

Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*

Fernando Delgado Blandón*
Yamel López Forero**
Elsa María Giraldo Cardozo***

RESUMEN. Se evaluaron seis aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para cuantificar la actividad catalítica de cinco enzimas y su relación con la patogenicidad sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*). Se utilizaron aislamientos con diferentes grados de patogenicidad, produciendo una variedad de enzimas extracelulares como lipasa, proteasa, fenoloxidasa, B-N-acetilglucosaminidasa (nagasa) y quitinasa que se relacionan con los componentes principales de la cutícula del insecto. En los aislamientos 9205 y 9620 de *B. bassiana* y los aislamientos 9236 y 9303 de *M. anisopliae* se encontró relación directa entre la patogenicidad y la actividad catalítica mayor del 50% de la actividad total para quitina, proteasa y lipasa. Se determinó actividad catalítica máxima para lipasa, proteasa y fenoloxidasa en etapas tempranas del desarrollo del hongo y de nagasa y quitinasa en etapas tardías. Algunos aislamientos presentaron actividad catalítica inferior a 50% de la actividad total evaluada. En otros aislamientos no se encontró relación entre la actividad catalítica y la patogenicidad. Este estudio permite deducir que el mecanismo enzimático es parte de la acción integral del proceso de infección.

Palabras claves: *Hypothenemus hampei*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Enzimas, Actividad específica, Espectrofotometría.

ABSTRACT. Enzymatic activity of fungi and their pathogenicity to *Hypothenemus hampei*. Six pathogenic isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* were evaluated in order to quantify the catalytic activity of five enzymes and their relation to pathogenicity against the coffee berry borer (*H. hampei*). Isolates with different degrees of pathogenicity were used, producing a variety of extracellular enzymes such as lipase, protease, phenoloxidase, B-N-acetylglucosaminidase (nagase) and chitinase that are related to the main components of the insect cuticle. In the 9205 and 9620 isolates of *B. bassiana* and the 9236 and 9303 isolates of *M. anisopliae* a direct relation was found between pathogenicity and catalytic activity greater than 50% of the total activity for chitinase, protease and lipase. The maximum catalytic activity was determined for lipase, protease and phenoloxidase in the early development stages of the fungus and for nagase and chitinase in the late stages. Some isolates showed a catalytic activity of less than 50% of the total activity evaluated. In other isolates a relation was not found between catalytic activity and pathogenicity. This study indicates that the enzymatic mechanism is part of the integral action of the infection process.

Key words: *Hypothenemus hampei*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Enzymes, Specific activity, Spectrophotometry

Introducción

En diversos centros de investigación del mundo se han llevado a cabo estudios relacionados con la biología y patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, los cuales han mostrado gran potencial para el control de plagas en cultivos de importancia económica.

Los entomopatógenos atacan al insecto a través de la cutícula, donde germinan las esporas, produciendo hifas invasoras que penetran los tejidos del hospedante (Castellanos 1997, Paterson *et al.* 1994, Smith *et al.* 1981, St. Leger *et al.* 1986, Zimmerman 1993). Las hifas se ramifican, colonizan y llegan hasta la cavidad

* Centro Nacional de Investigaciones del Café, (Cenicafé) Chinchiná, Caldas, Colombia. Correo electrónico: Fernando.Delgado@cafedecolombia.com

** Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Valle, Colombia.

*** Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé) Chinchiná, Caldas, Colombia.

hemocélica, donde se produce una masa micelial por el crecimiento del hongo, además se liberan toxinas que están implicadas en el proceso de bloquear el desarrollo fisiológico del insecto.

En la literatura se ha indicado la posible relación entre la actividad enzimática de estos hongos y su patogenicidad al insecto sobre el cual se dirige el control. Diversos estudios ultraestructurales e histoquímicos sugieren que en el proceso infectivo del hongo hacia el insecto existe degradación de la cutícula donde se encuentran implicadas varias enzimas (fenoxidasa, proteasa, lipasa, quitinasa y N-acetilglucosaminidasa o nagasa). Algunas partes de la cutícula del insecto son más susceptibles al ataque enzimático producido por los entomopatógenos, siendo importante, no sólo la actividad catalítica del complejo enzimático producido sino también el sitio específico de la acción de las enzimas sobre la cutícula (Castellanos 1997, Paterson *et al.* 1994).

