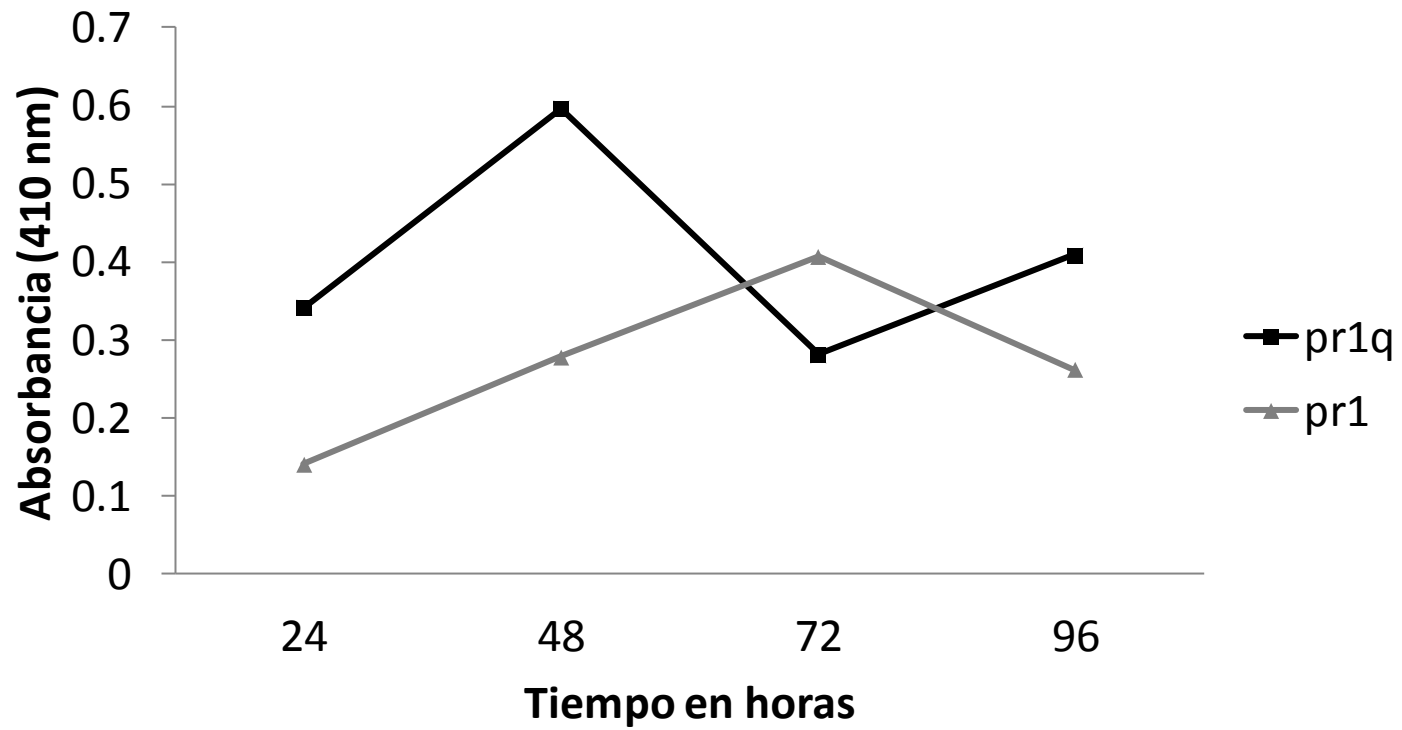


Fig. 21.- Cinética enzimática de Pr1 de la cepa de *M.anisopliae* 6347 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

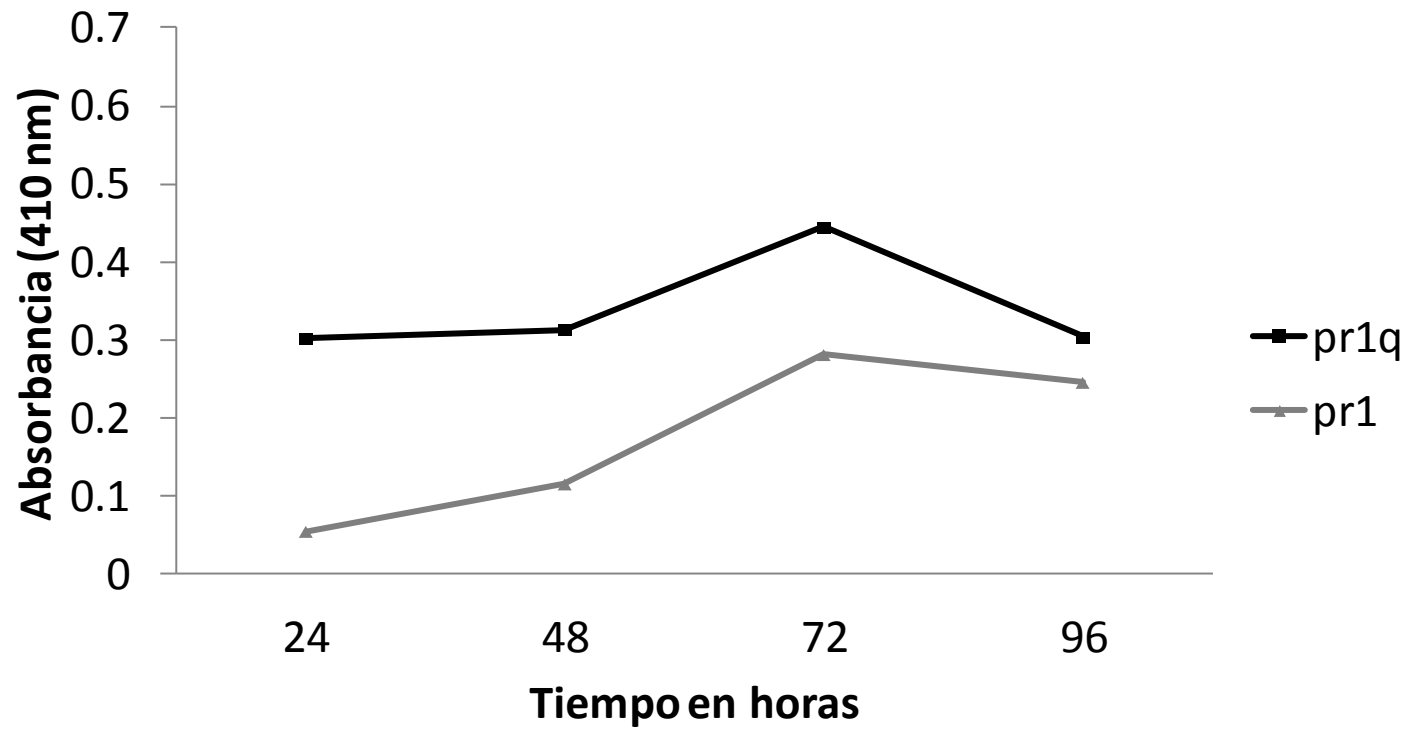


Fig. 22.- Cinética enzimática de Pr1 de la cepa de *M.anisopliae* 3019 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

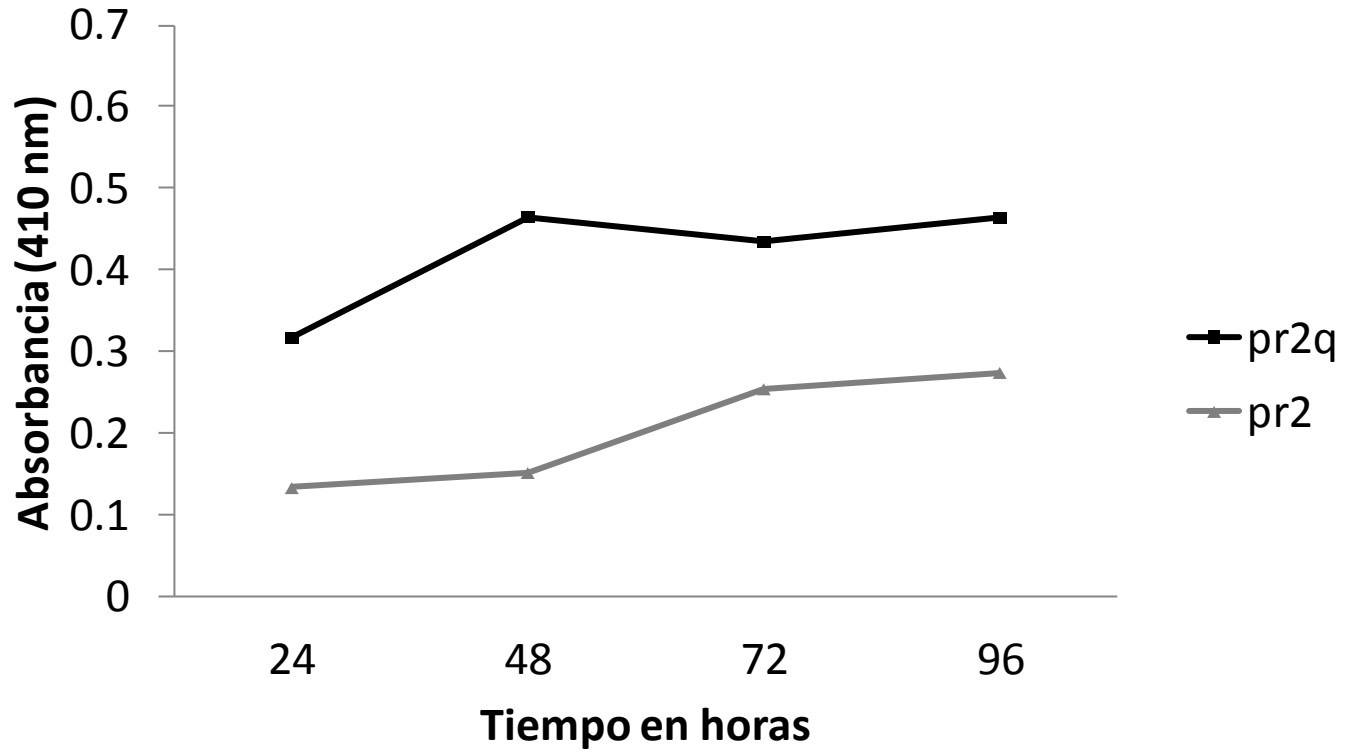


Fig. 23.- Cinética enzimática de Pr2 de la cepa de *M.anisopliae* 798 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochloride ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

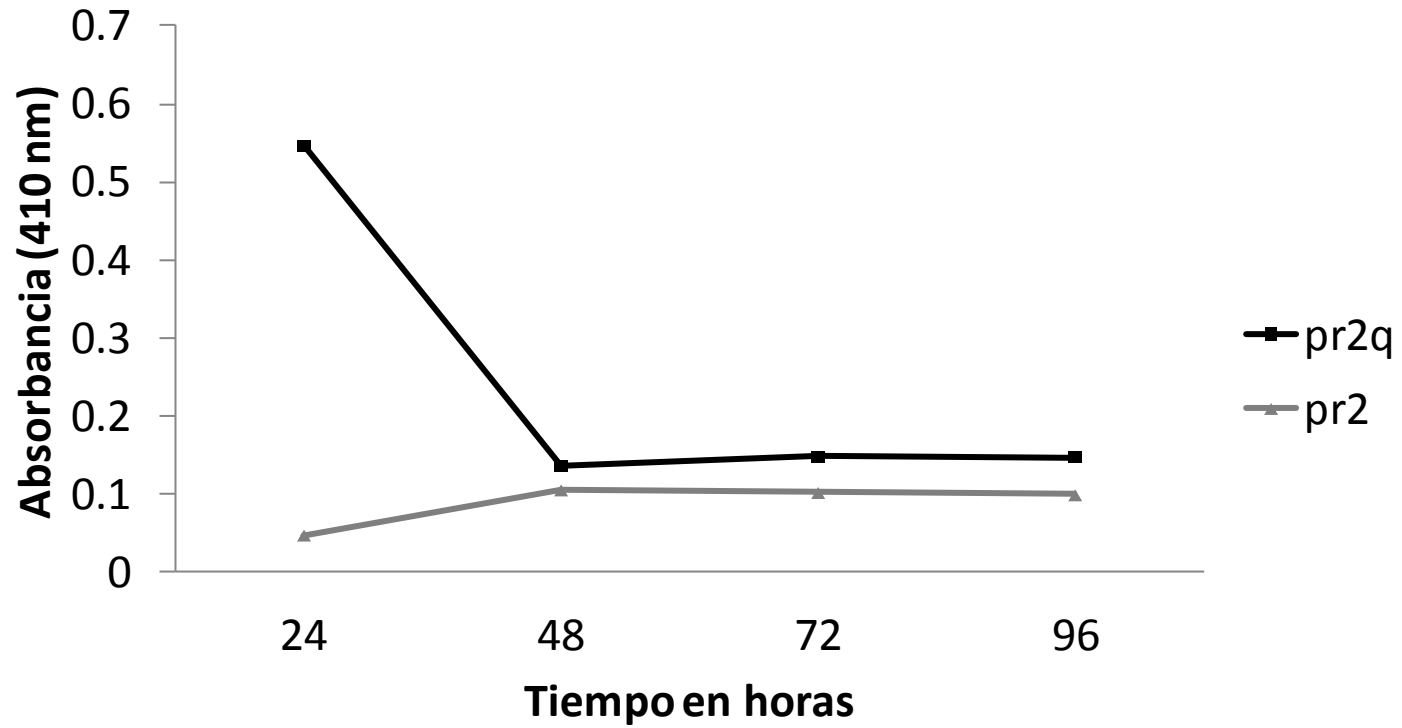


Fig. 24.- Cinética enzimática de Pr2 de la cepa de *M.anisopliae* 6342 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochloride ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

