



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio del efecto de quitinasas
recombinantes como potenciadoras de la
actividad insecticida de un aislamiento de
Beauveria bassiana para el control de
*Diatraea saccharalis***

Yuli Andrea Lovera Sotelo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Bogotá, Colombia
2020

**Estudio del efecto de quitinasas
recombinantes como potenciadoras de la
actividad insecticida de un aislamiento de
Beauveria bassiana para el control de
*Diatraea saccharalis***

Yuli Andrea Lovera Sotelo

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Magíster en Ciencias, Microbiología

Directora:

Gloria Patricia Barrera Cubillos Ph.D.

Codirector:

Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez M.D., Dr.Sc.

Línea de investigación:

Control biológico de insectos plaga

Grupo de Investigación:

Control biológico de plagas agrícolas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2020

***A Cami y Mapi,
mi esposo y mi hija, por creer en mí,
por hacer de esta maestría un proyecto de familia
y por regalarme sus bienes más preciados:
su tiempo y amor.***

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo y comprensión incondicional. En especial a mis padres, por incluirme diariamente en sus oraciones y por hacerme saber que sin importar las circunstancias siempre estaremos juntos.

A la corporación colombiana de investigación agropecuaria AGROSAVIA, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y a la Universidad Nacional de Colombia, por sus recursos físicos y humanos, pero sobre todo por ser entidades comprometidas con el desarrollo de la ciencia, la tecnología y la construcción de conocimiento en el país.

A Gloria, mi mentora, por compartir sus amplios conocimientos sobre la ciencia y la vida conmigo, por mantener siempre una actitud positiva frente al proyecto y por su infinita paciencia.

Al Dr. Manuel Alfonso Patarroyo, por abrirme las puertas de su escuela de formación: la FIDIC y por cada uno de los retos propuestos.

A mis asesores Dr. Mariano Belaich y Dra. Laura Villamizar, por ser parte constructiva de este proceso y por sus aportes en el desarrollo de la investigación.

A Kewin por compartir conmigo sus conocimientos, sus experiencias, su valioso tiempo y ayuda desinteresada. Por sus palabras de aliento, llenas de sabiduría, positivismo y excelente sentido del humor.

A Yoe y Gina. A Yoe por meterme en esta vaca loca y a Gina por arriesgarse conmigo a vivir esta dura, pero productiva experiencia. A las dos, mil gracias por las palabras de aliento en el momento justo, por su amistad incondicional y por creer que era posible.

A la profe Marta Fontanilla, el profe Daniel Uribe y a Soco, infinitas gracias por sus saberes y por las charlas sobre la vida y lo verdaderamente importante en ella.

A todos los muchachos de BIOMOL en la FIDIC, en especial, a Luis Alfredo, Andrés Moreno, Dani y Andrea, brillantes profesionales que me compartieron todo su conocimiento sobre proteínas recombinantes.

A todo el equipo de control biológico en Agrosavia: A los doctores Carlos, Juliana, Sandra y Felipe y a los PAI Gus, Deisy y Diego, pero en especial a Cindy y Lorena García, por sus conocimientos sobre *Beauveria* y *Diatraea*, por su apoyo en el laboratorio, pero indiscutiblemente por cada minuto de su valioso tiempo.