La producción a escala y la obtención de una formulación eficaz de *B. bassiana* y *M. anisopliae* como agentes de control biológico, requiere profundizar en el conocimiento de aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, factores de virulencia y estudios ecoambientales donde los entomopatógenos ejercen su espectro de acción.

Es necesario cuantificar la actividad catalítica de las enzimas producidas por *B. bassiana* y *M. anisopliae* patogénicos a *Hypothenemus hampei* y relacionarla con la patogenicidad como uno de los parámetros a evaluar dentro del mecanismo de infección de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre insectos plaga (Castellanos 1997, Smith *et al.* 1981).

El objetivo de este trabajo fue cuantificar la actividad catalítica de las enzimas proteasa, lipasa, fenoxidasa, nagasa y quitinasa y su relación con la pato-

genicidad de seis aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Materiales y métodos

Aislamientos y medio de cultivo

Se utilizaron aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* provenientes de la micoteca del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), patogénicos a *H. hampei*. Los aislamientos de *B. bassiana* Bb9205 y Bb9620 con patogenicidad > a 90%, Bb9009 y Bb9010 con patogenicidad < al 14%, *M. anisopliae* Ma9236 y Ma9303 con patogenicidad entre el 80 y 90% se reactivaron en medio agar-broca (González *et al.* 1993). Para la preparación del medio de cultivo se licuaron 7,27g de adultos de *H. hampei* en 750 ml de agua, se agregaron 15 g de agar y se esterilizó el medio a 121°C y 15 libras de presión durante 15 min. El medio inoculado con cada uno de los aislamientos se incubó a temperatura ambiente, y la patogenicidad fue clasificada según la escala de Vélez *et al.* (1998) y Padilla (1998): grupo 1=0-25%, grupo 2=26-50%, grupo 3=51-80% y grupo 4=81-100%. (Cuadro 1).

Propagación

La cuantificación de las esporas se llevó a cabo a partir de una solución madre, la cual contenía esporas del hongo en estudio. A esta se le agregó 10 ml de tween 80 al 1% y glicerina al 0,25%. Después de la determinación de la concentración de esporas, se inocularon 1×10^7 esporas en 100 ml de medio líquido de sales basales (solución amortiguadora fosfato 0,1 M, pH 6,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,028 mM, $ZnSO_4$ 0,006199 mM, NaCl $3,4 \times 10^{-2}$ μM y 0,4 g de cutícula de broca), esterilizado por filtración. Una vez inoculado el medio, conteniendo sales basales y cutícula de broca se incubó el sistema bajo agitación rotacional a 2,0 Hz y a temperatura ambiente.

Cuadro 1. Aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* seleccionados para la cuantificación enzimática de acuerdo a su origen, hospedante, patogenicidad y tipo de cultivo.

Código	Origen	Insecto Hospedante		Patogenicidad		Tipo de cultivo
		Orden-Familia	Género-especie	%	Escala	
Bb9205	Colombia	Lepidóptera : Pyralidae	<i>Diatraea saccharalis</i>	94	4	Multiespórico
Bb9009	Colombia	Lepidóptera: Noctuidae	<i>Spodoptera frugiperda</i>	4	1	Multiespórico
Bb9010	Colombia	Coleóptera : Scolytidae	<i>Hypothenemus hampei</i>	14	1	Multiespórico
Ma9236	Colombia	Lepidóptera : Pyralidae	<i>D. saccharalis</i>	88	4	Multiespórico
Bb9620	Colombia	Coleóptera : Scolytidae	<i>H. hampei</i>	> 90	4	Monoespórico
Ma9303	Colombia	Coleóptera : Scolytidae	<i>H. hampei</i>	> 90	4	Monoespórico

Escala de patogenicidad: Grupo 1: 0-25%; Grupo 2: 26-50%; Grupo 3: 51-80%; Grupo 4: 81-100%. Fuente: Vélez *et al.* (1998), Padilla (1998).

