

MEJORAMIENTO DE MICOINSECTICIDAS: UN ENFOQUE DESDE LA INTERACCIÓN ENTRE LA CUTÍCULA DE INSECTOS Y LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Pedrini N. & Juárez M. P.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET CCT La Plata-Universidad Nacional de La Plata. Calles 60 y 120 (1900) La Plata.

E-mail: nicopedrini@yahoo.com; mjuarez@isis.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los insecticidas de contacto, sean químicos, físicos o biológicos, encuentran en la cutícula del insecto hospedador la primera barrera a la penetración. La misma está formada por varias capas, de afuera hacia adentro: la epicutícula, la procutícula y la epidermis. La epicutícula es muy fina (0,1-3 μm) y está constituida por varias laminas, cada una de las cuales posee diferente estructura y propiedades químicas (Juárez & Calderón Fernández 2007). Si bien los componentes mayoritarios de la cutícula son proteínas y quitina (constituida por cadenas organizadas de N-glucosamina), la superficie más externa de la epicutícula está compuesta de una mezcla compleja de lípidos no polares. Predominan hidrocarburos alifáticos (HC) lineales y ramificados de muy largas cadenas (entre 20 y 40 átomos de carbono), alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres de variadas estructuras (Blomquist *et al.* 1987). Su principal función es restringir la pérdida de agua, controlar la absorción de sustancias químicas, la actividad de microorganismos y actuar en procesos de comunicación química inter o intra especies (Juárez 1994; Blomquist 2003). Dada la carencia de grupos reactivos y la alta estabilidad de los HC de insecto, se les atribuye un rol fundamental dentro de las propiedades de barrera de la cutícula antes mencionadas.

Los HC son los constituyentes epicuticulares más ampliamente estudiados, se encuentran en todos los órdenes de insectos y en muchos casos es la fracción lipídica mayoritaria. Los *n*-alcanos se encuentran en casi la totalidad de los más de 100 órdenes analizados (Blomquist & Bagnères 2010), representando más del 90% en algunos coleópteros (Baker *et al.* 1979; Lockey 1985). La longitud de cadena oscila entre 21 y 35 átomos de carbono, predominando las cadenas impares. Los *n*-alquenos predominan fundamentalmente en los órdenes Coleoptera, Diptera e Hymenoptera, se encuentran como mezclas de isómeros y la posición del doble enlace es variable (de Renobales *et al.* 1991; Buckner *et al.* 2009; Martin & Drifjhout 2009; Villaverde *et al.* 2009) así como en termitas (Haverty *et al.* 1988; Kaib *et al.* 2004). La presencia de HC poliinsaturados ha sido escasamente reportada, aunque son componentes mayoritarios en algunos insectos, entre ellos el gorgojo del arroz *Sitophilus* sp. y larvas de *Diatraea saccharalis*, el lepidóptero barrenador de la caña de azúcar (Girotti *et al.* 2012)

con predominio de tri y di alquenos de muy largas cadenas. Los HC metil ramificados son característicos de insectos, siendo los mono y dimetil ramificados los mas abundantes; mientras que los tri y tetrametil derivados se encuentran en cantidades importantes en la mosca tsetse y en algunos triatomos (Nelson & Carlson 1986; Juárez & Blomquist 1993; Juárez *et al.* 2001; Juárez & Calderón Fernández 2007; Calderón Fernández *et al.* 2012).

Interacción entre la cutícula de insectos y los hongos entomopatógenos

Por lo antes expuesto, la cutícula juega un papel protector fundamental ante la presencia de insecticidas de contacto. Más aún, la alteración o eliminación de sus componentes lipídicos hace a los insectos más susceptibles al ataque químico (Juárez 1994). Esta capa lipídica también es clave en la etapa inicial de la infección con hongos entomopatógenos, especialmente en la adhesión de los conidios a la epicutícula, y sería un factor de gran importancia en el éxito de la infección fúngica. La composición de los HC epicuticulares de insectos susceptibles a hongos entomopatógenos se ajusta a la descrita previamente, con predominio de cadenas saturadas lineales y ramificadas (Pedrini *et al.* 2007). Contrariamente, una baja susceptibilidad fúngica coincide con la presencia de hidrocarburos insaturados en *Sitophilus oryzae* o lípidos de corta cadena en el hemíptero *Nezara viridula* o los áfidos. En el artículo de revisión de Pedrini *et al.* (2007) se resume la relación entre de los HC mayoritarios de algunos insectos y su susceptibilidad a los hongos entomopatógenos.