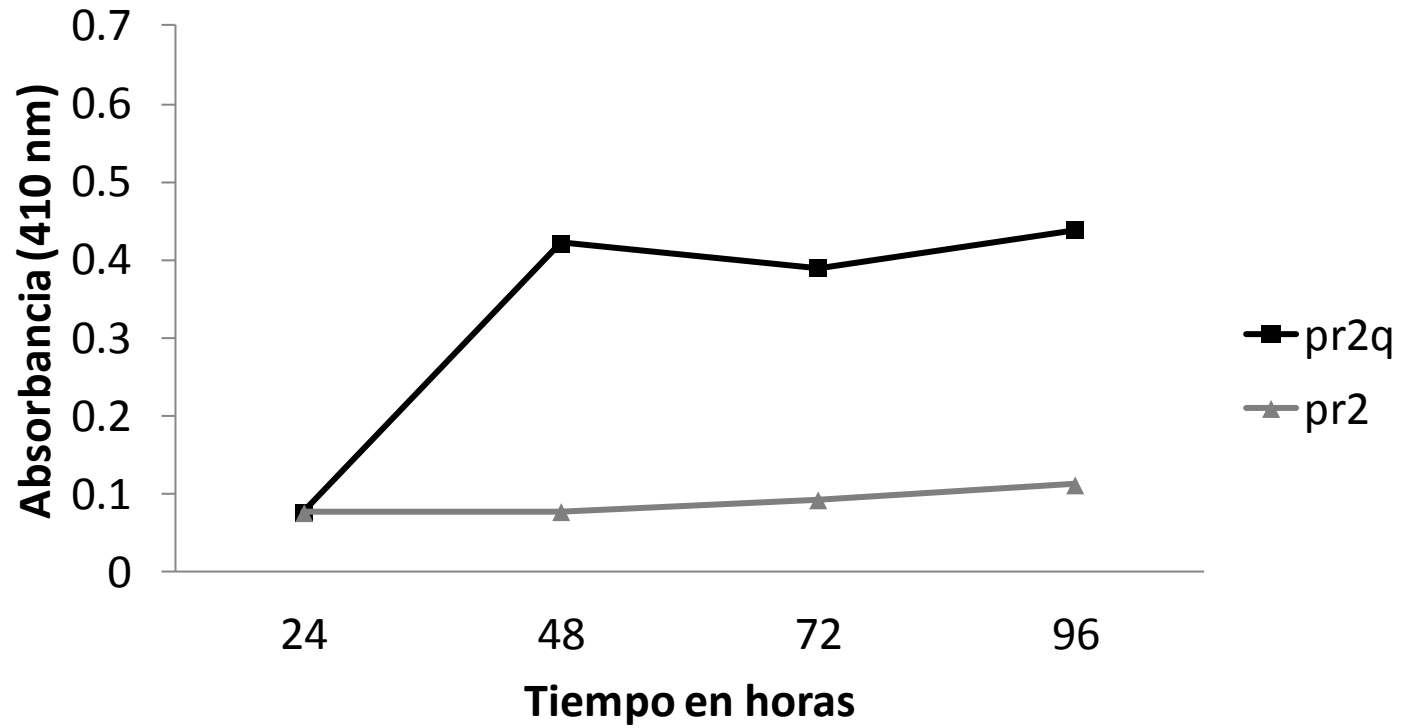


Fig. 25.- Cinética enzimática de Pr2 de la cepa de *M.anisopliae* 6345 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochloride ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

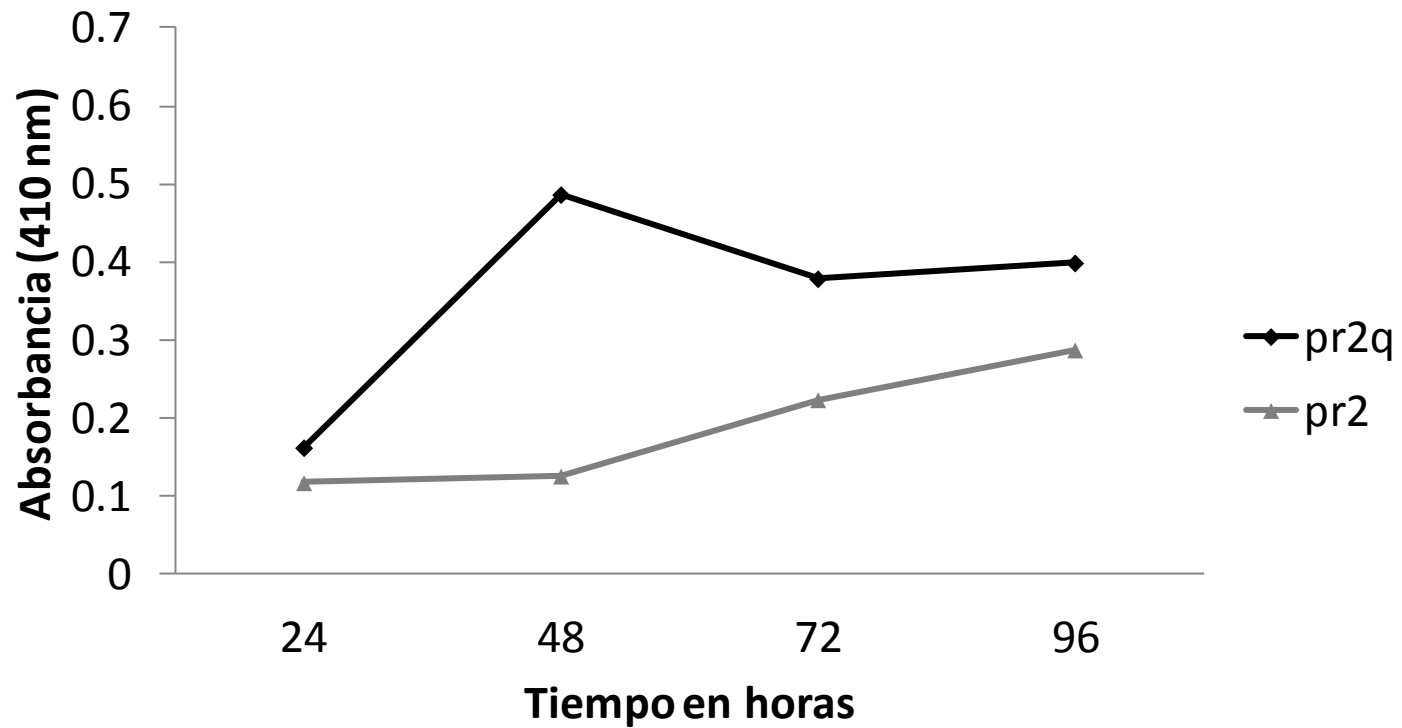


Fig. 26.- Cinética enzimática de Pr2 de la cepa de *M.anisopliae* 6347 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochloride ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

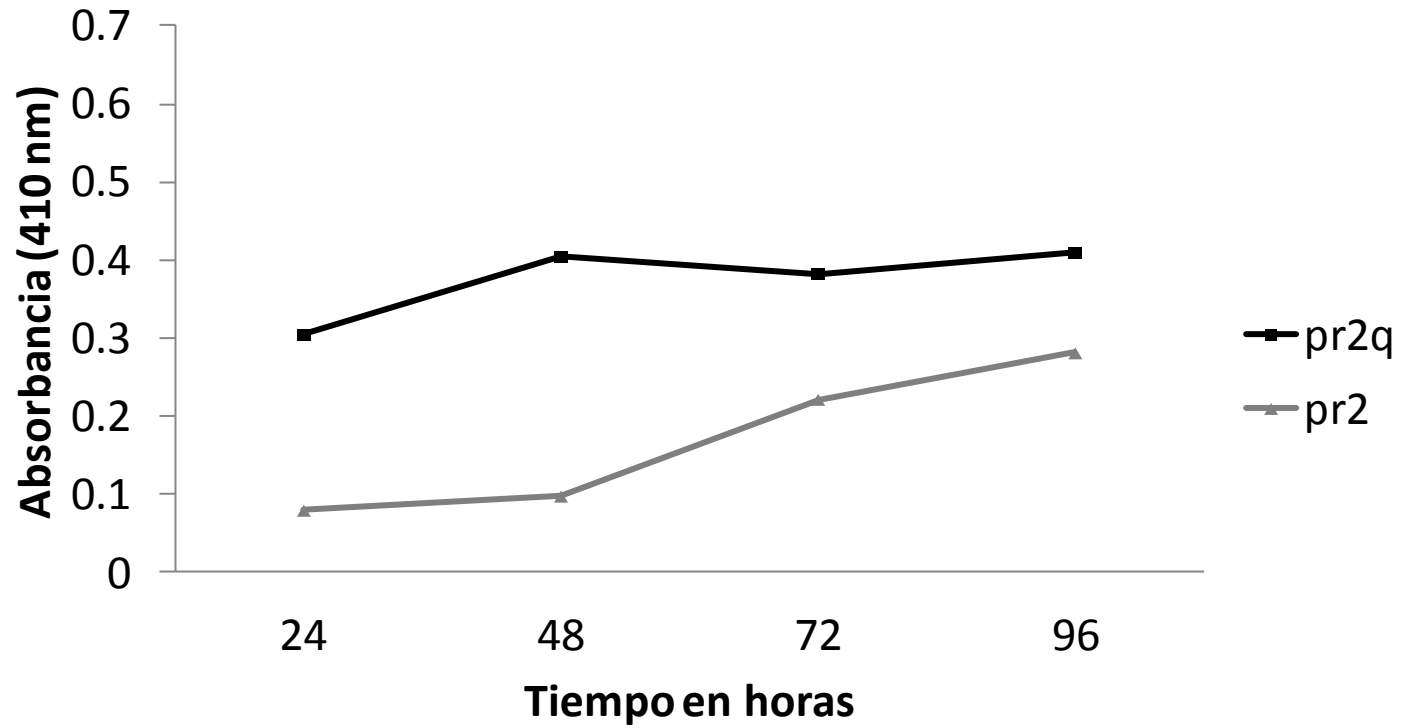


Fig. 27.- Cinética enzimática de Pr2 de la cepa de *M.anisopliae* 3019 cultivada en 2 medios diferentes e incubada con el N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochloride ■ cepa cultivada con quitina como inductor; ▲ cepa cultivada en medio basal.

7.6 Bioensayos

En los bioensayos con la plaga de la mosca pinta (*Prosapia* sp.) se registraron niveles de mortalidad inferiores al 50% en un lapso de 48 h, como se muestra a continuación.

Cuadro 9.- Porcentaje de mortalidad en adultos de mosca pinta causado por diferentes cepas de *M. anisopliae*.