Las cutículas de broca usadas en el medio de cultivo se prepararon a partir de insectos adultos lavados con agua destilada estéril, luego se maceraron en un mortero de ágata, y se lavaron con 50 ml de $K_2B_4O_7$ (Tetraborato de potasio) al 1%. Posteriormente, se lavaron dos veces con agua destilada estéril, se secaron a 30°C y se separaron las partes blandas mediante filtración en malla de nailon, luego se esterizaron a 121°C y 15 libras de presión durante 15 min. Se adicionaron 0,4% de cutículas en polvo al medio líquido. En el período de incubación y durante 20 días se evaluó el pH, la germinación y la patogenicidad de los hongos sobre *H. hampei*.

Obtención de los sobrenadantes

De los días 0,75; 3; 5; 7; 9; 12; 15 y 20 se obtuvieron los extractos del medio de cultivo y se filtraron sobre papel "rundfilter" 595 y al vacío, el sobrenadante se centrifugó a 8000 g durante 20 min y se concentró por ultrafiltración sobre membranas de exclusión micropor 100 kDa bajo flujo de N_2 a 4°C. El concentrado se dializó sobre membranas de micropor de 10 kDa para eliminar los compuestos de baja masa molecular. En los sobrenadantes pasados por membranas mayores de 100 kDa se evaluó la actividad de la fenoloxidasa y la nagasa, y en los pasados por membranas menores de 100 kDa la actividad de la lipasa, la proteasa y la quitinasa.

Cuantificación de la actividad enzimática

Se realizó por métodos espectrofotométricos utilizando la ley de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot C \cdot l$) donde (A) es la absorbancia, (ϵ) es el coeficiente de extinción específico del producto formado durante la reacción y (l) la longitud del espesor de la celda utilizada para el paso de la luz a través de la solución. En general, se valoró el cambio de densidad óptica generado por los productos de hidrólisis conjugados con colorantes específicos (Bergmeyer 1984, Segel 1982).

Actividad de la lipasa

Se usaron 100 μ l del extracto del hongo, que se incubó durante 30 min a 37°C en presencia de la sustancia amortiguadora fosfato 0,05M pH 7,0 y p-nitrofenillaureato 0,025M.

La reacción se detuvo con NaOH 0,1M y la mezcla se centrifugó a 11000 g durante 10 min; se registró la liberación del p-nitrofenol a 400 nm en un espectrofotómetro Unicam UV2 y los resultados se expresaron como actividad específica μ mol de producto liberado por hora por mg de la proteína presente en la muestra.

Se cuantificó la cantidad de p-nitrofenol que libera la lipasa del hongo cuando actúa sobre p-nitro-

fenillaureato. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de p-nitrofenillaureato a p-nitrofenol en un min.

El coeficiente de extinción utilizado del p-nitrofenol fue $\epsilon = 18,4 \cdot 10^{-3}/M/cm$ (Colomick y Kaplan 1970).

Actividad de la proteasa

Se mezcló 100 ml del extracto del hongo con 100 μ l de solución de azocaseína 1% (P/V) (para hidrolizar la azocaseína a grupo azo y aminoácidos libres) luego se incubó la mezcla por 30 min a 37 °C en presencia de solución amortiguadora fosfato 0,05 M pH 7,0. La reacción se detuvo con 100 μ l de ácido tricloroacético al 10% y la mezcla se centrifugó a 11000 g durante 10 min. Se registro la liberación del grupo AZO a 340 nm. Los resultados expresados como actividad específica que corresponden a la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de grupo AZO en 1 min utilizando un coeficiente de extinción $\epsilon = 98/M/cm$ (Sigma 1999).

Actividad de la fenoloxidasa

La actividad de la fenoloxidasa se determinó en celdas de poliestireno de 1ml, se incubaron 150 μ l del extracto del hongo, 500 μ l de una solución amortiguadora fosfato 0,1M, pH 6,8, durante 10 min a 30°C. Se disparó la reacción con 350 μ l del sustrato Dopa (Merck) al 0,5%. La reacción fue monitoreada a 480 nm en un espectrómetro Beckman (DU-650).