Aunque sin la función estructural antes mencionada, los lípidos constituyentes de las secreciones volátiles de algunos insectos, como es el caso de *Tribolium castaneum* o la cucaracha *Blattella germanica*, le otorgan a los mismos un papel protector a la infección fúngica. En el caso particular de los tenebriónidos *T. castaneum* (Villaverde *et al.* 2007) y *Ulomoides dermestoides* (Villaverde *et al.* 2009), las metil- y etil-1,4-benzoquinonas (BQ), así como su *carrier* 1-pentadeceno (C15:1), son compuestos liberados por ejemplares adultos como secreciones volátiles que causan un efecto irritante y repelente a sus predadores. No se han detectado hasta el momento cepas de hongos entomopatógenos efectivas contra adultos de *T. castaneum*, los índices de mortalidad son menores al 10% cuando se utilizan formulados comerciales a las dosis usualmente útiles para la mayoría de los insectos susceptibles (Akbar *et al.* 2004). Sin embargo, los mismos autores reportan 50% de mortalidad en larvas de *T. castaneum* tratadas en similares condiciones (Akbar *et al.* 2004).

Mejoramiento de micoinsecticidas

1) Hongos adaptados a crecer en hidrocarburos de insecto

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

(Crespo *et al.* 2000; Juárez *et al.* 2000, 2004), además de presentar una diferente composición de lípidos totales, ácidos grasos, HC y compuestos orgánicos volátiles (Crespo *et al.* 2000, 2002, 2008). La oxidación del alcano hasta ácido graso comienza en los microsomas, siguiendo luego con la β -oxidación mediante la inducción de varias enzimas peroxisomales como acil CoA oxidasas y catalasas (Alconada & Juárez 2006; Pedrini *et al.* 2006). Respecto al inicio de la vía, se han identificado 8 genes de citocromo P450 monooxigenasas (CYP) microsomales que se inducen fuertemente en presencia de HC de diferente longitud de cadena y de lípidos cuticulares de insecto (Pedrini *et al.* 2010a). La obtención de cepas mutantes mediante *knockout* dirigido de cada uno de estos genes estableció que uno de ellos (*CYP52X1*) juega un rol predominante en este proceso, mostrando un fenotipo con alteraciones en el crecimiento en lípidos de insecto y una menor virulencia (Zhang *et al.* 2012). Los demás mutantes no produjeron las alteraciones mencionadas, sugiriendo que el solapamiento de sustratos de cada uno de estos genes permitiría compensar la ausencia de un gen en particular (Pedrini *et al.* 2013).

Un aspecto muy interesante desde el punto de vista del control microbiano es que los hongos adaptados a crecer en HC de insecto como única fuente de carbono y energía mostraron una capacidad insecticida aumentada respecto a los crecidos en medios conteniendo glucosa u otros medios ricos. En el caso de insectos plaga de granos almacenados, se obtuvo un aumento significativo en el porcentaje de mortalidad, con independencia de la cepa usada y el HC adicionado al medio de cultivo. En *Acanthoscelides obtectus*, se obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad empleando hongos crecidos en octacosano ($67 \pm 3\%$) respecto a los controles crecidos en glucosa ($43 \pm 3\%$) a los siete días postratamiento, llegando al 100% a los 14 días en hongos adaptados. Similares resultados se consiguieron sobre *Rhyzopertha dominica*, determinándose un mayor porcentaje de mortalidad para los hongos adaptados ($90 \pm 12\%$) respecto a los controles ($42 \pm 7\%$) (Pedrini *et al.* 2011). En el caso de *Triatoma infestans*, el principal vector de la enfermedad de Chagas en Argentina, la virulencia de *B. bassiana* crecida en octacosano se vió incrementada respecto a los controles. Empleando una dosis de 1×10^7 con/ml la mortalidad se incrementó desde $47 \pm 16\%$ (control) hasta $71 \pm 16\%$ (adaptado), mientras que a dosis mayores (por ej., 1×10^9 con/ml) la mortalidad alcanzó el 100% en ambos casos, aunque los hongos adaptados disminuyeron significativamente el tiempo letal medio desde 6,3 días (control) a 5,3 días (adaptado) (Pedrini *et al.* 2009).