Cepa	Mortalidad de adultos a las 48 h (%)
798	30
6342	30
6345	20
6347	20
3019	50
Control	5

En las larvas de *Spodoptera exigua* la cepa 6342 causó un 70% de mortalidad seguida de la cepa 6345 y 798 con un 66.66 y 60% de mortalidad respectivamente, a los 10 días después de la inoculación. Pero solo la cepa 6345 logró esporular en las larvas, mientras que en las demás cepas solo algunas se observaba el micelio. Mientras que en el control sólo se registró un 4% de mortalidad. Por otra parte en las larvas

sobrevivientes se observó una disminución en el número de pupas comparadas con el control, como se observa en el Cuadro 10.

Cuadro 10- Porcentaje de mortalidad en larvas de 1^{er} instar de *Spodoptera exigua* a los 10 días después de la inoculación con *Metarhizium anisopliae*.

Cepa	Mortalidad en larvas de <i>S. exigua</i> a las 48 h (%)	Larvas que llegaron a pupar (%)
798	60	33.3
6342	73.3	13.3
6345	66.66	13.3
6347	36	14.66
3019	41	16
Control	4	86

8. DISCUSIÓN

Los hongos entomopatógenos excretan una gran variedad de enzimas como son proteasas, quitinasas, fosfolipasas, lipasas, estererasas, fosfatasas, etc., que se encargan de hidrolizar la cutícula del insecto (Freimoser *et al.*, 2003). Dentro de las proteasas secretadas por los hongos entomopatógenos se encuentran las del tipo de las subtilisinas que son necesarias para que los hongos puedan penetrar la cutícula del insecto y aprovechar los nutrientes, muchas de estas proteasas son sintetizadas cuando el hongo es cultivado en medios con cutícula de insecto, y se consideran entre los principales factores de virulencia (Bagga *et al.*, 2004; Paterson *et al.*, 1994; Freimoser *et al.*, 2005; St. Leger *et al.*, 1992; Joshi *et al.*, 1997; Freimoser *et al.*, 2003). Se han utilizado algunas herramientas de biología molecular para determinar el rol que juegan algunas de las enzimas en el proceso de la virulencia hacia los insectos (St. Leger *et al.*, 1996d; Fang *et al.*, 2005). Tal es el caso de algunos estudios que han revelado la presencia variable de genes de subtilisina en *M. anisopliae*. Manalil *et al.*, (2010) identificaron 5 genes de subtilisina y Santi *et al.*, (2010) reportaron otros 3. A la fecha se han reportado 11 genes de subtilisinas en cepas de *M. anisopliae* en los cuales el número y el nivel de expresión varían ampliamente (Freimoser *et al.*, 2003; 2005; Bagga, *et al.*, 2004).

En las cepas 798, 6345 y 6347 de *M. anisopliae* que se analizaron en este estudio sólo se detectaron 8 de los 11 genes de subtilisinas reportados Bagga *et al.*, 2004 trabajaron con dos cepas *M. anisopliae* (2575) que presenta múltiples hospederos y con *M. anisopliae* sf. *acridium* (324) que es específica para langostas. En la cepa 2575 detectaron los 11 genes pero en la cepa 324 solo detectaron 7 genes, lo que demuestra que no todas las cepas contienen los 11 genes del tipo de las subtilisinas reportados hasta la fecha y que son requeridos para expresar las proteasas encargadas de hidrolizar la cutícula como lo demuestra Bagga *et al.*, 2004. En este sentido, la cepa 6342 de *M. anisopliae* de este estudio no posee ningún gen del tipo de subtilisinas y tripsinas analizados lo que concuerda con los resultados que reportaron Wang *et al.*, (2002) en cuyo trabajo no detectaron los genes *prIA* y *prIB* de la cepa de *M. anisopliae* V275.

La expresión de las proteasas ocurre durante las primeras etapas de la infección e incrementa durante la penetración al hospedero (St. Leger *et al.*, 1996a). La diversidad de subtilisinas encontradas en las cepas analizadas en este estudio puede conferir habilidad para que el hongo degrade las diferentes proteínas que conforman la cutícula del insecto. Esto puede estar directamente relacionado a las diferencias que en cuanto a composición presentan las cutículas de los insectos (Gillespie *et al.*, 1998). Otro punto importante de acuerdo a Bagga *et al.* (2004) es la secuencia a nivel de aminoácidos en donde se observa que las proteasas presentan variaciones en su composición lo que les confiere estabilidad a diferentes condiciones ambientales, razón por la cual existe una amplia gama de ellas.

Las cepas de *M. anisopliae* que se estudiaron en el transcurso de esta investigación, presentan la capacidad de sintetizar proteínas del tipo de subtilisinas y tripsinas al momento de ser expuestas a diferentes medios (medio basal y medio basal suplementado con cutícula), encontrando una mayor expresión en medios suplementados con cutícula de acuerdo a las mediciones de absorbancias, al momento de comparar las lecturas obtenidas tanto del medio basal con quitina y el medio basal solo, como lo señalan diversos autores (Tiago *et al.*, 2002; De Silva *et al.*, 2002; Freimoser *et al.*, 2003; 2005; Sheng *et al.*, 2006; Santi *et al.*, 2010). Sin embargo, en el medio basal también se detectó la producción de subtilisinas y tripsinas, esto concuerda con Paterson *et al.*, (1994) quienes indican que las proteasas son expresadas a causa de la de privación de nutrientes. En nuestros resultados se observan variaciones en los niveles de producción de proteasas con respecto al tiempo y al medio de cultivo que se utiliza. Cabe mencionar que debido a la variedad de proteasas encontradas no fue posible determinar la actividad de cada una de ellas debido a la complejidad en el proceso de purificación, por lo que únicamente se consideró la absorbancia de los extractos crudos como parámetro indicador de la producción de estas enzimas. Estos resultados concuerdan con Freimoser *et al.*, (2005) quienes señalan que las diferentes proteasas presentan diferencias en sus niveles de producción, por ejemplo las proteasas Pr1A y Pr1B se produjeron en medio mineral, sin embargo su producción aumentó en presencia de cutícula, es decir son constitutivas.

El gen pr1A es el más abundante y más estudiado de las subtilisinas y ha sido fuente de investigación para incrementar la virulencia de los hongos (St. Leger *et al.*, 1996d; Freimoser *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008). Por tal motivo se realizó en este estudio la secuenciación completa del gen. En cuanto al análisis de las regiones promotoras se encontraron motivos que ayudan a la regulación de los genes como lo menciona Sreen *et al.*, 1997. Mismo que se corrobora al introducir las secuencias en la base de datos Multiple Em Motif Elicitation (MEME).

De acuerdo a da Silva-Pinto *et al* (2002) todas las cepas de *M. flavoviride* presentan niveles de expresión diferentes, nuestros resultados muestran variaciones con respecto al tiempo que tarda cada cepa en sintetizar las diferentes proteasas y que podría reflejarse en la virulencia. Nuestro estudio indica que en un lapso de 24h hay síntesis de proteasas del tipo de subtilisinas y de tripsinas a diferencia de las cepas que reportaron Gillespie *et al.*, (1998), donde reportaron actividad de subtilisinas en la mayoría de las cepas en un lapso de 72h mientras que para tripsinas ocurrió a las 48h después de la inoculación. En este mismo trabajo reportaron que hay partes en el insecto que son más fáciles de hidrolizar debido a su composición y propiedades químicas. Santi *et al.*, (2010) reportaron que la composición de la cutícula de diferentes especies de insectos actúa como un inductor de proteasas específicas. Cuando una cepa es expuesta a un determinado insecto presenta patrones de expresión diferentes, por ejemplo en *M. anisopliae* var. *anisopliae* E6 se detectó la presencia de las proteasas Pr1A y Pr1J cuando se cultivó con cutícula de *Rhipicephalus micropulus* y *Dysdercus pruvianus*, y solo se detectó la proteasa Pr1I cuando se cultivó únicamente con *D. pruvianus* (Santi *et al.*, 2010). De esta manera se puede suponer que la presencia de algunos compuestos presentes en la cutícula del insecto actúan como inductores para la expresión y regulación de los genes involucrados en la adaptación del hongo (Freimoser *et al.*, 2005), mientras que algunos compuestos pueden afectar o inhibir la actividad de las enzimas e incluso la geminación de la conidia (Gillespie *et al.*, 1998; Lord y Howard, 2004).

La mortalidad para *Prosapia* spp., obtenida en este estudio es similar a la reportada por Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla (1999) quienes reportaron porcentajes de mortalidad del 29.9 y 37%.

En algunos trabajos se usan hongos entomopatógenos para el control de diferentes especies del género de *Spodoptera* (Lezama *et al.*, 1996; 2005) que reportan porcentajes de mortalidad del 94-100% (Lezama *et al.*, 1996), en nuestros resultados el mayor porcentaje de mortalidad fue de 73% más alto a lo que reporta Amer *et al* (2008) pero se observa un efecto subletal en el crecimiento de las larvas tratadas y en el número de individuos que llegaron a pupar comparadas con el control, como lo reporta Anand *et al* (2009).

En base a los diferentes resultados obtenidos de mortalidad tanto de *Prosapia* spp (mosca pinta) como *Spodoptera exigua* (gusano soldado) contrastados con los resultados de actividad enzimática se observa que no hay una relación entre la actividad enzimática de las cepas y la mortalidad, debido a que las cepas que presentan la mayor actividad enzimática para Pr1 y Pr2 son las cepas 6347 y 798, mientras que los datos de mortalidad más altos para *Prosapia* spp. y *Spodoptera exigua* fueron causados por las cepas 3019 y 6342 respectivamente. De acuerdo a Wang *et al.*, (2002) la virulencia no radica precisamente en los genes *pr1* y *pr2*, por lo tanto todo el proceso de virulencia es un proceso multifactorial como lo describen Lord y Howard, (2004) y Fang *et al.*, (2007; 2009b). En dicho proceso intervienen muchos factores tanto de condiciones ambientales, como por ejemplo las temperaturas óptimas y las condiciones de humedad que favorecen la germinación de la conidia (Walstad *et al.*, 1970). Fang *et al.*, (2005) reportaron que un aumento en el número de copias del gen *Bbchit1* incrementa la virulencia hacia áfidos y que las quitinasas actúan de manera sinérgica con otras proteasas para degradar la cutícula del insecto. Fang *et al.*, (2007) reportó que el gen *cag8* sintetiza una proteína homóloga a la encontrada en *A. nidulans* que está relacionada con la señalización (RGS) en la conidiogénesis y la interrupción de ese gen afecta la virulencia.

9. CONCLUSIÓN

- En tres de las cepas de *M. anisopliae* (798, 6345 y 6347) se detectaron 8 de los 11 genes de subtilisinas, y un gen de tripsinas.
- En la cepa 6342 no se lograron detectar los genes pertenecientes al tipo de las subtilisinas y tripsinas, sin embargo en todas las cepas se detecta la actividad proteolítica.
- En las cepas estudiadas no hay una relación entre la producción de proteasas (Pr1 y Pr2) y los datos de mortalidad obtenidos.
- Los insectos tratados de mosca pinta presentan bajos porcentajes de mortalidad.
- Los hongos entomopatógenos pueden tener la ventaja de poder causar mortalidad en diferentes etapas de desarrollo del insecto.
- Las diferentes cepas de hongos causan un grado de daño a las larvas de *Spodoptera exigua* observando que se reducen los insectos que llegan a pupar.
- La cepa 6345 es la que obtuvo un mayor número de larvas infectadas de *Spodoptera exigua*.
- A pesar de que los oligos fueron diseñados con secuencias específicas de *M. anisopliae* puede existir la posibilidad de que haya variaciones en las secuencias de los genes en la cepa donde no se logró detectar.

10. RECOMENDACIONES

En estudios posteriores se tendrá que trabajar con otras técnicas moleculares para hacer la detección de los genes de subtilisinas y tripsinas en la cepa 6342 y ver si hay variaciones con respecto a los ya encontrados. Por otra parte se tendrá que diseñar otra estrategia para analizar más genes y así tener datos más completos en el proceso de la patogénesis.

11. BIBLIOGRAFÍA

Ali, S., Huang, Z. and Ren, S. 2010. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. *Journal of the Pest Sci.* 83: 361-370.

Alves, R.T., Bateman, R.P., Gunn, J., Prior, C. and Leather, S.R. 2002. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Neotropical Entomology.* 31: 091-099.

Amer, M.M., El-Sayed, T.I., Bakheit, H.K., Moustafa, S.A. y El-Sayed, Y.A. 2008. Pathogenicity and genetic variability of five entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis*. *Journal of Agriculture and Biological Sciences.* 4: 354-367.