Para cuantificar la actividad específica se estimó la proteína total y el respectivo coeficiente de extinción para dopaquinona $\epsilon = 3378/M/cm$ (Wahe 1976).

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de Dopa a dopaquinona en un min. Los resultados fueron expresados en actividad específica μ mol de producto liberado / h / mg de proteína presente en la muestra.

Actividad de la nagasa

Para determinar la actividad de la nagasa se utilizaron 100 μ l del extracto del hongo con 500 μ l de solución amortiguadora citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0. Esta mezcla se incubó a 28°C durante 10 min, se disparó la reacción con 400 μ l del sustrato nagasa a una concentración de 1,46 mM. Se realizó un monitoreo continuo a 405 nm durante 10 min.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de nagasa en un min.

El coeficiente de extinción utilizado para el p-nitrofenol fue $\epsilon = 18,4 \cdot 10^{-3}/M/cm$ (Colomick y Kaplan 1970).

Actividad de la quitinasa

Se utilizaron 100 µl de sobrenadante del hongo en reacción con 200 µl de quitina coloidal (5mg/ml en solución amortiguadora acetato de sodio 0,1M pH 5,0). La mezcla se incubó a 50°C por 30 min y la reacción se paró a -15°C. Se adicionó 200 µl de reactivo Somogyi I, 50µl del reactivo Somogyi II y se incubó en baño de agua durante 30 min a 92°C. Se dejaron enfriar los tubos y se le adicionó a cada uno 250 µl de la solución de Nelsón y agua destilada hasta 1 ml. Dieciséis horas después se centrifugaron las muestras contenidas en los tubos, se recogió 1ml del sobrenadante y se leyó a 595 nm.

Se utilizó como blanco 250µl de Somogyi I, 250µl de Somogyi II, 250µl de solución amortiguadora acetato de sodio y 250µl de solución de Nelsón. El coeficiente de extinción de la nagasa reportado fue $= 10/M/cm$ (Reissig *et al.* 1957).

Proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó utilizando el método de Bradford (Bradford 1976). Con estos valores se elaboró la curva correspondiente utilizada como patrón para cuantificar la proteína total presente en los sobrenadantes de los hongos.

Resultados y discusión

El medio líquido de sales basales y cutícula de broca utilizada como fuente de carbono y nitrógeno para la propagación del hongo presentó un pH estable $6,6 \pm 0,2$ y permitió un crecimiento rápido de los hongos con abundante formación de conidias y micelio.

Las observaciones realizadas mediante microscopio óptico y de fluorescencia permitió evidenciar adhesión, muy temprana, de los hongos a los fragmentos de cutícula de *H.hampei* (Fig 1).

La mayor actividad de la lipasa y proteasa se presentó en los extractos de los aislamientos Ma9236 y Ma9303 con una actividad catalítica superior al 50%. Los niveles máximos de actividad lipolítica en los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se presentaron entre los 3 y 5 días, sin evidenciar diferencias significativas entre las dos especies de entomopatógenos (Cuadro 2, Figs. 2 y 3).

En estos aislamientos se encontró la máxima actividad catalítica para proteasas de 0,0992 y 0,1362 µmol de AZO/min.mg de proteína en los aislamientos Bb9620 y Ma9236, respectivamente; lipasas de 0,1390 y 0,1658 µmol de PNP/min.mg de proteína para los aislamientos Ma9303 y Ma9236, respectivamente. En el caso de fenoloxidasa 16,2 y 3,23 µmol/hora.mg de proteína para los aislamientos Bb9010 y Bb9009, respectivamente; nagasa presentó actividad 1,43 µmol/hora.mg de proteína y 1,096 µmol/hora.mg de proteína para Bb9009 y Bb9010; quitinasa presentó actividad catalítica de 38,2 y 22,37mmol/hora.mg de proteína para Bb9205 y Bb9620, respectivamente.

La actividad de la fenoloxidasa mostró niveles variables y se observó que en Bb9205 y Bb9009 se produce alta actividad catalítica durante los primeros días de crecimiento del hongo (Cuadro 2, Fig. 4).