2) Hongos que sobreexpresen genes específicos

La eficiencia de los micoinsecticidas también puede ser mejorada por modificación genética, así como por una optimización de la formulación. Actualmente se dispone de múltiples herramientas para el mejoramiento genético de cepas, varios métodos de transformación fueron utilizados para la inserción de genes homólogos o heterólogos en hongos utilizados en control biológico (Valadares-Inglis & Inglis 1997; Inglis *et al.* 2000; Fang *et al.* 2004; Jin *et al.*

2008; Fan *et al.* 2012). La adición y expresión de genes insecticidas en *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* ha sido exitosamente utilizada en el mejoramiento genético de cepas que sobreexpresan proteasas y quitinasas que degradan la cutícula de sus insectos hospedadores, resultando en una disminución en el tiempo de mortalidad (St. Leger *et al.* 1996; Hu & St. Leger 2002; Fang *et al.* 2005, 2009).

En nuestro laboratorio estamos trabajando en el mejoramiento de una cepa de *B. bassiana* mediante la sobreexpresión de un gen codificante para 1,4 benzoquinona reductasa, que sería un factor de virulencia específico contra tenebrionidos secretores de benzoquinonas. Hemos demostrado que estos compuestos inhiben el crecimiento fúngico por lo que serían los responsables de la escasa susceptibilidad de estos coleópteros a los hongos entomopatógenos. Además, si bien las mortalidades de adultos de *T. castaneum* y *U. dermestoides* son bajas, la secreción de estos compuestos se encuentra significativamente disminuida en hongos infectados (Pedrini *et al.* 2010b). Mediante *knockout* específico de este gen comprobamos su función en la degradación de benzoquinonas, obteniendo un fenotipo alterado tanto en la tolerancia a la BQ como a la virulencia frente a *T. castaneum*. Además, la sobreexpresión del mismo por la inserción de copias adicionales de este gen produce un fenotipo que en resultados preliminares duplica el porcentaje de mortalidad de adultos de *T. castaneum*, mientras que no altera la mortalidad de otros coleópteros plaga de granos almacenados (Pedrini, *datos no publicados*).

Micoinsecticidas para el control de insectos vectores de importancia médico-sanitaria

A pesar del avanzado grado de desarrollo a nivel internacional de productos basados en hongos entomopatógenos, incluyendo tanto el aislamiento de cepas nativas con gran potencial de aplicación, como variadas metodologías de formulación y aplicación, en la Argentina todavía estamos lejos de contar con productos comerciales para ser usados en programas de control microbiano tanto en el sector del agro como sanitario. En referencia a este último, en nuestro laboratorio hemos desarrollado una trampa de atracción/infección para el control del vector de la enfermedad de Chagas, la misma contiene conidios de *B. bassiana* y feromonas de agregación de *T. infestans*, (Juárez *et al.* 2008, 2010). Tanto la eficiencia de la trampa como la metodología de aplicación fueron exitosamente probados en ensayos de laboratorio, semicampo (Servicio Nacional de Chagas, Córdoba) y en viviendas ubicadas en zonas con alta infestación de poblaciones de vinchucas resistentes a insecticidas piretroides (Provincia de Salta en Argentina y Departamento de Tarija en Bolivia). En promedio se logró más de un 50% de mortalidad luego de un mes de aplicación de la trampa (Pedrini *et al.* 2009), demostrando también que la diseminación horizontal del hongo es un proceso importante en la mortalidad debido a los hábitos gregarios de estos insectos (Forlani *et al.* 2011).