Anand, R., Prasad, B., and Tiwary, B.N. 2009. Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. *Bio Control.* 54: 85-92.

Anderson, S.O. 1974. Biochemistry of insect cuticle. *Annul. Rev. Entomol.* 24: 29-61.

Ansari, M.A., Vestergaard, S., Tirry, L. and Moens, M. 2004. Selection of a highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 85: 89-96.

Bagga, S., Hu, G., Screen, E.S., St. and Leger, R.J. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene.* 324: 159-169.

Bautista-Gálvez, A., y González-Cortes, N. 2005. Tres dosis de *Metarhizium anisopliae* sobre la mosca pinta (*Aenolamia* spp) en caña de azúcar en la región de los ríos, Estado de Tabasco. *Universidad y Ciencia.* 21: 37-40.

Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1994a. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 64: 26-32.

Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1994b. Proteins hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *Journal of Invertebrate Pathology*. 63: 7-13.

Bidochka, M.J., Kasperski, J.E. and Wild, G.A.M. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.* 76: 1198-1204.

Campos, R.A., Arruda, W., Boldo, J.T., Silva, M.V., Barros, N.M., Azevedo, J.L., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*. 50: 257-261.

Capinera, J.L. 1999. Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida.

Carruthers, R.I., Feng, Z., Robson, D.S. and Roberts, D.W. 1985. In vivo temperature dependent development of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) mycosis in the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae). *Journal Invertebrate of Pathology*. 46: 305-311.

Castellanos-Mogue, J., González-Barajas, M., Mier, T., Reyes-Montes, M.D.R., Aranda, E. y Toriello, C. 2007. Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Rev. Iberoamericana Micol.* 24: 62-68.

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1982. Cercópidos plagas de los pastos en América Tropical. Biología y Control. Calderón, M., Aranfo, G., Varela, F. Producción Carlos A. Valencia. Cali, Colombia. CIAT. 51 p. (Serie 04SP-03.02).

CESVETAB. 2006. Programa de control biológico de la mosca pinta (salivazo) y el gusano barrenador de la caña de azúcar en Tabasco. Villahermosa Tab. México.

Chaves-Berrato, C., Christian, S.C., Schrank, A. and Henning-Vainstein, M. 2003. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology*. 48: 102-107.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 2004. Caracterización morfológica: Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos (Ed.), Cañedo, V., Ames T. Lima 12 Perú. pp. 33-39.

Clark, T.B., Keellen, W.R., Fukuda, T. and Lindegren, J.E. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 11: 1-7.

Coria-Avalos V.M., y Vidales-Fernández, J.A. 1997. Incidencia natural del entomopatógeno *Metarhizium sp* en poblaciones de *Copturus aguacatae* Kissinger (Coleoptera: Curculionidae: Zygopinae) en plantaciones aguacateras del estado de Michoacán. XX Congreso Nacional de control Biológico, Universidad de Guadalajara.

De la Cruz-Llanas, J.J., Vera-Graziano, J., López-Collado, J., Pinto, V.M., y Garza-García, R. 2005. Una técnica simple para el desarrollo de ninfas de *Aenolamia postica* (Homoptera: Cercopidae). *Folia Entomología Mexicana*. 44: 91-93.

De Silva Pinto F.G., Pelegrinellin Fungaro, M.H., Maldonado Ferreira, J., Valderas-Inglis., and Furlaneto, M.C. 2002. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genetics and Molecular Biology*. 25: 231-234.

De Faria, M.R. and Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237-256.

Dias, B.A., Neves, P.M.O.J., Furlaneto-Maria, L., Furlaneto, M.C. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Journal of Microbiology*. 39: 301-306.

Doberski, J.W. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the Elm Bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 37: 195-200.

Donatti, A.C., Furlaneto-Maia, L., Fungaro, M.H.P. and Furlaneto, M.C. 2008. Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. *Current Microbiol*. 56: 256-260.

Dumas, C., Robert, P., Pais, M., Vey, A. and Quiot, J.M. 1994. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxinas. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 108: 195-203.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R. and Kleiner, J. 2002. Methods on in vitro toxicology. *Food Chem. Toxicol*. 40: 193-236.

Falcon, L.A. and Huber, J. 1991. Biological control of the codling moth. In: Van der Greest and Evenhuis. *World Crop Pest, Tortricid Pests: Their biology, natural enemies and control*. Vol.5. pp 335-370.

Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y., and Pei, Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 363-370.

Fang, W. and Bidochka, M.J. 2006. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research*. 110: 1165-1171.

Fang, W., Pei, Y. and Bidochka, M.J. 2007. A regulator of a G protein signaling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*. 153: 1017-1025.

Fang, W., Feng, J., Fan, Y., Zhang, Y., Bidochka, M.J., St. Leger, R.J. and Pei, Y. 2009a. Expression a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102: 155-159.

Fang, W., Pava-ripoll, M., Wang, Sibao, St. Leger, R. 2009b. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 277-285.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. 23: 409.

Freimoser, F.M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G. and 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 host. *Microbiology*. 149: 239-247.

Fornelli, F., Minervini, F. and Logrieco, A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *Journal of Invertebrate Pathology*. 85: 74-79.

Freimoser, F.M., Hu, Gang and 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.

Fuguet, R. and Vey, A. 2004. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria spp*: In vivo studies. Journal of Invertebrate Pathology. 85: 152-167.

Gabriel, B.P. 1968. Enzymatic activities of some entomophorous fungi. Journal of Invertebrate Pathology. 11: 70-81.

García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M.B., Medrano-Roldán, M y Chaírez-Hernández, I. 2004. Evaluación de la cepa BBP1 de *Beauveria bassiana*, mycotrol, meta-sin y azinfos metílico contra *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en laboratorio y campo. Folia Entomología Mex. 43: 1-7.

García-Gutiérrez, C., Hernandez-Vélazquez, V.M., Rosas-García, N.M., Berlanga-Padilla, M.A. 2009. Hongos entomopatógenos. En. Manual de técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización de hongos y nematodos entomopatógenos. IPN. García-Gutierrez, C., Lezama-Gutierrez, R.L. (Eds.), México. pp.13-54.

Geier, P.W. 1963. The life history of codling moth, *Cydia pomonella* (L) (Lepidoptera: Tortricidae), in Australian Capital Territory. Australian Journal of Zoology. 11: 323-367.

Gilbert, C. 1994. Form and function of the stemmata in larvae of holometabolous insect. Annual Review Entomology. 39: 323-49.

Gillespie, J.P., Bateman, R., Charnley, A.K. 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium spp.* for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Journal of Invertebrate Pathology. 71: 128-137.

Gómez, L.A. 2007. Manejo del salivazo *Aeneolamia varia* en cultivos de caña de azúcar en el valle del río Cauca. Carta Trimestral. Cenicaña. 29: 10-17.

Guimaraes, F.R., Vargas-Osuna, E., Maracaja, P.B, y Santiago-Alvarez, C. 1995. Presencia de *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.; Noctuidae) y sus agentes bióticos asociados en la provincia de Córdoba. Bol. San, Veg. Plagas. 21: 641-646.

Hajek, A.E. and St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Anual. Rev. Entomol. 39: 293-322.

Hall, I.M. and Dunn, P.H. 1957. Fungi on spotted alfalfa aphid. California agriculture. 11.5.

Hart, M.P. and MacLeod, D.M. 1955. An apparatus for determining the effects of temperature and humidity on germination of fungus spores. Can. J. Botany. 33(4): 289-292.

Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hirayae, K., Nishizawa, Y. and Hibi, T. 1993. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. Journal of Invertebrate Pathology. 61: 97-102.

Hernández-Velázquez, V.M. y Berlanga-Padilla, A.M. 1999. Control microbial de mosca pinta *Aenolamia* spp. Con *Metarhizium anisopliae* .Ficha Técnica Num.CB-03. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria.3p.

Holmann, F. and Peck, D.C. 2002. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. Neotropical Entomology. 31: 275-284.

Hsiao, W.F., Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G. 1992. Effect of temperature and relative humidity on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*, toward the oat-bird berry aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hom.,Aphidiae). Journal Applied Entomology. 114: 484-490.

Joshi, L., St. Leger, R.J., Bidochka, M.J. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. Federation of European Microbiological Societies. 125: 211-218.

Joshi, L., St, Leger, R.J. and Roberts D.W. 1997. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. An International Journal on Genes and Genomes. 197: 1-8.

Kenneth, R., Wallis, G., Gerson, U. and Plaut, H.N. 1972. Observation and experiments on *Triplosporium floridanum* (entomophthorales) attacking spider mites in Israel. Journal of Invertebrate Pathology. 19: 366-369.

Kerns, D.L. 2000. Mating disruption of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in vegetables by a synthetic pheromone. Crop Protection. 19: 327-334.

Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateman, R., Reynolds, S.E. and Chernley, A.K. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. Journal Invertebrate Pathology. 74: 213-223.

Kucera, M. and Samsinakova, A. 1968. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. Journal Invertebrate Pathology. 12: 316-320.

Lavine, M.D. and Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol. 32: 1295-309.

Lezama, G.R., Rosas Alatorre, R., Bojalil Jaber, L.F., Molina Ochoa, J, Arenas Vargas, M., Gonzalez Ramirez, M., Rebolledo Dominguez, O. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. Vedia Revista Internacional de Control Biologico. 3: 35-39.

Lezama, G.R., Molina. J., López, M., Pescador, A., Galindo, E., Ángel, C.A., Michel, A.C. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. Avances en investigación Agropecuaria. 9: 1-5.

Li, J., Sheng-Hua, Y. and Le-Tian, S. 2010. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 975-984.

Lord, J.C. and Howard R.W. 2004. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia.* 158: 211-217.

Lu, D., Pava-Ripoll. and Li, Z. 2008. Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and cuticle degrading protease. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology.* 81: 515-522.

Maniani, N.K., Odulaja, A., Ekesi, S., Leveissire, C. and Herren, H.R. 2003. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents for tsetse flies. In: Rajeev, K. Upadhyay. (Eds.): *Advances in microbial control of insect pests.* Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. Pp 145-163.

Metcalf, L. 1980. Changing roles insecticides in crop protection. *Annual review of Entomology.* 25: 219-256.

Moino, A. Jr., Alves, B.S., Lops, R.B, Oliveira, P.M., Neves, J., Pereira, M.R., Vieira, S.A. 2002. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Ciencia Agrícola.* 59: 267-273.

Monzón, A. 2001. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).* 63: 95-103.

Moulton, J.K., Pepper, D.A., Dennehy, T.J. 2000. Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest Management Science.* 56: 842-848.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 1984. *Metarhizium anisopliae*. Información Técnica Sobre el Agente de Control Biológico.

- Padilla-Melo, G.N., Bernal-Uribe, M.G., Vélez-Arango, P.E. y Montoya-Restrepo, C. 2000. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafe*. 51: 28-40.
- Palumbo, C.D., Karens, D.L. 1996. MIP en Melon: Suroeste de los EE.UU., Centro del Valle de Yuma. Universidad de Arizona. Yuma, AZ 85364.
- Pangrahi, S. 1993. Bioassay of mycotoxins using terrestrial and aquatic, animal and plant species. *Food and Chemical Toxicology*. 31: 767-790.
- Pearson, A.C. 1982. Biology, population dynamics, and pest status of the beet armyworm (*Spodoptera exigua*) in the Imperial Valley of California. Ph.D. Disertion, University of California, Riverside.
- Paterson, I.C., Charnley, A.K., Cooper, R.M., Clarkson, J.M. 1993. Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Letters*. 109: 323-327.
- Paterson, I.C., Charnley, K., Cooper, R.M., Clarkson, J.M. 1994. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology*. 140: 185-189.
- Peck, D., Castro, F., López, F., Morales, A., y Rodríguez, J. 2001. First records of the sugar cane and forage grass pest, *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), from South America. *Florida Entomologist* 84: 402-409.
- Pinto, F.G.S., Fungaro, M.H.P., Ferreira, J.M., Valderas-Inglis, M.C. and Furlaneto, M. C. 2002. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genetics and Molecular Biology*. 25: 231-234.
- Pramer, D. 1965. Symposium on microbial insecticides III. Fungal parasites of insects and nematodes. *Bacteriol. Rev.* 29: 382-387.

Prieto-Bozano, G. 1999. Digestión química. Fisiología de la absorción. In Hernández-Rodríguez, M., y Sastre-Gallego, A. (Eds.), *Tratado de nutrición*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 297.