Resumen

Las quitinasas son enzimas hidrolíticas provenientes de diferentes fuentes biológicas. En virus y hongos entomopatógenos, las quitinasas han sido reportadas como importantes factores de virulencia que cortan la estructura de la quitina presente en las dos principales barreras de protección de los insectos: la cutícula y la matriz peritrófica del intestino medio. Con el fin de estudiar el efecto de quitinasas recombinantes en la actividad insecticida de *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Diatraea saccharalis*, en este trabajo se clonaron y expresaron en *E. coli* los marcos abiertos de lectura que codifican para las quitinasas Chit37 y Chit2A provenientes de los aislamientos colombianos Bv062 de *B. bassiana* y VG008 del granulovirus de *Spodoptera frugiperda*, respectivamente. La quitinasa fúngica recombinante (*rChit37*) purificada a partir de la fracción soluble del cultivo de células BL21-DE3, presentó actividad quitinolítica dual de tipo quitobiosidasa y endoquitinasa (EC 3.2.2.14) bajo condiciones óptimas de 45°C y pH 5.0. La *rChit37* purificada potenció la actividad insecticida de *B. bassiana* sobre larvas de segundo instar de *D. saccharalis*; cuando se adicionó a una concentración de 300 µg/mL en una suspensión de 1×10^6 conidios/mL, se evidenció una reducción de 46% y 68% en los tiempos letales (TL₅₀ y TL₉₀) y un incremento de la eficacia en 61%. La proteína viral recombinante (*rChit2A*) presentó un dominio de unión a quitina en su secuencia, sin embargo, no se observó dominio catalítico, lo que se corroboró con la ausencia de actividad enzimática. Los hallazgos de este trabajo proveen una prueba concepto inicial para el estudio de quitinasas recombinantes en el desarrollo de futuras estrategias de potenciación de hongos entomopatógenos con potencial en el control biológico.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, quitinasa, virulencia, *Diatraea saccharalis*, proteína recombinante.

Abstract

Chitinases are hydrolytic enzymes from different biological sources. In viruses and entomopathogenic fungi, chitinases have been reported as important virulence factors that cleave the chitin structure present in the two main protective barriers of insects: the cuticle and the peritrophic matrix of the midgut. In the present work, the open reading frames encoding chitinases Chit37 and Chit2A in the Colombian isolates Bv062 and VG008 of *B. bassiana* and the granulovirus of *Spodoptera frugiperda*, respectively, were cloned and expressed in *E. coli* to study the effect of recombinant chitinases on the insecticidal activity of *Beauveria bassiana* on larvae of *Diatraea saccharalis*. The recombinant fungal chitinase (*rChit37*) purified from the soluble fraction of the BL21-DE3 cell culture, displayed dual chitinolytic activity of the quitobiosidase and endochitinase types (EC 3.2.2.14) under optimal conditions of 45°C and pH 5.0. The purified *rChit37* enhanced the insecticidal activity of *B. bassiana* on second instar larvae of *D. saccharalis*; a reduction of 46% and 68% in lethal times (TL50 and TL90) and an increase in efficacy by 61% was observed when added at a 300 µg/mL concentration in a suspension of 1×10^6 conidia/mL. The recombinant viral protein (*rChit2A*) showed a chitin binding domain in its sequence, however, no catalytic domain was observed, which was in agreement with the lack of enzymatic activity. The findings of this work provide an initial proof of concept for the study of recombinant chitinases in the development of future strategies of entomopathogenic fungal enhancement for biological control.

Key words: *Beauveria bassiana*, chitinase, virulence, *Diatraea saccharalis*, recombinant protein.

Contenido

Resumen	IX
Abstract	X
Contenido	XI
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de abreviaturas	XVII
Introducción	19
1 Marco teórico	23
1.1 Barrenadores del tallo <i>Diatraea</i> spp.....	23
1.1.1 Distribución, morfología y biología de <i>Diatraea saccharalis</i>	23
1.1.2 Daño y control en diferentes cultivos.....	25
1.2 Hongos entomopatógenos.....	29
1.2.1 <i>Beauveria bassiana</i> : Taxonomía, morfología y biología.	29
1.2.2 Ciclo de infección	30
1.2.3 Bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos.....	32
1.3 Quitinasas.....	34
1.3.1 Quitina	34
1.3.2 Clasificación de quitinasas	36
1.3.3 Mecanismo catalítico.....	37
1.3.4 Quitinasas fúngicas.....	38
1.3.5 Quitinasas virales.....	40
1.3.6 Quitinasas en el control biológico de insectos plaga	41
1.4 Proteínas recombinantes.....	42
2 Objetivos	45
2.1 General.....	45
2.2 Específicos	45
3 Materiales y métodos	47
3.1 Material biológico.....	47
3.1.1 Microorganismos.....	47
3.1.2 Insectos.....	47
3.2 Producción y purificación de quitinasas	48