La presencia de componentes fenólicos y oxidasas cuticulares en el integumento del insecto (Andersen 1980) frecuentemente da como resultado melanización alrededor de la hifa penetrante. Dada la conocida susceptibilidad de los microorganismos y sus enzimas a los fenoles, se sugiere que las reacciones de melanización tienen efectos antifúngicos (Charnley 1984). La melanina en la cutícula de insectos puede ofrecer protección fisicoquímica a los componentes cuticulares, protegiéndolos de la degradación enzimática. Una si-

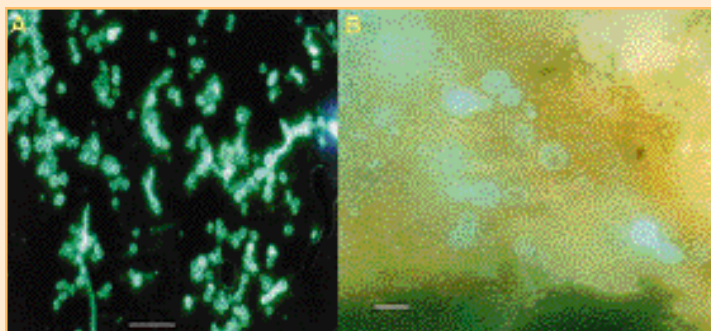


Figura 1. Microfotografías de fluorescencia con "Calcofluor White" mostrando esporas con tubo germinativo de *B. bassiana* (A y B) adheridas a fragmentos de cutícula de broca. Escala de barras (A= 10µm) y (B= 1µm).

Cuadro 2. Máxima actividad enzimática específica en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína y día de resgistro durante los 20 días de observación para los diferentes aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Código	Patogenicidad (%)	Proteasa		Lipasa		Fenoloxidasa		Nagasa		Quitinasa	
		Actividad	Día	Actividad	Día	Actividad	Día	Actividad	Día	Actividad	Día
Bb9009	4	0,01243	3	0,0723	5	3,23	3	1,430	7	16,14	9
Bb9010	14	0,01150	7	0,0963	5	16,2	7	1,096	7	6,31	7
Bb9205	94	0,01856	7	0,1127	3	7,43	0,75	0,188	20	38,29	9
Ma9236	88	0,13621	5	0,1658	5	2,55	3	0,355	3	15,85	3
Bb9620	>90	0,0992	7	0,0938	3	0,61	11	0,498	20	22,37	0,75
Ma9303	>90	0,0980	3	0,1390	5	0,374	0,75	0,129	15	5,30	0,75

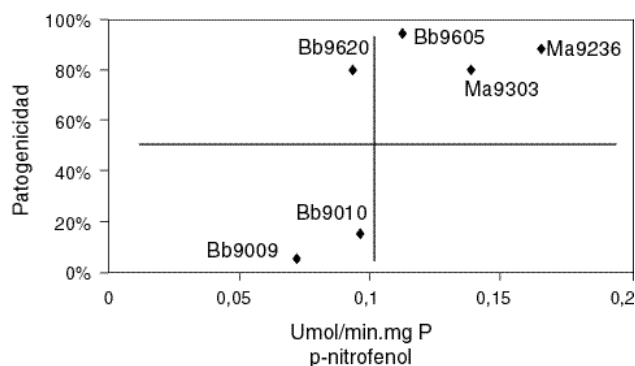


Figura 2. Relación entre la actividad catalítica de la lipasa producida por los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre el sustrato p-Nitrofenillaureato y su patogenicidad sobre *H.hampei*.