Rangel, D.E.N., Alston, D.G. and Roberts, D.W. 2008. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelia growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*. 112: 1355-1361.

Rath, A.C., Anderson, G.C., Worledge, D. and Koen, T.B. 1995. The effect of low temperatures on the virulence of *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) to the subterranean scarab, *Adoryphorous couloni*. *Journal Invertebrate Pathology*. 65: 186-192.

Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem*. 290:205-218.

Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. 1994. Families of serine peptidases. *Methods in Enzymologist*. 244: 19-61.

Reader, U., and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 17-20.

Rizwan-ul-Haq, M., Bo Hu, Q., Ying Hu, M., Shen Lin, Q., Li Zhang, W. 2009. Biological impact of harmaline, ricinine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Pest Science*. 82: 327-334.

Rodríguez del Bosque, L.A y Arredondo Bernal, H.C. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. *Sociedad Mexicana de Control Biológico*. México pp. 2-16.

Rodríguez-Colorado, S.R., Rodríguez-Maciél, J.C., Riestra-Díaz, D., Villanueva-Jiménez, J.A y Rodríguez-Lagunes, D.A. 2002. Influencia de la luz y de aditivos

naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 64: 34-40.

Rodríguez, Ch., J., Castro, V., Morales, R., Peck, C. 2003. Biología del salivazo *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), nueva plaga de gramíneas cultivadas en Colombia. Colombiana de Entomología. 29: 149-155.

Rodriguez, S., Peveling, R., Nagel, P. and Keller, S. 2005. The natural distribution of the entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* in different regions and habitat types in Switzerland. Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. 28: 185-188.

Rosas-Garcia, N., y Villegas-Mendoza, J.M. 2008. Bionomics of a novel species of *Argyrotaenia* (Lepidoptera: Tortricidae) presents in Mexican avocado orchards. Acta Zoológica Mexicana. 24: 129-137.

Rugman, F.R. and Cosstick, R. 1990. Aplastic anemia associated with organochlorine pesticide: case reports and review of evidence. J. Clin. Pathol. 43(2): 98-101.

Sáenz, C., Salazar, D., Rodríguez, A., Alfaro, D. y Oviedo, R. 1999. Manejo integrado del salivazo, *Aenolamia* sp y *Prosapia* sp (Hom: Cercopidae) en las regiones cañeras de Costa Rica. XI Congreso Nacional Agronómico / V Congreso Nacional de Entomología.

Sajap, S.A. and Kaur, K. 1990. Histopathology of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus, infection in the termite, *Coptotermes curvignathus*. Pertanika. 13: 331-334.

Samuels, K,D,Z., Pinnock, D.E and Allosopp, P.G. 1989. The potencial 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.

Sánchez-Peña, S.R., SanJ Uan-Lara, J., Medina, R.F., 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards trips and whiteflies. Journal of Insect Science. 11: 1-10.

Santi, L., Beyes de Silva, W.O., Berger, M., Guimares, J.A., Schrank, A. and Vainstein, M.H. 2010. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*. 55: 874-880.

Screen, S., Bailey, A., Charnley, K. 1997. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Curr Genet*. 31: 511-518.

Shah, F.A., Allen, N., Wright, C.J. and Butt, T.M. 2007. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 276: 60-66.

Sheng, J., An, K., Deng, C., Li, W., Bao, X. and Qiu, D. 2006. Cloning a cuticle-degrading serine protease gene with biological control function from *Beauveria bassiana* and its expression in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*. 53: 124-128.

Shi, W.B., Feng, M.G. 2004. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari:Tetranychidae) with a description of a mite eggs bioassay system. *Biological Control*. 30:165-173.

Shimizu, S., Tsuchitani, Y. and Matsumoto, T. 1993. Serology and substrate specificity of extracellular proteases from four species of entomopathogenic hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 61: 192-195.

Siezen, R.J. and Leunissen, J.A.M. 1997. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science*. 6: 501-523.

Small, N.C.L. and Bidochka, M.J. 2005. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 109: 307-313.

Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1983. Introduction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and Tissue Reserch.* 233: 295-303.

Söderhäll and Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases.* 3-23.

St. Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1509-1517.

St. Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. 1987. Characterization of cuticle degrading proteases produced by the entomophthogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 253:221-232.

St. Leger, R.J., Copper, R.M. and Charnley, A.K. 1991. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomophthogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate pathology.* 58: 415-426.

St. Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W. and Staples, R.C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopatogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. Biochem.* 204: 991-1001.

St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidocha, M., Rizzo, M.J. and Roberts, D.W. 1996a. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl. Environ Microbiol.* 62: 1257-1264.

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

St. Leger, R.J. and Bidochaka, M.J. 1996c. Insect-fungal interaction. In *New Directions in the Invertebrate Immunology* (K. Soderhall, S. Iwanaga and G. Vasta eds): 443-479. New Jersey: SOS publications.

St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. 1996d. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Agricultural Sciences*. 93: 6349-6354.

St. Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 709-713.

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

Studder, J.P., Kaya, H.K. and Duniway, J.M. 1990. Effect of water potential, temperature, and clay-coating on survival of *Beauveria bassiana* conidia in a loam and peat soil. *Journal of Invertebrate Pathology*. 55: 417-427.

Sugimoto, M., Koike, M., Hiyama, N. and Nagao, H. 2003. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 176-187.

Tajick-Ghanbary, M.A., Asgharzadeh, A., Hadizadeh, A.R. and Mohammadi-Sharif, M. 2009. A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. *American Journal of Agricultural Biological Sciences*. 4: 152-155.

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

- Téllez-Jurado, A., Cruz-Ramírez, M.G., Mercado-Flores, Y., Asaff-Torres, A., Arana-Cuenca, A. 2009. Mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. 30: 73-80.
- Thompson, V., y León-González, R. 2005. La identificación y distribución de los salivazos de la caña de azúcar y los pastos (Homoptera: Cercopidae) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 75: 43-51
- Tiago, P.V., Fungaro, M.H.P. and Furlaneto, M.C. 2002. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae flovoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. *Letters in Applied Microbiology*. 34: 91-94.
- Toriello, C., Montoya-Sansón, E., Zavala-Ramírez, M., Navarro-Barranco, H., Basilio-Hernández, D., Hernández-Velázquez, V., Mier, T. 2008. Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Mexicana de Micología*. 28: 57-66.
- Valdez-Salas, B., García-Duran, E.I., Cobo-Rivera, J.M. y López-Padilla, G. 2000. Impacto de los plaguicidas en la salud de los habitantes del valle de Mexicali, México. *Ecol. Lat. Am.* 6: 15-21
- Valerio, J.R., Cardona, C., Peck, D.C., y Sotelo, G. 2001. Spittlebugs: biotechnology, host plant resistance and advances in IMP. pp. 217-221. In proceedings, 19th International Grassland Congress, 11-21 February 2001. Sao Pedro, Fundacao de estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ).
- Urbaneja, A., Van Der Blom, L., Timmer, L.R., Blockmans, K. 2002. Utilización de *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hym.: Braconidae) para el control biológico de orugas (Lep.:Noctuidae) en el manejo integrado de plagas en pimiento bajo invernadero. *Bol.San. Veg. Plagas*. 28: 239-250.
- Visser, S.D. and Hassal, M. 1987. Fungi associated with *Onychiurus subtenuis* (Collembola) in aspen woodland. *Canadian Journal of Botany*. 65: 635-642

- Walstad, J.D., Anderson, R.F. and Stambaugh, W.J. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 16:221-226.
- Wang, C., Typas, M.A. and Butt, T.M. 2002. Detection and characterization of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 213: 251-255.
- Wang, C., Skrobek, A. and Butt, M. 2004. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85: 168-174.
- Wang, C. and St. Leger, R.J. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. 103.6647-6652.
- Wang, C. and St. Leger, R.J. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MED2 adhesin enable attachment to plants. *Eukaryotic Cell*. 6: 808-816.
- Wang, C., Duan, Z. and St. Leger, R.J. 2008. MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*. 7: 302-309.
- Wilding, N. 1973. The survival of entomophthora sp. In mummied aphids at different temperatures and humidity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 21: 309.
- Wösten, H.A.B. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 625-646.
- Xia, Y.X., Clarkson, J.M. and Charnley, A.K. 2002. Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal Invertebrate Pathology*. 80: 139-147.

Yokomi, R.K. and Gottwald, T.R. 1998. Virulence of *Verticillium lecanii* isolates in aphids determined by detached-leaf bioassay. *Journal Invertebrate of Pathology*. 51: 250-258.

Yoshida, S., Yamashita, M., Yonehara, S. and Eguchi, M. 1990. Properties of fungal protease inhibitors from the integument and haemolymph of the silkworm and effect of inhibitor on the fungal growth. *Comp. Biochem. Physio.* 95: 559-564.

Zhang, W., Yueqing. and Yuxian, X. 2008. Cloning of the subtilisin Pr1A gene from a strain of locust specific fungus, *Metarhizium anisopliae*, and functional expression of the protein in *Pichia pastoris*. *Journal Microbiol Biotechnol.* 24: 2481-2488.

Zhang, C. and Yuxian, X. 2009. Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. *Current. Genet.* 55: 399-407.

12.1 Anexo 1. Secuencias de genes *pr1*

>798 *pr1A*

ATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTCCCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTAT
TGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTTCTCACTCCTCATGCTGAGAGCATCATTGCCG
ACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTG
AGCGCTCTTACCTCCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCAGCCTTCCATGGGTTTGCAGG
CTCCCTCACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGCACCCCT
CCCCTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTGACCCGCTGCGCC
ATAGGTTGATTTCAATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCTCACTGAGCAGA
GCGGTGCTCCCTGGGGTCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCCACTAT
CGCTACGATGATAGTGCTGGTGAGGGTACTTGCATATATATCATTGACACTGGTATTGA
GGCCTCCCACCCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTAA
CAATATCATCCAGGAGTTTGAGGGTTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTC
AAGAACTGATGGCCACGGCCATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAGC
TACGGTGTGCCCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGTTCTTGACAACCAGGGCAG
TGGTTCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTGACTCCAAGACCC
GCGGCTGCCCCAAAGGCGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGGCGTCC
GTCAACCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTGAATTCGGGTGTCTTCTTGCCGTCGCGGCTGG
CAACGATAACCGGGATGCCCAGAACACCTCTCCCGCTTCCGAGCCTTCTGCCTGCACTG
TTGGTGCCACTGATTCAAGTGACAGACGATCTTCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTC
GATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAG
TATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAGACAGGCTTTTGCTTCAAGAACAGCTCTAACA
AGGTTTAGAACACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCCATATTGCCGGTCTGGCT
GCCTACCTCAGTGCCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCA
GGACTGCTACCAAGAACGCGCTCTCCAGTGTCCCTCTGGCACTGTCAACTACCTTG
CCTACAACGGCAACGGTGCCTAAATCTTAACTGAGCTGGTC

>798 *pr1B*

CCCGCACCCCGTAAGCTCGTCTTCCCCCTTCCGCACCATCACACACTAAATCCCGCAGC
AATTCGGCGGCCGCGCCCAAACATCAAGTCGTTCGTCAACACAGCCACCGACGGCAAC
GGGCACGGCACCCACCTCGCCGGCGTTATAGGCAGCGCCATCTACGGCGTGGCCAAGAA
GACGAACTCTATGGCGTCAAGTGTCTCGACGACCAAGGCTCAGGCACGACATCCAACG
TCATTGCCGCAATGGACTTTGTTGCCAAAGACGCCAAGACGCGCGGATGCCCCAAGGGG
GCAATGGCCAATATGAGCCTGGGAGGGGGTTACTCTGCGGCGGTGAACAAAGCTGCCGC
TTCTCTTGTGCTCTGGCGTGTGTTGTCTCGGTGGCGGAGATATAGGCAGCGCCATCTA
CGGCGTGGCCAA

>798 pr1C

ACGCGGGGCTCTTGCTCTTTTTCGCAAAGGTCAACAACGCTGTGGCCAAGGGTGCCAAG
TACGTTATTGTTTATAACAATAATGCTGTCGGCGCCATTCCTATGGACCTTACGGGAGT
TCCTGCTGGTTCCATCAAGGCAGCATCGATGATTGACGGCACGACTGGTGCAAAATTCA
TCAATGCTCTCAAGGATGGCAAAAAGCTTACGCTGAAGATGGTGAGCCCTCAGAAGACG
GACTCGGAGGTCAGCACTTCCAACAACACCATTACAGGCGGCGCTCTGAGAA