3.2.1	Análisis bioinformático y diseño de cebadores	48
3.2.2	Extracción de ADN genómico.....	49
3.2.3	Amplificación y clonación	49
3.2.4	Expresión en células BL21-DE3.....	51
3.2.5	Extracción de proteínas solubles e insolubles	52
3.2.6	Análisis de expresión por SDS-PAGE y Western blot.....	52
3.2.7	Purificación bajo condiciones solubles y desnaturalizantes	52
3.3	Caracterización enzimática de las proteínas recombinantes.....	53
3.3.1	Determinación de actividad endoquitinasa y exoquitinasa.....	53
3.3.2	Determinación de pH óptimo	54
3.3.3	Determinación de temperatura óptima	54
3.4	Efecto de las quitinasas recombinantes en la actividad insecticida de BV062 sobre larvas de <i>D. saccharalis</i>	55
3.4.1	Preparación de conidios.....	55
3.4.2	Determinación de efecto de quitinasa recombinante en la viabilidad de los conidios de <i>B. bassiana</i> Bv062	55
3.4.3	Ensayos de actividad insecticida sobre larvas de <i>D. saccharalis</i>	56
3.4.4	Análisis estadístico.....	58
4	Resultados y discusión	59
4.1	Caracterización <i>in silico</i>	59
4.1.1	Análisis bioinformático de las quitinasas de SpfrGV VG008	59
4.1.2	Análisis bioinformático de las quitinasas de <i>B. bassiana</i> BV062	64
4.2	Amplificación y clonación de quitinasas	71
4.3	Expresión y purificación de quitinasas	72
4.4	Determinación de actividad enzimática.....	76
4.4.1	<i>rChit2A</i> no presenta actividad quitinasa	76
4.4.2	<i>rChit37</i> se obtuvo funcionalmente activa desde las fracciones soluble e insoluble	78
4.5	Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de <i>rChit37</i>	81
4.5.1	pH óptimo.....	81
4.5.2	Temperatura óptima.....	82
4.6	Efecto del uso de <i>rChit37</i> como aditivo de Bv062.....	84
4.6.1	Comportamiento y signos de infección de Bv062 en larvas de <i>D. saccharalis</i>	84
4.6.2	Efecto de <i>rChit37</i> sobre la viabilidad de los conidios de <i>B. bassiana</i> Bv062.....	87
4.6.3	Efecto de <i>rChit37</i> sobre la actividad insecticida de BV062	91
4.6.4	Efecto de <i>rChit37</i> sobre el tiempo letal de Bv062	96
5	Conclusiones	99
6	Recomendaciones	101
7	Productos de investigación	103
7.1	Artículo publicado en revista especializada.....	103
8	Referencias bibliográficas.....	105
Anexos.....		120

Lista de figuras

Figura 1. Etapas del ciclo de vida de <i>Diatraea saccharalis</i>	25
Figura 2. Daños generados por el barrenador del tallo <i>Diatraea</i> spp. en caña de azúcar.....	26
Figura 3. Parasitoides usados actualmente en Colombia para el control de <i>Diatraea</i> spp.	28
Figura 4. Esquema del proceso de infección de <i>Beauveria bassiana</i>	32
Figura 5. Comparación estructural de la quitina y la celulosa.	35
Figura 6. Tipos de quitina presentes en diferentes estructuras de hongos e insectos.....	35
Figura 7. Mecanismo hidrolítico de las quitinasas según el patrón de escisión.	37
Figura 8. Representación esquemática de la arquitectura de los sitios activos en GH18.....	40
Figura 9. Clonación en <i>pEXP5-CT/TOPO</i>	50
Figura 10. Representación esquemática de los ORF de SpfrGV VG008 que codifican las proteínas Chit1 (A), Chit2A (B), Chit2B (C) y Chit2C (D).....	60
Figura 11 Representación esquemática de los ORF de Bv062 que codifican para Chit66 (A), Chit44 (B) y Chit37 (C).....	65
Figura 12. Alineamiento de secuencias proteicas similares a Chit37 (Bb01_03008).....	70
Figura 13. Amplificación por PCR de ORFs de SpfrGV y Bv062.....	71
Figura 14. PCR colonia.	72
Figura 15. Análisis por Western blot de expresión piloto 4 horas después de inducción.....	73
Figura 16. Efecto de la concentración de IPTG en el nivel de expresión relativa.	74
Figura 17. Extracción y purificación de <i>rChit2A</i> expresada de forma recombinante.	75
Figura 18. Extracción y purificación de <i>rChit37</i> expresada de forma recombinante.	76
Figura 19. Actividad enzimática de <i>rChit2A</i> y <i>rChit37</i>	80
Figura 20. Efecto del pH en la actividad quitinasa de <i>rChit37</i>	82
Figura 21. Efecto de la temperatura en la actividad quitinasas de <i>rChit37</i>	83
Figura 22. Progreso de la infección generada por <i>B. bassiana</i> en larvas de <i>D. saccharalis</i>	86
Figura 23. Evolución del desarrollo del tubo germinal de conidios de Bv062 solos y en mezcla con <i>rChit37</i>	88
Figura 24. Efecto de la <i>rChit37</i> sobre la tasa de germinación.	89
Figura 25. Efecto de la <i>rChit37</i> en la elongación del tubo germinal.	91
Figura 26. Efecto de <i>rChit37</i> en la eficacia de Bv062 sobre <i>D. saccharalis</i>	94
Figura 27. Efecto de <i>rChit37</i> en la mortalidad en el tiempo.....	95