Pese a los buenos resultados obtenidos, no existe interés de las autoridades sanitarias en su validación a nivel nacional. Se discutirán las posibilidades de desarrollar métodos de control integrado de los insectos vectores de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFÍA

- Akbar, W., Lord, J.C., Nechols, J.R., Howard, R.W.** 2004. Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *J. Econ. Entomol.* 97: 273-280.
- Alconada T.M. & M.P. Juárez.** 2006. Acyl-CoA oxidase activity from *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus. *J. Basic Microbiol.* 46(6): 435-443.
- Baker J.E., D.R. Nelson & C.L. Fatland.** 1979. Developmental changes in cuticular lipids of the black carpet beetle, *Attagenus megatoma*. *Insect Biochem.* 9: 335-339.
- Blomquist G.J.** 2003. Biosynthesis and ecdysteroid regulation of housefly sex pheromone production. En: Blomquist G.J. & R.G. Vogt (Eds.). *Insect pheromone biochemistry & molecular biology*. Elsevier, London. Pp: 231-252.
- Blomquist G.J. & A.G. Bagnères.** 2010. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. En: G.J. Blomquist & A.G. Bagnères (Eds.). *Insect Hydrocarbons, Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. Cambridge Univ. Press, Massachusetts. Pp.: 3-18.
- Blomquist G.J., D.R. Nelson & M. de Renobales.** 1987. Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 6: 227-265.
- Buckner J.S., T.L. Pitts-Singer, C. Guedot, M.M. Hagen et al.** 2009. Cuticular lipids of female solitary bees, *Osmia lignaria* Say and *Megachile rotundata* (F.) (Hymenoptera: Megachilidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 153B: 200-205.
- Calderón-Fernández G.M., J.R. Girotti & M.P. Juárez.** 2012. Cuticular hydrocarbon pattern as a chemotaxonomy marker to assess intraspecific variability in *Triatoma infestans*, a major vector of Chagas' disease. *Med. Vet. Entomol.* 26(2): 201-209.
- Crespo R., M.P. Juárez & L.F.R. Cafferata.** 2000. Biochemical interaction between entomopathogenic fungi and their host-like hydrocarbons. *Mycologia* 92: 528- 536.
- Crespo R., M.P. Juárez, G. Dal Bello, S. Padín et al.** 2002. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl* 47: 685-696.
- Crespo R., N. Pedrini, M.P. Juárez & G. Dal Bello.** 2008. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol. Res.* 163(2): 148-151.
- de Renobales M., D.R. Nelson & G.J. Blomquist.** 1991. Cuticular lipids. En: K. Binnington & A. Retnakaran (Eds.). *Physiology of the Insect Epidermis*. CSIRO, Australia. Pp.: 240-251.
- Fan Y., R.M. Pereira, E. Kilic, G. Casella & N.O. Keyhani.** 2012. Pyrokinin b-Neuropeptide affects necrophoretic behavior in Fire Ants (*S. invicta*), and expression of b-NP in a mycoinsecticide increases its virulence. *PLoS ONE* 7(1): e26924.
- Fang W., Y. Zhang, X. Yang, X. Zheng et al.** 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 18-24.
- Fang W., B. Leng, Y. Xiao, K. Yin et al.** 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 363-370.
- Fang W., J. Feng, Y. Fan, Y. Zhang et al.** 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 102: 155-159.
- Forlani L., N. Pedrini & M.P. Juárez.** 2011. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. *Res. Rep. Trop. Med.* 2: 135-140.
- Girotti J.R., S. Mijailovsky & M.P. Juárez.** 2012. Epicuticular hydrocarbons of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (L.: Crambidae). *Physiol. Entomol.* 37: 266-277.