>798 pr1E

AACATGTAAGCTAGCAAGAGATCTCTACAAACGCAGACCAGTGCCGCATGGGGTCTAAG
AGCTATATCTCACCGAAGTCCGGGAGACTTTTATGAAGGATTTCCGCCTCCTGAAAGCT
CCAAGTACTACTACGATGACAAGGCCGGCGCCGGTACGTTTTCGTATATTTCTTGATGAC
GGTATTCGTACCACCCATGAAGAGTTCGAGGGCCGCGCAAAGTTTGCTCATAGTATCTA
TCCTGCTGATCAAACCTATCTACGGGGATCATGGTACTGGAGTTGCTGGAATTATTGGTA
GCAAGACCTACGGCGTTGCAAAAAAGGCGACTCTTATATCTATACATTTACTAGGACCA
GATGGTTGCACAGGCAGTGAAGCAATCAACGCACTCCTCTGGGCTGCAGAGGATATACT
CAAGAATTCCC GCAAGGATTCGT CAGTTATTAATTTATCCTTTGGGATCCC GAAATTAC
AGGCACTAAATACTTTTGTGGAAGACTGATTACCGACACCG

>798 pr1F

AGATATTGGCAGGATTCAACCACGCTGCCAACGACATTGCGGACAAGGGCCGCAAGAAT
ACTGCCGTGATTAAGTGTCTATGGGATCGGCTTCATCGCAAGCGTTGAAGGTTGCCTA
TGAGAGAGCCCATCATAGAGGTATATTAACCGTCACCAGCGCCGTAATGATGCCCAGA
GCGTTGGTGCAGCATCAGCCAGTTCTGCAAGTGGCTCTATAACGGTTGGATCTATCAAT
CAAGATTGGAGTATTGCGGCCCATTCCAACTACGGTTCTCATGTCACCATTTTTGCCCC
AGAGAA

>798 pr1G

TCGTTTCGATGAGTAATTGTCAAGCTCAAGAAGGGCTGCGCCAAGGCTGCGCTGGACGAT
GCCATGAAGATCATGCCCGGGACGCTGACCAGGTGTTTACTCCATCTTCAAGGGCTT
CACTGGCAGGCTGGACTCTTCTTCGCTCGATGCCCTGCGTGATAACCCCGATGTAGGAC
GGCCGAGGACTCGGAGTTGCATCAAGACTAGGTGCTGACTTCCACAATACAGGTCGACT
ACGTTGAGCAGAACGCCTACTACGAAGCATAACGGCGTACTACCCAGCAACAGGCCCCC
TGGGGTCTTGCTCGACTCTCCACAGACGCCCCGGCGCAAGCGACTACATCTACGACGA
GAGCGCCGGCGAGGGAACATGCGCCTACGTTCGTCGACAGCGGTCTCTACGCCGCACATC
CCGTAAGCACCCCAA

>798 pr1J

ATCGAGTGGAATCAAGGACATTACAGCTAAGCAGATTCAGAACCGGACCGTTGTCAACA
TGTCTTTTGGTAGGTGTGACAGTTTGTCCGTCGTCGCCCGTCAAAGCTCGCATCACTGA
CGATATTCTTTCCCCCAACAGGCGGCGGAAACTCTACTGCCCTGAACAAGATAATAA
AGACTGCGTACGACGCAGGTATTCTGTGCGTCATCTCGTCTGGGAACATGGGTGTGAT
GCCTCAGACTGGTCTCCCGCCTCGTCCCCTGATGGCATCACTGTTGGCGCCATTGATGC
CAACTGGCGGCTATGGGATCACTCCAACCACGGCCCCGTTGTTACATCTTGGCTCCTG
GCGTGGACGTCTTGTCCCTCGCTCCTGGCAATGAGACTAAGACAGGGAGCGGAACTTCT
CAGGCGGCTCCTCATGTTGCTGGGGCTGGCCGA

>798 pr1K

TTCGTTGCCACCCTTACCGAGGACGAGCTCCAGAGGCTCACCGACGACCCCAATGTGAG
TCTTGCGGAAGAGCCCTGTCGTGCTGATACACTCAATGTGCTGACAATAGCTTGGATAG
GTCGACTACATTGAACAGGATGCCATCATGACCATTTATGCCACGCAGCAAAAATGCCGA
CTGGGGATTGGCTCGGCTCTCAAGCCAGAAGCCTGGCACCACGACGTATACTACGATG
ATAGCGCTGGCGAGAGA

>6345 pr1A

ATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTCCCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTAT
TGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCATCATTGCCG
ACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTG
AGCGCTCTTACCTCCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCACGCCTTCCATGGGTTTGCAGG
CTCCCTCACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGCACCCCT
CCCCTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTGACCCGCTGCGCC
ATAGGTTGATTTCAATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCTCACTGAGCAGA
GCGGTGCTCCCTGGGGTCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACTAT
CGCTACGATGATAGTGCTGGTGAGGGTACTTGCGTATATATCATTGACACTGGTATTGA
GGCCTCCCACCCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTAA
CAATATCATCCAGGAGTTTGAGGGTTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGTC
AAGAACTGATGGCCACGGCCATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAGC
TACGGTGTGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGTTCTTGACAACCAGGGCAG
TGGTTCCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTGACTIONCAAGACCC
GCGGCTGCCCAAAGGCGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGGCGTCC
GTCAACCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTGAATTCGGGTGTCTTCTTGCCGTCGCCGCTGG
CAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTTCCGAGCCTTCTGCCTGCACTG
TTGGTGCCACTGATTCAAGTGACAGACGATCTTCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGTC
GATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAG
TATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAGACAGGCTTTTGTTCAGAACCAGCTCTAACA
AGGTTTAGAACACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCCATATTGCCGGTCTGGCT

GCCTACCTCAGTGCGCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCCA
GGACACTGCTACCAAGAACGCGCTCTCCGTGTTCCCTCTGGCACTGTCAACTACCTTGC
CTACAACGGCAACGGTGCCTAAATCTAAAC

>6345 *pr1B*

CGCACCCCGTAAGCTCGTCTTCCCCCTTCCGCACCATCACACACTAAATCCCGCAGCAA
TTCGGCGGCCGCGCCCAAACATCAAGTCGTTTCGTCAACACAGCCACCGACGGCAACGG
GCACGGCACCCACCTCGCCGGCGTTATAGGCAGCGCCATCTACGGCGTGGCCAAGAAGA
CGAAACTCTATGGCGTCAAGTGTCTCGACGACCAAGGCTCAGGCACGACATCCAACGTC
ATTGCCGCAATGGACTTTGTTGCCAAAGACGCCAAGACGCGCGGATGCCCAAGGGGGC
AATGGCCAATATGAGCCTGGGAGGGGGTTACTCTGCGGCGGTGAACAAAGCTGCCGCTT
CTCTTGTTGCCTCTGGCGTGTTTGTCTCGGTGGCGGAGATATAGGCAGCGCCATCTACG
CGTGGCCAAGAAGAC

>6345 *pr1C*

GACGCGGGGCTCTTGCTCTTTTGGCGCAAAGGTCAACAACGCTGTGGCCAAGGGTGCCAA
GTACGTTATTGTTTATAACAATAATGCTGTGCGCGCCATTCCCTATGGACCTTACGGGAG
TTCCTGCTGGTTCATCAAGGCAGCATCGATGATTGACGGCACGACTGGTGCAAAATTC
ATCAATGCTCTCAAGGATGGCAAAAAGCTTACGCTGAAGATGGTGAGCCCTCAGAAGAC
GGACTCGGAGGTGAGCACTTCCAACAACACCATTACAGGCGGCGCTCTGAGAA

>6345 *pr1E*

CATGTAAGCTAGCAAGAGTCTCTACAAACGCAGACCAGTGCCGCATGGGGTCTAAGAGC
TATATCTCACCGAAGTCCGGGAGACTTTTATGAAGGATTTCCGCCTCTGAAAGCTCCA
AGTACTACTACGATGACAAGGCCGGCGCCGGTACGTTTTCGTATATTCTTGATGACGGT
ATTCGTACCACCCATGAAGAGTTCGAGGGCCGCGCAAAGTTTGCTCATAGTATCTATCC
TGCTGATCAAACATCTACGGGGATCATGGTACTGGAGTTGCTGGAATTATTGGTAGCA
AGACCTACGGCGTTGCAAAAAGGCGACTCTTATATCTATAACATTTACTAGGACCAGAT
GGTTGCACAGGCAGTGAAGCAATCAACGCACTCCTCTGGGCTGCAGAGGATATACTCAA
GAATTCCCGCAAGGATTCGTGAGTTATTAATTTATCCTTTGGGATCCCGAAATTACAGG
CACTAAATACTTTTTGTGGAAAGA

>6345 *pr1F*

TTGGCAGGATTCAACCACGCTGCCAACGACATTGCGGACAAGGGCCGCAAGAATACTGC
CGTGATTAAGTGTCTATGGGATCGGCTTCATCGCAAGCGTTGAAGGTTGCCTATGAGA
GAGCCCATCATAGAGGTATATTAACCGTCACCAGCGCCGGTAATGATGCCAGAGCGTT
GGTGCAGCATCAGCCAGTTCTGCAAGTGGCTCTATAACGGTTGGATCTATCAATCAAGA
TTGGAGTATTGCGGCCCATTCCAACACTACGGTTCTCATGTACCATTTTTGCCCCAGAGA

>6345 *prIG*

CCCTCGTTCCGATGAGTACATTGTCAAGCTCAAGAAGGGCTGCGCCAAGGCTGCGCTGG
ACGATGCCATGAAGATCATGCCCCGGGACGCTGACCAGGTGTTTACTCCATCTTCAAG
GGCTTCACTGGCAGGCTGGACTCTTCTTCGCTCGATGCCCTGCGTGATAACCCCGATGT
AGGACGGCCGAGGACTCGGAGTTGCATCAAGACTAGGTGCTGACTTCCACAATACAGGT
CGACTACGTTGAGCAGAACGCCTACTACGAAGCATAACGGCGTGACTACCCAGCAACAGG
CCCCCTGGGGTCTTGCTCGACTCTCCACAGACGCCCCGGCGCAAGCGACTACATCTAC
GACGAGAGCGCCGGCGAGGGAACATGCGCCTACGTTCGTCGACAGCGGTCTCTACGCCG
ACATCCCGTAAGCACCCCA

>6345 *prIJ*

ATCGAGTGGAATCAAGGACATTACAGCTAAGCAGATTCAGAACCGGACCGTTGTCAACA
TGTCTTTTGGTAGGTGTGACAGTTTGTCCGTCGTCGCCCGTCAAAGCTCGCATCACTGA
CGATATTCTTTCCCCCAACAGGCGGCGGAAACTCTACTGCCCTGAACAAGATAATAA
AGACTGCGTACGACGCAGGTATTCTGTGCGTCATCTCGTCTGGGAACATGGGTGTGAT
GCCTCAGACTGGTCTCCCGCCTCGTCCCCTGATGGCATCACTGTTGGCGCCATTGATGC
CAACTGGCGGCTATGGGATCACTCCAACCACGGCCCCGTTGTTACATCTTGGCTCCTG
GCGTGGACGTCTTGTCCCTCGCTCCTGGCAATGAGACTAAGACAGGGAGCGGAACTTCT
CAGGCGGCTCCTCATGTTGCTGGGGCTGGCCGAA