Lista de tablas

Tabla 1. Características de los subgrupos de quitinasas GH18.	39
Tabla 2. Secuencias de cebadores para quitinasas de SpfrGV VG008 y Bv062	49
Tabla 3: Tratamientos de ensayo biológico.	57
Tabla 4. Identidad y similaridad de proteínas de SfGV VG008 con proteínas hipotéticas en otros betabaculovirus	62
Tabla 5. Efecto de <i>rChit37</i> en el tiempo letal de <i>B. bassiana</i>	97

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AGROSAVIA	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
Bv062	Cepa 62 de <i>Beauveria bassiana</i>
CBM	Módulo de unión a carbohidrato
CI	Cuerpos de inclusión
CL ₉₀	Concentración letal 90
C-terminal (CT)	Extremo carboxilo terminal
DO	Densidad óptica
EC	Extracto crudo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
GH	Glucósido hidrolasas
GPI	Anclaje glicosilfosfatidilinositol
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria Bertani
MIP	Manejo integrado de plagas
N terminal (NT)	Extremo amino terminal
NAG	N-acetil-D-glucosamina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTA	Ácido nitrilo triacético
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RBS	Sitio de unión a ribosoma
rChit2A	Proteína recombinante Chit2A de VG008
rChit37	Quitinasa recombinante Chit37 de Bv062
RE	Retículo endoplasmático
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
sg	Subgrupo
SOD	Super Óxido Dismutasa
SP	Peptido señal
TIM	Triosa fosfato isomerasa
TL ₅₀	Tiempo letal medio
TL ₉₀	Tiempo letal 90
VG008	Cepa 8 de granulovirus de <i>Spodoptera frugiperda</i>

Introducción

Los barrenadores del tallo del género *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae) son un complejo de especies distribuidas exclusivamente en el continente americano desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina (G. Vargas, Gómez, & Michaud, 2015). Está conformado por 41 especies, de las cuales *Diatraea saccharalis* es la más ampliamente distribuida (Solis & Metz, 2016). El complejo es considerado como una plaga polífaga, con presencia en 40 especies de gramíneas dentro de las que se encuentran hospederos vegetales de gran importancia en el sector agroindustrial como sorgo, arroz, maíz y caña de azúcar (Francischini et al., 2017; Osorio, 2007).

El comportamiento y los hábitos alimentarios del barrenador son similares en todos los hospederos. Como consecuencia de la apertura de galerías en los tallos, se generan daños indirectos asociados al ingreso de otros agentes patógenos como hongos u otros insectos. Los daños directos, de tipo fisiológico, están relacionados con la limitación en el transporte de fotosintatos (Tarazona, 2011; Vilela et al., 2017), mientras que los de tipo físico se relacionan con volcamientos de las plantas barrenadas debido al debilitamiento de estructuras y la muerte de la yema apical por el consumo de los primeros brotes de la planta (Ardila, 2015; Bustillo, 2013; Cuevas, 2010; Lv, Wilson, Beuzelin, & Reagan, 2010; Rice, 2012).