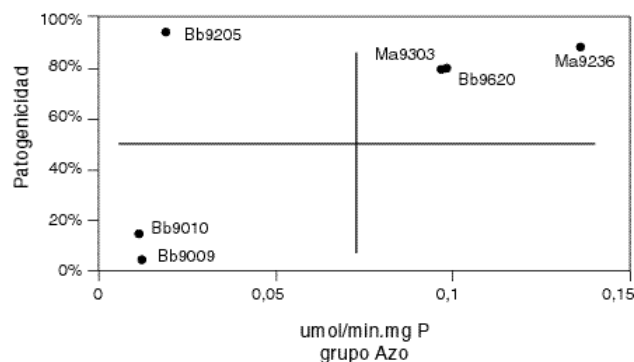


Figura 3. Relación entre la actividad catalítica de la proteasa producida por los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre el sustrato azocaseina y su patogenicidad sobre *H.hampei*.

tuación análoga ocurre en plantas superiores las cuales producen lignina en respuestas a heridas o infección (Ride 1983). Los precursores fenólicos de bajo peso molecular como las quinonas y radicales libres disponibles antes de su polimerización pueden inactivar las enzimas que degradan la pared celular de un gran número de patógenos para plantas (Ride 1983). Es importante conocer si esta situación puede ocurrir en la quitina cuticular de insectos cuando éstos se encuentran en presencia de hongos entomopatógenos.

En las preparaciones del sustrato utilizando cutículas de *H.hampei* no se retiraron los componentes fenólicos, ni sus derivados, los cuales pueden inhibir algunas enzimas (Hoffmann 1963); sin embargo, no hubo evidencia de inhibición en la mayoría de los extractos estudiados y no se encontraron depósitos de pigmentos negros en los sitios de entrada de las hifas o tubos germinativos hacia la cutícula, lo que evidenciaría que quinonas de la cutícula no interfirieron con las estructuras infectivas de los entomopatógenos estudiados.

La actividad de la nagasa fue similar a la determinada en los estudios realizados por otros investi-

gadores y que presentan pesos similares entre 110 y 140 kDa (Kimura 1977, Spindler 1976). La producción de nagasa se encontró después de la de proteasa y lipasa. La actividad de la nagasa más alta se presentó en sobrenadantes pasados por membranas mayores de 100 kDa (Cuadro 2, Fig.5). Los resultados se pueden comparar con actividades máximas reportadas entre un pH 4,3-6,3 (Powning y Irzykiewicz 1964). En otros estudios se realizaron pruebas para demostrar histoquímicamente la presencia de nagasa durante la penetración y crecimiento del hongo sobre la cutícula de *Galleria mellonella* (Pugh *et al.* 1957).

Se determinó alta actividad quitinasa en los extractos menores de 100 kDa, mostrando relación con las encontradas en otros microorganismos. Estas propiedades incluyen un pH óptimo de 5,0-5,5 y también el peso molecular de la quitinasa (33000 daltons) es similar a las enzimas de *Streptomyces*, *Serratia marcescens* (36000) y *Phycomyces blakesleeanus* (30000) (Cohen 1974, Jeuniaux 1963, Lysenko 1976, Unestam 1968) (Cuadro 2 y Fig. 6).

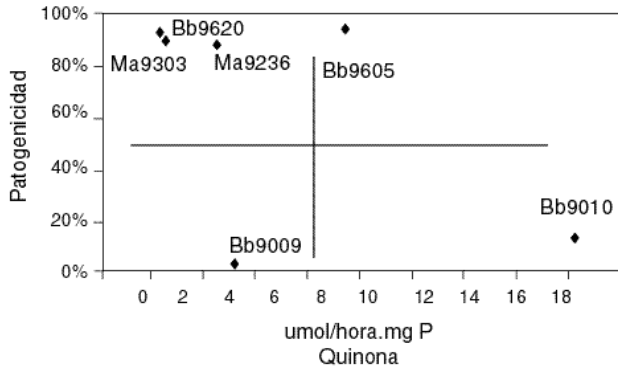


Figura 4. Relación entre la actividad catalítica de la fenoloxidasa producida por los entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre el sustrato DOPA (L-3,4-Dihidroxifenil-alanina) y su patogenicidad sobre *H.hampei*.

Los resultados indican que la lipasa y proteasa tienen un papel importante en los primeros días de contacto del patógeno con el hospedante, participando en la degradación de los lípidos y proteínas de la cutícula, lo cual puede facilitar la penetración del hongo a los tejidos del insecto. Esto coincide con Bidochka y Khachatourians (1990) que señalan que la proteasa es probablemente la enzima más importante en la patogenicidad de un aislamiento.