>6347 *prIA*

ATGCATCTGTCTGCTCTTCTCACTCTTCTCCCAGCCGTTCTGGCTGCCCTGCCACTAT
TGGCCGGCGCGCTGAGCCAGCTCCTCTTCACTCCTCAGGCTGAGAGCATCATTGCCG
ACAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGATACGGTG
AGCGCTCTTACCTCCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCACGCCTTCCATGGGTTTGCAGG
CTCCCTCACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGCACCCCT
CCCCTTACCTAGGTAGTCAAAGGAGACATGTAGTTGTTTGTTCCTGGACCCGCTGCGC
CATAGGTTGATTTCAATTGAGAAGGACGCTGTGATGCGTATCAGCGGCCCTCACTGAGCAG
AGCGGTGCTCCCTGGGGTCTTGGGCGCATCTCTCACCGCAATAGGGGAAGCACCACTA
TCGCTACGATGATAGTGCTGGTGAGGGTACTTGCGTATATATCATTGACACTGGTATTG
AGGCCTCCCACCCGTAAGTTGTGCCGCCAAAACCTCCATAGGGCGGAGTAGGAAATTTA
ACAATATCATCCAGGAGTTTGAAGGTCGCGCCACTTTTCTTAGGAGCTTCATCAGCGGT
CAAGAACTGATGGCCACGGCCATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAG
CTACGGTGTGCAAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGTTCTTGACAACCAGGGCA
GTGGTTCTTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCCAGTGACTCCAAGACC
CGCGGCTGCCCCAAAGGCGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTCGGCGTC
CGTCAACCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTGAATTCGGGTGTCTTCTTCCGTCGCCGCTG
GCAACGATAACCGGGATGCCAGAACACCTCTCCCGCTTCCGAGCCTTCTGCCTGCACT
GTTGGTGCCACTGATTCAAGTGACAGACGATCTTCTTCTCCAACCTTCGGCAGAGTTGT

CGATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAA
GTATTGTACCTACCTCGATAAGCTTAGAGACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCTAAC
AAGGTTTAGAACACCATCTCTGGTACCTCCATGGCTACTCCCCATATTGCCGGTCTGGC
TGCCTACCTCAGTGCCTCCAAGGCAAGACTACCCCTGCCGCTCTTTGCAAGAAGATCC
AGGACACTGCTACCAAGAACGC

>6347 pr1B

GACCCCGTAAGCTCGTCTTCCCCCTTCCGCACCATCACACACTAAATCCCGCAGCAATT
CGGCGGCCGCGCCAAAACATCAAGTCGTTTCGTCAACACAGCCACCGACGGCAACGGGC
ACGGCACCCACCTCGCCGGCGTTATAGGCAGCGCCATCTACGGCGTGGCCAAGAAGACG
AAACTCTATGGCGTCAAGTGTCTCGACGACCAAGGCTCAGGCACGACATCCAACGTCAT
TGCCGCAATGGACTTTGTTGCCAAAGACGCCAAGACGCGCGGATGCCCAAGGGGGCAA
TGCCCAATATGAGCCTGGGAGGGGTTACTCTGCGGCGGTGAACAAAGCTGCCGCTTCT
CTTGTTGCCTCTGGCGTGTTTGTCTCGGTGGCGGAGATAAAGGCAGCGCCATCTACGGC
GTGGCCAAGAAGACA

>6347 pr1C

GGCGGGGCTCTTGCTCTTTTGCGCAAAGGTCAACAACGCTGTGGCCAAGGGTGCCAAGT
ACGTTATTGTTTATAACAATAATGCTGTGCGGCCATTCCTATGGACCTTACGGGAGTT
CCTGCTGGTTCATCAAGGCAGCATCGATGATTGACGGCACGACTGGTGCAAAATTCAT
CAATGCTCTCAAGGATGGCAAAAAGCTTACGCTGAAGATGGTGAGCCCTCAGAAGACGG
ACTCGGAGGTCAGCACTTCCAACAACACCATTACTGGCGCCCTCTCTGAGA

>6347 pr1E

TGTAGCTAGCAAGAGTCTCTACAAACGCAGACCAGTGCCGCATGGGGTCTAAGAGCTAT
ATCTCACCGAAGTCCGGGAGACTTTTATGAAGGATTTCCGCCTCCTGAAAGCTCCAAGT
ACTACTACGATGACAAGGCCGGCGCCGGTACGTTTTCGTATATTTCTTGATGACGGTATT
CGTACCACCCATGAAGAGTTCGAGGGCCGCGCAAAGTTTGCTCATAGTATCTATCCTGC
TGATCAAATATCTACGGGGATCATGGTACTGGAGTTGCTGGAATTATTGGTAGCAAGA
CCTACGGCGTTGCAAAAAGGCGACTCTTATATCTATAATTTACTAGGACCAGATGGT
TGCACAGGCAGTGAAGCAATCAACGCACTCCTCTGGGCTGCAGAGGATATACTCAAGAA
TTCCCGCAAGGATTCGTCAGTTATTAATTTATCCTTTGGGATCCCGAAATTACAGGCAC
TAAATACTTTTGTGGAAAGACTGATTACCGACACCG

>6347 pr1F

TTGGCAGGATTCAACCACGCTGCCAACGACATTGCGGACAAGCGGCCGCAAGAATACTG
CCGTGATTAAACGTTCTATGGGATCGGCTTCATCGCAAGCGTTGAAGGTTGCCTATGAG
AGAGCCCATCATAGAGGTATATTAACCGTCACCAGCGCCGGTAATGATGCCAGAGCGT
TGGTGCAGCATCAGCCAGTTCTGCAAGTGGCTCTATAACGGTTGGATCTATCAATCAAG

ATTGGAGTATTGCGGCCCATTCCTCAACTACGGTTCTCATGTCACCATTTTTGCCCCAGAG
AA

>6347 prIG

CCCTCGTTCCGATGAGTACATTGTCAAGCTCAAGAAGGGCTGCGCCAAGGCTGCGCTGG
ACGATGCCATGAAGATCATGCCCCGGGACGCTGACCAGGTGTTTACTCCATCTTCAAG
GGCTTCACTGGCAGGCTGGACTCTTCTTCGCTCGATGCCCTGCGTGATAACCCCGATGT
AGGACGGCCGAGGACTCGGAGTTGCATCAAGACTAGGTGCTGACTTCCACAATACAGGT
CGACTACGTTGAGCAGAACGCCTACTACGAAGCATAACGGCGTGACTACCCAGCAACAGG
CCCCCTGGGGTCTTGCTCGACTCTCCACAGACGCCCGGCGCAAGCGACTACATCTAC
GACGAGAGCGCCGGCGAGGGAACATGCGCCTACGTCGTCGACAGCGGTCTCTACGCCGC
ACATCCCGTAAGCACCCCCAA

> 6347 prIJ

ATCGAGTGGAATCAAGGACATTACAGCTAAGCAGATTCAGAACCGGACCGTTGTCAACA
TGTCTTTTGGTAGGTGTGACAGTTTGTCCGTCGTCGCCCGTCAAAGCTCGCATCACTGA
CGATATTCTTTCCCCCAACAGGCGGCGGAAACTCTACTGCCCTGAACAAGATAATAA
AGACTGCGTACGACGCAGGTATTCTGTGCGTCATCTCGTCTGGGAACATGGGTGTTCGAT
GCCTCAGACTGGTCTCCCGCCTCGTCCCCTGATGGCATCACTGTTGGCGCCATTGATGC
CAACTGGCGGCTATGGGATCACTCCAACCACGGCCCCGTTGTTACATCTTGGCTCCTG
GCGTGGACGTCTTGTCCCTCGCTCCTGGCAATGAGACTAAGACAGGGAGCGGAACTTCT
CAGGCGGCTCCTCATGTTGTGGGGGCTGGCCGA

>6347 prIK

CGGATTCGTTGCCACCCTTACCGAGGACGAGCTCCAGAGGCTCACCGACGACCCCAATG
TGAGTCTTGCGGAAGAGTCCTGTGCTGCTGATACTCAATGTGCTGACAATAGCTTGG
ATAGGTCGACTACATTGAACAGGATGCCATCATGACCATTTATGCCACGCAGCAAAATG
CCGACTGGGGATTGGCTCGGCTCTCAAGCCAGAAGCCTGGCACCACGACGTATACCTAC
GATGATAGCGCTGGCGAGAGAA

12.2 Anexo 2. Secuencias de promotores

>798 *pr1A*

CAATTCTTGTACGTGTGCAGAGAACAAACAGCTTCCATTTCTGGAAGGGTGATGGTTTC
ATATGGAGGCTTCCCTCTCAACCTAGATCGTACTACACATTGGCCTATATGGAGACAAC
TGGACGGCATGTTGTGAATATAAAATGACCTTTCTTCACCGACCTTGAAGTTGGATCTT
TCCTGGATTTCATCCTCATCACGCAAGCTTCAATCCATAAAATCAACTTCGGTTTCTGCC
CAACATCTCTGGTCTTTGGTCCCGTACTAAAATTTGCAATC

>6345 *pr1A*

TGCGCAAAGATAAAAAGGGTTGTACAGCAGCCGAAACCAGGATTTTCTCTGCTTTGGA
AATGACGCAAATGAGACTAAACTGGCATGGACGACAACATCCTGTTTACTTGGCTAGC
TTTTAAGTCAAGGAGGTGTTTACAGAAACCCACCCCTTGTTTTCTTTTTCTCTCTC
TTCCCTTGACGGTCATTCCCTTCAATGTACTTTTCATGCAGTGGAACACGTCCCTGAT
AATCGTCAAGTCTCGTGATATCCGTAGATGGTCACTATGAGGCTTCCCTAGCCTCACAA
AAGCAATCAATGGAGCTTGGCATCGTTATCCCAAGGTTGCATCATCCCTCAGTCCCCGG
ATTCTTGACCCATACTGCTTTCCACGCTAGCATTCAACAAGAAGCTGTTATCAACGCC
GTCACCGACAGAGCCACTTCTAGTGTATTATCATAGGCGCCAAATATTGAGCGTCGATT
CCCGAGATTCGGCCGTTCAAGGCCTTGCTCTACAGCATGTCTAGCTTCGCCGTCACATC
TTGTACGTCTGCAAAGAACAACAGCTTCCAGTTCTGGAAGGTGATGGTTTCAGATGGA
GGCTTCCCTCTCAACCTAGATCGTCTACACATTGGCCTAGATGGAGACAACGAGACGGC
ATCTTTTGAATATAAAATGACCTTTCTTCGCCGCCTTGAAGTTGGATCTTTCTGGATT
CATCCTCATCACGCAAGCTTCAATCCATCAAATCAACTTCGGTTTCTGCCCAACATCTC
TGGTCTTTGGTCCCGTACTAGAAATTTGCAATC

>6347 *pr1A*

CAATCTTGTACGTCTGCAAAGAACAACAGCTTCCAGTTCTGGAAGGTGATGGTTTCAG
ATGGAGGCTTCCCTCTCAACCTAGATCGTCTACACATTGGCCTAGATGGAGACAACGAG
ACGGCATCTTTTGAATATAAAATGACCTTTCTTCGCCGCCTTGAAGTTGGATCTTTCT
GGATTCATCCTCATCACGCAAGCTTCAATCCATCAAATCAACTTCGGTTTCTGCCCAAC
ATCTCTGGTCTTTGGTCCCGTACTAGAAATTTGCAATC

>798 *pr2*

CTTGTCGATCACCCCGTCCGTGCAGACGAGCATGGCGTAGAGTATACGAGCTGGGAACG
CTGTATAACGAAACGATTTTCGCATATAAATACGACTAGTCTTCCAACATGGGAGTTGAC
TTTTGTAACTCTAATAACAAGCTTCTTCATATATTCTTGTCTTTGGATCATCGCCAT
TTCCATCACTACA

>6345 pr2

CGATCACCCCGTCCGTGCAGACGAGCATGGCGTAGAGTATACGAGCTGGGAACGCTGTA
TAACGAAACGATTTTCGCATATAAATACGACTAGTCTTCCAACATGGGAGTTGACTTTTG
TAACTCTAATAACAAGCTTCTTCATATATTCCTTGTCCCTTGGATCATCGCCATTTCCA
TCACTACA

>6345 pr2

GCGAGCTTGTTCGATCACCCCGTCCGTGCAGACGAGCATGGCGTAGAGTATACGAGCTGG
GAACGCTGTATAACGAAACGATTTTCGCATATAAATACGACTAGTCTTCCAACATGGGAG
TTGACTTTTGTAACCTAATAACAAGCTTCTTCATATATTCCTTGTCCCTTGGATCATC
GCCATTTCCATCACTACA