Aunque los daños generados por el barrenador se traducen en todos los casos en pérdidas del rendimiento y calidad de los productos cosechados, el impacto económico generado por *Diatraea* varía según el tipo de cultivo, su uso, etapa fenológica, condiciones climáticas y prácticas agrícolas. En cultivos de arroz, se ha reportado reducción del rendimiento de las panículas en un 46,1% (Lv, 2008 citado en Lv et al., 2010). En cultivos de maíz de Brasil y Argentina, se afecta la producción en un 21% y 9,6%, respectivamente (Francischini et al., 2017; Serra & Trumper, 2006); en Norteamérica, específicamente *D. grandiosella*, al alimentarse de los tallos, ocasiona pérdidas en rendimiento de 29% y al alimentarse de los granos, de 50 y 75% (Rice, 2012). En Brasil y Colombia las pérdidas por el ataque de

Diatraea en caña de azúcar, reducen el peso de las cañas entre 0,77% y 0,8% t/h, la producción de azúcar entre 0,25% y 0,26% t/h y de alcohol en un 0,20% (Brasil) por cada unidad porcentual de infestación (Francischini et al., 2017; G. A. Vargas & Gómez, 2005; G. A. Vargas & Posada, 2013). En sorgo, *D. saccharalis* ocasiona reducción en el rendimiento de los jugos en 2,62% y del contenido de azúcar en 34%, lo que afecta el sector bioenergético, pues disminuye la producción final de etanol (Vilela et al., 2017).

El control de las poblaciones de *Diatraea* es complejo debido a los hábitos de alimentación críptica, lo que hace el control químico poco viable (Svedese, Lima, & Porto, 2013). Actualmente, las estrategias para el control del barrenador se encuentran dirigidas al uso de métodos combinados entre prácticas culturales en el manejo del cultivo, como uso de variedades resistentes, destrucción de los cultivos poscosecha (Correa et al., 2017; Rice, 2012), mantenimiento de arvenses nectaríferas como alimento para fauna benéfica (Bustillo, 2013) y control biológico con el uso de avispa parasitoides de huevos (*Trichogramma exiguum*) y moscas parasitoides de larvas (*Paratheresia claripalpis*, *Lydella minense* y *Geinea jaynesi*) (Ardila, 2015; Bustillo, 2013; Cuevas, 2010). Sin embargo, estas estrategias de control son susceptibles a variaciones en las condiciones climáticas, prácticas incompatibles en el manejo del cultivo como uso de herbicidas, variedades sembradas y presencia todo el año de cultivos aledaños con susceptibilidad por el barrenador, lo que conlleva a que las poblaciones del insecto fluctúen bajo condiciones específicas, incrementando la infestación de la plaga (Bustillo, 2013; Francischini et al., 2017).

Lo anterior generó la necesidad de explorar nuevas estrategias para contrarrestar la problemática. En el control biológico de artrópodos, una de las alternativas más utilizadas es el uso de hongos entomopatógenos, específicamente de la subdivisión Deuteromicota a la que pertenece *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (Hyphomycetes: Moniliales). Estos microorganismos se caracterizan por crecer rápidamente en condiciones *in vitro*, tener especificidad en la gama de huéspedes que atacan y, a diferencia de otros microorganismos patógenos (virus, bacterias y microsporidios), su modo de acción es por contacto e involucra la penetración directa de la cutícula del hospedero, características que los hacen candidatos favorables para la elaboración de bioplaguicidas (Butt, Coates, Dubovskiy, & Ratcliffe, 2016; Zhao et al., 2016).

El grupo de control biológico de la Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), aisló y evaluó la cepa Bv062 de *B. bassiana* proveniente de una larva de *Diatraea* spp. presente en un cultivo de caña panelera en el departamento de Boyacá. Este microorganismo en condiciones de laboratorio presentó actividad patogénica contra diferentes especies del complejo del barrenador, con una eficacia superior al 70% sobre larvas de *D. saccharalis* y *D. indigenella*, y mortalidad mayor al 80% sobre huevos de *D. saccharalis* (García et al., 2018). Estos resultados revelan el potencial del aislamiento nativo como agente de control biológico y su posible uso en la producción de un futuro bioplaguicida contra diferentes especies y estadios del complejo *Diatraea*, para incluirse en futuros programas de manejo integrado de plagas (MIP).