- Haverty M.I., M. Page, L.J. Nelson & G.J. Blomquist.** 1988. Cuticular hydrocarbons of dampwood termites, *Zootermopsis*: intra- and intercolony variation and potential as taxonomic characters. *J. Chem. Ecol.* 14: 1035–1058.
- Hu G. & R.J. St. Leger.** 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6383–6387.
- Inglis P.W., F.J.L. Aragão, B.P. Frazão, M.C. Magalhães & M.C. Valadares-Inglis.** 2000. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiol. Lett.* 191:249–254.
- Jin K., Y. Zhang, Z. Luo, Y. Xiao et al.** 2008. An improved method for *Beauveria bassiana* transformation using phosphinothricin acetyltransferase and green fluorescent protein fusion gene as a selectable and visible marker. *Biotechnol. Lett.* 30: 1379–1383.
- Juárez M.P.** 1994. Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25: 177–191.
- Juárez M.P. & G.J. Blomquist.** 1993. Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *T. mazzottii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 667–674.
- Juárez M.P. & G. Calderón Fernández.** 2007. Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A: 711–730.
- Juárez M.P., R. Crespo, G. Calderón Fernández, R. Lecouna & L.F.R. Cafferata.** 2000. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas Disease Vector. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 198–207.
- Juárez M.P., G.J. Blomquist & C.J. Schofield.** 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B: 733–746.
- Juárez M.P., N. Pedrini & R. Crespo.** 2004. Mycoinsecticides against Chagas disease vectors: Biochemistry involved in insect host hydrocarbon degradation. En: Mas-Comas S. (Ed.). *Multidisciplinarity for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases.* Monduzzi, Bologna. Pp.: 137–142.
- Juárez M.P., N. Pedrini, J.R. Girotti, S.J. Mijailovsky & A.N. Lorenzo Figueiras.** 2008. Trampa para insectos hematófagos, método de control y método de detección de dichos insectos. Patente P-08102268.
- Juárez M.P., N. Pedrini, J.R. Girotti & S.J. Mijailovsky.** 2010. Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. *Resist. Pest Manag. Newslett.* 19: 59–61.
- Kaib M., P. Jmhasly, L. Wilfert, W. Durka et al.** 2004. Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*. *J. Chem. Ecol.* 30: 365–385.
- Lockey K.H.** 1985. Cuticular hydrocarbons of adults *Eurychora* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 223–227.
- Martin S.J. & F. Drijfhout.** 2009. Nestmate and task cues are influenced and encoded differently within ant cuticular hydrocarbon profiles. *J. Chem. Ecol.* 35: 368–374.
- Napolitano R. & M.P. Juárez.** 1997. Entomopathogenic fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Arch. Biochem. Biophys.* 344: 208–214.
- Nelson D.R. & D.A. Carlson.** 1986. Cuticular hydrocarbons of the tsetse flies *Glossina morsitans morsitans*, *G. austeni* and *G. pallidipes*. *Insect Biochem.* 16: 403–416.
- Pedrini N., M. Juárez, R. Crespo, & M. de Alaniz.** 2006. Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. *Mycologia* 98: 528–534.
- Pedrini N., R. Crespo & M.P. Juárez.** 2007. Biochemistry of the insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.* 146: 124–137.
- Pedrini N., S.J. Mijailovsky, J.R. Girotti, R. Stariolo et al.** 2009. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(5): e434.
- Pedrini N., S. Zhang, M.P. Juárez & N.O. Keyhani.** 2010a. Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* 156: 2549–2557.
- Pedrini N., M.L. Villaverde, C.B. Fusé, G.M. Dal Bello & M.P. Juárez.** 2010b. *Beauveria bassiana* infection alters colony development and defensive secretions of the beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 103: 1094–1099.

- Pedrini N., Dal Bello G., S.B. Padín & M.P. Juárez.** 2011. Capacidad insecticida de *Beauveria bassiana* cultivada en hidrocarburos para el control de coleópteros en granos almacenados. *Agrociencia* 15(1): 64-69.
- Pedrini N., A. Ortiz-Urquiza, C. Huarte-Bonnet & N.O. Keyhani.** 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* 4: 24.
- St. Leger R.J., L. Joshi, M.J. Bidochka & D.W. Roberts.** 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 6349-6354.
- Valadares-Inglis M.C. & P.W. Inglis.** 1997. Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* strain CG423 to benomyl resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 155: 199-202.
- Villaverde M.L., M.P. Juárez & S. Mijailovsky.** 2007. Detection of *Tribolium castaneum* (Herbst) volatile defensive secretions by solid phase microextraction – capillary gas chromatography (SPME–CGC). *J. Stored Prod. Res.* 43: 540–545.
- Villaverde M.L., J.R. Girotti, S. Mijailovsky, N. Pedrini & M.P. Juárez.** 2009. Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle *Ulomoides dermestoides*. *Comp. Biochem. Physiol.* 154B: 381–386.
- Zhang S., E. Widemann, G. Bernard, A. Lesot et al.** 2012. CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Biol. Chem.* 287: 13477-13486.