En la mayoría de los aislamientos, las enzimas aparecieron secuencialmente y mostraron distintas fases de producción. Esto se relaciona con los informes de varios investigadores, posiblemente, porque la cutícula del insecto presenta una capa de proteínas y lípidos que se encuentra cubriendo la capa de quitina. Por lo tanto, el hongo hidroliza los lípidos y proteínas

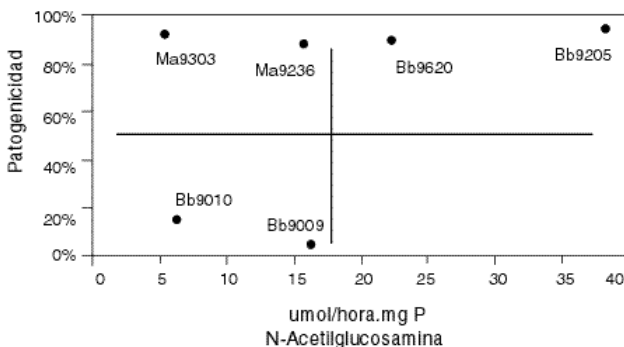


Figura 6. Relación entre la actividad catalítica de la quitinasa producida por los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre el sustrato quitina y su patogenicidad sobre *H. hampei*.

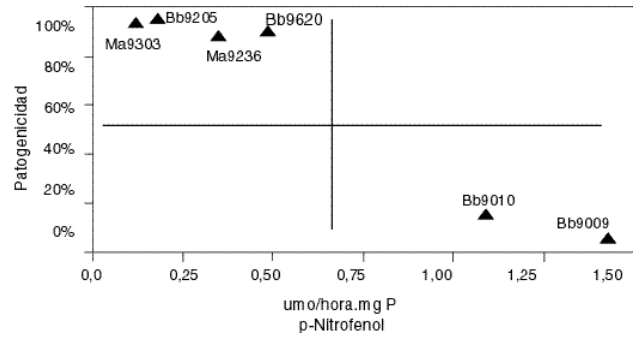


Figura 5. Relación entre la actividad catalítica de nagasa producida por los entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre el sustrato p-Nitrofenil-N Acetil-B-D glucosaminida y su patogenicidad sobre *H. hampei*.

durante los primeros días y queda expuesta la quitina para que actúen enzimas como la nagasa y la quitinasa en etapas tardías, lo cual ratifica que el mecanismo enzimático es parte de la acción integral del proceso de infección.

Se encontró variabilidad en las actividades enzimáticas y éstas difieren entre algunos aislamientos, sugiriendo la presencia de metabolitos secundarios en el medio líquido, esto se debe a la formación de productos finales durante el origen de una reacción enzimática, sufriendo reacciones secundarias entre ellos, con sustratos no reactivos, con proteínas y con otros constituyentes.

Los resultados muestran que existe correlación entre la actividad específica de algunas enzimas producidas por hongos y su patogenicidad, pero no para otras. Esta variación en la actividad enzimática puede ser explicada por diferencias en las tasas de crecimiento, las fases secuenciales en la producción de enzimas de los hongos, lo mismo que en el sustrato empleado debido a la utilización de insectos adultos que presentaron fragmentos esclerotizados e insectos jóvenes que presentaron pocas capas lipídicas y enlaces débiles formados por proteínas y quitina. También la variabilidad genética, la ecología, la fisiología de los hongos, de los insectos y la resistencia de éstos a los entomopatógenos, en conjunto son una de las causas de la variabilidad en la producción enzimática.

La evaluación realizada sirve de base para el estudio de la cinética enzimática de la lipasa, proteasa, fenoloxidasa, nagasa y quitinasa.

Agradecimientos

El presente estudio se realizó gracias al apoyo financiero del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” COLCIENCIAS, la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia a través de su centro de investigaciones CENICAFÉ y la Universidad Católica de Manizales (Caldas).