A pesar de las ventajas de los hongos entomopatógenos como biocontroladores, estos presentan algunas limitaciones que han obstaculizado su implementación en programas de MIP como: la necesidad de una elevada cantidad de propágulo para generar una tasa de mortalidad eficiente y un largo periodo inicial de latencia, necesario para el establecimiento de la infección; tiempo durante el cual los insectos pueden generar graves daños en los cultivos (Fan, Fang, et al., 2007; St Leger & Screen, 2001). En este sentido, es interesante buscar estrategias que permitan potenciar el efecto insecticida, mejorar el tiempo de acción y disminuir la concentración de inóculo.

Actualmente existen diversas estrategias dirigidas a incrementar la eficacia y virulencia de los microorganismos utilizados en el control biológico, las cuales van desde el uso de organismos genéticamente modificados (Xiao et al., 2012), pasando por el uso de mezclas de distintos organismos entomopatógenos con actividad sinérgica y el uso de metabolitos secundarios microbianos como aditivos en las formulaciones (Shternshis, 2004). Dichas estrategias están basadas en la identificación y aprovechamiento de factores de virulencia. En el caso específico de los hongos entomopatógenos, se destacan las quitinasas, enzimas hidrolíticas que juegan un papel fundamental en la degradación de la quitina que compone la cutícula del insecto, permitiendo el ingreso del hongo hacia el hemocele y su consiguiente colonización (Butt et al., 2016; Ortiz & Keyhani, 2016; Valero, Wieggers, Zwaan, Koenraadt, & van Kan, 2016; Xiao et al., 2012; Zhao et al., 2016).

Diversos estudios en genes que codifican para quitinasas han sido utilizados en cepas modificadas que sobre-expresan la proteína, mostrando aumento en la virulencia contra el hospedero (Fan, Fang, et al., 2007; Fang et al., 2005). Así mismo, Shternshis (2004) reporta

diferentes estudios en los que se demuestra que quitinasas exógenas, al ser utilizadas en conjunto con *B. thuringiensis*, el nucleopolihedrovirus de *M. brassicae* y los granulovirus de *P. sticticalis* y *C. pomonella*, incrementan su actividad insecticida, sugiriendo que la adición en formulaciones de bajas concentraciones de quitinasa puede reducir la dosis necesaria de algunos entomopatógenos. Adicionalmente, diferentes quitinasas han sido producidas de forma recombinante en diferentes sistemas de expresión, obteniéndose mayor rendimiento de recuperación en comparación con las liberadas al medio de cultivo, directamente por los organismos entomopatógenos (Fan, Zhang, et al., 2007; Rao et al., 2004; Yang et al., 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior, la propuesta del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de quitinasas recombinantes sobre la actividad insecticida del aislamiento colombiano BV062 de *Beauveria bassiana* para el control de *D. saccharalis*. Para lograr lo propuesto, con base en los genomas secuenciados de la cepa Bv062 de *B. bassiana* (García et al., 2018) y el aislamiento VG008 de granulovirus de *Spodoptera frugiperda* SpfrGV (Cuartas et al., 2015)), se seleccionaron dos quitinasas. Las proteínas se expresaron en *E. coli* de forma insoluble (cuerpos de inclusión) y soluble, y se determinó el tipo de actividad hidrolítica a las proteínas purificadas. Además, se evaluó su efecto en la actividad insecticida de Bv062 en ensayos biológicos sobre larvas de segundo instar de *D. saccharalis*. Los hallazgos de esta tesis permitirán avanzar en la exploración de alternativas de mejoramiento de bioplaguicidas, que posibiliten la producción de aditivos con actividad potenciadora para la formulación de futuros bioplaguicidas para el control de *Diatraea saccharalis*.