12.3 Anexo 3. Secuencias de gen *pr2*

>798*pr2*

ATGGAGCTCAAGTCCCTATTTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGC
TGCACGACCTGCATCAAATGCAGTGTTTATTGTTGGCGGATCGCCTGCTGAGGCCGGTG
AATCCCCCTTCATCGTCAGCACGTTGCGTAACGGGCGCCATTGGTGCGGCGGTGTCTTG
TTGAACGCCAATACGGTCCTCACCGCGGCTCATTGCGTTCGAGTCACAACCAGCCATCTC
GCAGGTCCGCGCCGGTTCTCTCGTAAGTTGTGTTTGCTTTCTTGTATCAATGGGAGGAT
TGCTGTCCTTTTGACTTCCACTGCCACAACCTCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCC
ATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAATACGAA
GGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCAC
CATCGGCTACGCCACATTGCCAGAGGCGGGCTCAGACCCTGTGGCTGGCGCCGACGCAA
CTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACCAAGCGGCTCGCATAACCCTACGTGTTATTCGGGAG
ATGAAATACTGATTTTTGAACTAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAG
AGTTGCAAAAGGTTACTGTGCCCGTCGTTGATCGTGCGACATGCTCTGCGGCATATCAA
GCGATCCCCAACATGCCGAATGTCACGGACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGG
AGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATAACCGAAACCAGAG
TTCTGATCGGAGTTGTGTCATGGGGTTATAAGTGTGCGGCGCCCAATGCTTATGGAGTC
TATACCAGGCTGGGCGCGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAAGCCGAGAGTCG
GACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGCACCTTTGAGTAGGAGATTTTGC

>6345 *pr2*

ATGGAGCTCAAGTCCCTATTTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGC
TGCACGACCTGCATCAAATGCAGTGTTTATTGTTGGCGGATCGCCTGCTGAGGCCGGTG
AATCCCCCTTCATCGTCAGCACGTTGCGTAACGGGCGCCATTGGTGCGGCGGTGTCTTG
TTGAACGCCAATACGGTCCTCACCGCGGCTCATTGCGTTCGAGTCACAACCAGCCATCTC
GCAGGTCCGCGCCGGTTCTCTCGTAAGTTGTGTTTGCTTTCTTGTATCAATGGGAGGAT
TGCTGTCCTTTTGACTTCCACTGCCACAACCTCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCC
ATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAATACGAA
GGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCAC
CATCGGCTACGCCACATTGCCAGAGGCGGGCTCAGACCCTGTGGCTGGCGCCGACGCAA
CTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACCAAGCGGCTCGCATAACCCTACGTGTTATTCGGGAG
ATGAAATACTGATTTTTGAACTAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAG
AGTTGCAAAAGGTTACTGTGCCCGTCGTTGATCGTGCGACATGCTCTGCGGCATATCAA
GCGATCCCCAACATGCCGAATGTCACGGACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGG
AGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATAACCGAAACCAGAG
TTCTGATCGGAGTTGTGTCATGGGGTTATAAGTGTGCGGCGCCCAATGCTTATGGAGTC

TATACCAGGCTGGGCGGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAAGCCGAGAGTCG
GACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGCACCTTGAGTAGGAGATTTTGCTGCTGA

>6347 pr2

ATGGAGCTCAAGTCCCTATTCGCTGTTTATCTGCCCTTTGTGCGGCTCCCTTGGCTGC
TGCACGACCTGCATCAAATGCAGTGTTTATTGTTGGCGGATCGCCTGCTGAGGCCGGTG
AATTCCTTCATCGTCAGCACGTTGCGTAACGGGCGCCATTGGTGCGGCGGTGTCTTG
TTGAACGCCAATACGGTCCTCACCGCGGCTCATTGCGTCGAGTCACAACCAGCCATCTC
GCAGGTCCGCGCCGGTTCTCTCGTAAGTTGTGTTTGTCTTCTTGTATCAATGGGAGGAT
TGCTGTCTTTTTGACTTCCACTGCCACAACCTCACCTAAAGCTAAAACACACCTAGGCC
ATGCTTCCGGTGGCGTTGTTGCCAATATCTCCTCTATAACCCCCACCCTAAATACGAA
GGTTTGGGATATGACATGGCAATCCTGAAGCTATCAACACCCATCGAGGCGAATGGCAC
CATCGGCTACGCCACATTGCCAGAGGCGGGCTCAGACCCTGTGGCTGGCGCCGACGCAA
CTGTGGCAGGATGGTAAGTATTACCAAGCGGCTCGCATAACCCTACGTGTTATTCTGGGAG
ATGAAATACTGATTTTTGAACTAGGGGAGATCTGGAGTACGCTGGTCAGGCCCCAGAAG
AGTTGCAAAAGGTTACTGTGCCCGTTCGTTGATCGTGCGACATGCTCTGCGGCATATCAA
GCGATCCCCAACATGCCGAATGTCACGGACGCCATGTTCTGTGCTGGTCTTAAGGAAGG
AGGACAAGATGCTTGCAACGGCGATAGTGGTGGCCCCATTATTGATACCGAAACCAGAG
TTCTGATCGGAGTTGTGTCATGGGGTTATAAGTGTGCGGCGCCAATGCTTATGGAGTC
TATACCAGGCTGGGCGGGATATCGAGTTCATCAAGAGCCACTTGTAAGCCGAGAGTCG
GACAGTCATCAGACTTTGAACAAGGGGCACCTTGAGTAGGAGATTTTGCTGCTGA

12.4 Anexo 4. ORF'S

798 Pr1A

LCRQNSIGRSRKFNNIIQEFEGRATFLRSFISGQETDGHG**HGTHCAGTIGSKS**YGVAKKAKLYG
VKVLDNQSGSGSYSGIISGMDYVASDSKTRGCPKGAIASMSLGGGYSASVNOGAAALVNSGVFLA
VAAGNDRDAQNTSPASEPSACTVGATDSSDRRSSFSNFGRVVDIFAPGTGVLSTWIGGSTVSI
VPTSISLETGFCFRTSSNKV

798 Pr1B

QFGGRAQNIKSFVNTATDGN**H**GTHLAGVIGSAIYGVAKKTKLYGVKCLDDQGGTTSNVIAAM
DFVAKDAKTRGCPKGAMANMSLGGGYSAAVNKAAASLVASGVFVSV

798 Pr1C

YVIVYNNNAVGAIPMDLTGVPAGSIKAASMIDGTTGAKFINALKDGGKLTLMVSPQKTDSEVS
TSNNTITGGAL

798 Pr1E

SKRSLQTQTSAAWGLRAISHRSPGDFYEGFPPESSKYYYDDKAGAGTF**AYILDDGIRTTHEEF**
EGRAKFAHSIYPADQTIYGDHGTGAGIIGSKTYGVAKKATLISIHLLGPDGCTGSEAINALLW
AAEDILKNSRKDSSVINLSFGIPKLQALNTFVERLITDT

798 Pr1F

ILAGFNHAANDIADKGRKNTAVINCSMGSSASSQALKVAYERAHHRGILTVTSAGNDAQS
VGAASASSASGSITVGSINQDWSIAAHSNYGSHVTIFAPEX

798 Pr1G

VDYVEQNAYYEAYGVTTQQQAPWGLARLSHRRPGASDYIYDESAGEGTCAYVVDSGLYAAHP

798 Pr1J

GGGNSTALNKIIKTAYDAGILCVISSGNMGVDASDWSPASSPDGITVGAI DANWRLWDHSNHGP
VVHILAPGVDVLSLAPGNETKTGSGTSQAAPHVAG

798 Pr1K

MTIYATQQNADWGLARLSSQKPGTTTTYTYDDSAGER

6345 Pr1A

LCRQNSIGRSRKFNNIIQEFEGRATFLRSFISGQETDGHG**HGTHCAGTIGSKS**YGVAKKAKLYG
VKVLDNQSGSGSYSGIISGMDYVASDSKTRGCPKGAIASMSLGGGYSASVNOGAAALVNSGVFLA
VAAGNDRDAQNTSPASEPSACTVGATDSSDRRSSFSNFGRVVDIFAPGTGVLSTWIGGSTVSI
VPTSISLETGFCFRTSSNKV

6345 Pr1B

QFGGRAQNIKSFVNTATDGNGHGHGTHLAGVIGSAIYGVAKKTKLYGVKCLDDQSGTTSNVIAAM
DFVAKDAKTRGCPKGAMANMSLGGGYSAAVNKAAASLVASGVFVSVVA

6345 Pr1C

YVIVYNNNAVGAIPMDLTGVPAGSIKAASMIDGTTGAKFINALKDGGKLTLMVSPQKTDSEVS
TSNNTITGGAL

6345 Pr1E

QESLQTQTSAAWGLRAISHRSPGDFYEGFPPPESSKYYYDDKAGAGTFAYILDDGIRTTHEEFE
GRAKFAHSIYPADQTIYGDHGTGVAGIIGSKTYGVAKKATLISIHLLGPDGCTGSEAINALLWA
AEDILKNSRKDSSVINLSFGIPKQLALNTF

6345 Pr1F

LAGFNHAANDIADKGRKNTAVINCSMGSASSQALKVAYERAHRGILTVTSAGNDAQSV
GAASASSASGSITVGSINQDWSIAAHSNYGSHVTIFAPEX

6345 Pr1G

VDYVEQNAYYEAYGVTTQQQAPWGLARLSHRRPGASDYIYDESAGEGTCAYVVVDSGLYAAHP

6345 Pr1J

GGGNSTALNKIIKTAYDAGILCVISSGNMGVDASDWSPASSPDGITVGAI DANWRLWDHSNHGP
VVHILAPGVDVLSLAPGNETKTGS GTSQAAPHVAG

6345 Pr1K

MTIYATQQNADWGLARLSSQKPGTTTTYTYDDSAGER

6347 Pr1A

LCRQNSIGRSRKFNIIQEFEGRATFLRSFISGQETDGHGHGTHCAGTIGSKSYGVAKKAKLYG
VKVLDNQSGSYSGIISGMDYVASDSKTRGCPKGAIASMSLGGGYASVNQGAALVNSGVFLA
VAAGNDNRDAQNTSPASEPSACTVGATDSSDRSSFSNFGRVVDIFAPGTGVLSTWIGGSTVSI
VPTSISLETGFCFRTSSNKV

6347 Pr1B

QFGGRAQNIKSFVNTATDGNGHGHGTHLAGVIGSAIYGVAKKTKLYGVKCLDDQSGTTSNV

6347 PR1C

YVIVYNNNAVGAIPMDLTGVPAGSIKAASMIDGTTGAKFINALKDGGKLTLMVSPQKTDSEVS
TSNNTITG

6347 Pr1E

QESLQQTQTSAAWGLRAISHRSPGDFYEGFPPPESSKYYYDDKAGAGTFAYILDDGIRTTHEEFE
GRAKFAHSIYPADQTIYGDHGTGVAGIIGSKTYGVAKKATLISIHLLGPDGCTGSEAINALLWA
AEDILKNSRKDSSVINLSFGIPKLQALNTFVERLITDT

6347 Pr1F

WQDSTTLPTTLRTSGRKNTAVIXRSMGSASSQALKVAYERAHRGILTVTSAGNDAQSV
GAASASSASGSITVGSINQDWSIAAHSNYGSHVTIFAPEX

6347 Pr1G

VDYVEQNAYYEAYGVTTQQQAPWGLARLSHRRPGASDIYDESAGEGTCAYVVDSGLYAAHP

6347 Pr1J

GGNSTALNKIIKTAYDAGILCVISSGNMGVDASDWSPASSPDGITVGAI DANWRLWDHSNHGP
VVHILAPGVDVLSLAPGNETKTGSGTSAAPHVVG

6347 Pr1K

MTIYATQQNADWGLARLSSQKPGTTTTYTYDDSAGER

798 Pr2

MGVDFCNSNNKLLHIFLVLWIIAISITTMELKSLFAVYLPLCAAPLAAARPASNAVFIVGGSPA
EAGEFPFIVSTLRNGRHWCGGVLLNANTVLTAAHCVESQPAISQVRAGSLVSCVCFVSMGGLL
SF

6345 Pr2

MGVDFCNSNNKLLHIFLVLWIIAISITTMELKSLFAVYLPLCAAPLAAARPASNAVFIVGGSPA
EAGEFPFIVSTLRNGRHWCGGVLLNANTVLTAAHCVESQPAISQVRAGSLVSCVCFVSMGGLL
SF

6347 Pr2

MGVDFCNSNNKLLHIFLVLWIIAISITTMELKSLFAVYLPLCAAPLAAARPASNAVFIVGGSPA
EAGEFPFIVSTLRNGRHWCGGVLLNANTVLTAAHCVESQPAISQVRAGSLVSCVCFVSMGGLL
SF