Literatura citada

- Andersen, SO. 1980. Cuticular sclerotization. *In* Cuticles techniques in arthropods, Miller, TA. Ed. New York, Springer-Verlag.p. 185-217.
- Bergmeyer, HU. 1984. Methods of enzymatic analysis. Enzymes: Peptidase, proteinases and their inhibitors. Weinheim, Verlag Chamie. 340 p.
- Bidochka, MJ; Khachatourians, GG. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factors in pathogenicity towards the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology* 56:362-370.
- Bradford, MA. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* (72):248-254.
- Castellanos, D. 1997. Importancia en la patogenicidad de la acción enzimática del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología* 23 (1-2): 65-71.
- Charnley, AK. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. *In* Invertebrate-Microbial Interactions. British Mycological Society Symposium (6, 1984, London). Anderson, JM; Rayner, ADM; Walton, DWH. Ed. London, Cambridge University Press.p.229-270
- Cohen, RJ. 1974. Some properties of chitinase from *Phycomyces blakesleeanus*. *Life Sciences* 15:289-300.
- Colomick, SP; Kaplan, NO. 1970. Methods in enzymology proteolytic enzymes. Gertrude, E. Ed. New York, Academic Press.v.19.340 p.
- González, MT; Posada, FJ; Bustillo, AE. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *B. bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé (Colombia)* 44(3):93-102.
- Hoffmann-Ostenhof, O. 1963. Enzymes inhibited by quinones. *In* Metabolic Inhibitors. Hochster, RM; Quastel, JH. Eds. New York, Academic Press.p. 145-159.
- Jeuniaux, CH. 1963. Chitine et chitinolyse, un chapitre de la Biologie Moléculaire. Paris, Masson.
- Kimura, S. 1977. Insect haemolymph exo- β -N Acetylglucosaminidase from *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Acta* 446:399-406.
- Lysenko, O. 1976. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *J. Invertebr. Pathol.* 27:385-386.
- Padilla GN. 1998. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* provenientes de diferentes ordenes de insectos. Colombia, Universidad Católica de Manizales. 75 p.
- Paterson, I; Charnley, K; Cooper, R; Clarkson, J. 1994 Specific induction of cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* (140):185-189.
- Powning, RF; Irzykiewicz, H. 1964. β -Acetylglucosaminidase in the cockroach, (*Periplaneta americana*) and in the puff ball (*Lycerdon perlatum*). *Com. Biochem. Physiol.* 12:405-415.
- Pugh, D; Leaback, DH; Walker, PG. 1957. Studies on glucosaminidase, N-acetyl- β -glucosaminidase in rat kidney. *Biochem. J.* 65,464-469.
- Reissig, J; Straminger, J; Leloir, F. 1957. A modified colorimetric method for the estimation of N- acetyl amino sugars. *Journal of Biological Chemistry* 217:959-966
- Ride, JP. 1983. Cell walls and other structural barriers in defense. *In* Biochem. Plant Pathol. Callow, JA. Ed. London, John Wiley.
- Segel, JH. 1982. Cálculos de bioquímica España, Editorial Acribia. 450 p.
- Sigma Technical Service Sigma-techserv@sial.com 1999
- Smith, RJ; Pekrul, S; Grula, EA. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of entomopathogenic hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology* 38:335-344.
- St. Leger, R; Charnley, K; Cooper, RM. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48:85-95
- Spindler, KD. 1976. Initial characterization of chitinase and chitinase from the integument of *Drosophila hydei*. *Insect. Biochem* 6:663-667.
- Unestam, T. 1968. Some properties of unpurified chitinase from the crayfish plaque fungus *Aphanomyces astaci*. *Physiologia Plantarum* 21:137-147.
- Velez, AP; González, MT; Rivera, A; Bernal M, G; Bustillo, A; Estrada, MN. 1998. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* de la colección de hongos entomopatógenos de CENICAFÉ. *In* Congreso SOCOLEN (25, 1998, Cali, Colombia). Resúmenes p. 13
- Wahe, JH. 1976. Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-Quinones. *Analytical biochemistry* 75: 211-218.
- Zimmerman, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science* 37:373-379.