1 Marco teórico

1.1 Barrenadores del tallo *Diatraea* spp.

Los barrenadores del tallo están constituidos por un grupo de insectos pertenecientes a 41 especies diferentes del género *Diatraea* (Guilting) (Lepidoptera: Crambidae), dentro de las que *D. saccharalis* es la más ampliamente distribuida (Solis & Metz, 2016). Son plagas con importancia a nivel agroindustrial, debido a las pérdidas económicas que ocasionan en diferentes cultivos de gramíneas, principalmente caña de azúcar, sorgo, arroz y maíz. Su distribución esta confinada al continente americano, desde el sur de los Estados Unidos, pasando por Centroamérica, el caribe y Suramérica (Francischini et al., 2017; G. Vargas et al., 2015).

1.1.1 Distribución, morfología y biología de *Diatraea saccharalis*

Diatraea saccharalis (Fabricius) es un insecto perteneciente al orden Lepidóptera y la familia Crambidae (Joyce et al., 2014). Dentro de las especies que conforman el complejo de barrenadores, es la que presenta mayor distribución a lo largo del continente, con presencia en Norteamérica en 6 estados del sur de Estados Unidos, México, todos los países de Centroamérica, el caribe y Suramérica, con excepción de Las Bahamas y Chile (Solis & Metz, 2016). *D. saccharalis* es una especie introducida en Estados Unidos, fue reportada por primera vez en Louisiana, alrededor de la década de 1850, desde donde se extendió hacia otros estados como Florida y Texas (Joyce et al., 2014). En Colombia, el primer reporte de esta especie data de 1938 en cultivos de caña de azúcar para la producción de panela, época que coincide con el inicio del cultivo en el país (Bustillo, 2013); actualmente también se reporta en cultivos de arroz (Ardila, 2015; Cuevas, 2010). Su presencia en países como Brasil, Perú, Argentina y Cuba, por mencionar algunos ejemplos, ha sido reportada en cultivos de caña de azúcar, sorgo y maíz (Aday, Barroso, & Izquierdo,

2003; Francischini et al., 2017; Licerias, Valladares, Reyna, & Escuadra, 2007; Serra & Trumper, 2006).

El ciclo de vida de este insecto es holometábolo, tiene una duración promedio de 40-45 días, inicia con la postura de huevos en grupos de hasta 30 unidades (Figura 1A), sobre el haz y envés de las hojas; inicialmente, éstos son de color crema y se tornan amarillo oscuro cuando se acercan a la eclosión; la duración de la fase varía dependiendo de la temperatura de incubación, siendo corta a temperaturas cálidas (de 4- 5 días) y larga a temperaturas bajas (6-16 días). La fase larval es la más larga de todo el ciclo y puede prolongarse hasta por 25 días con aproximadamente 6 estadios (Capinera, 2001). Las larvas son de color blanco cremoso con cápsula cefálica café oscuro (Figura 1B), su tamaño varía entre 2,5 y 3 cm de longitud (Osorio, 2007). Durante esta fase, las larvas neonatas se alimentan inicialmente de los tejidos vegetales de las hojas y, a partir del segundo instar, comienzan a desplazarse hacia los tallos; a partir del tercer estadio perforan los tallos, generalmente en entre nudos inmaduros y continúan su proceso de desarrollo en el interior (G. Vargas et al., 2015). La pupación ocurre dentro de las galerías que genera la larva al interior de los tallos; las pupas son alargadas, varían su coloración con el tiempo, siendo inicialmente amarillas y a medida que avanzan en edad se tornan café oscuro. A diferencia de otras especies de *Diatraea*, las pupas de *D. saccharalis* se caracterizan por tener proyecciones en forma de cuernos puntiagudos (Figura 1C); miden entre 16 y 20 mm de longitud, siendo de mayor tamaño en hembras y su duración es generalmente entre 8 y 9 días (Capinera, 2001; Licerias et al., 2007). Los adultos emergen como polillas, caracterizadas por su coloración habana y por tener alas delanteras más oscuras que las traseras (Figura 1D). Los adultos presentan dimorfismo sexual marcado; generalmente se ha observado que los machos son ligeramente más oscuros y pequeños, también presentan un abdomen menos abultado y ancho que las hembras (Licerias et al., 2007; Osorio, 2007). Las polillas de *D. saccharalis*, viven entre 5 y 10 días, son de hábitos nocturnos, su apareamiento ocurre en la oscuridad y las hembras pueden ovipositar entre 250 y 700 huevos (G. Vargas et al., 2015).

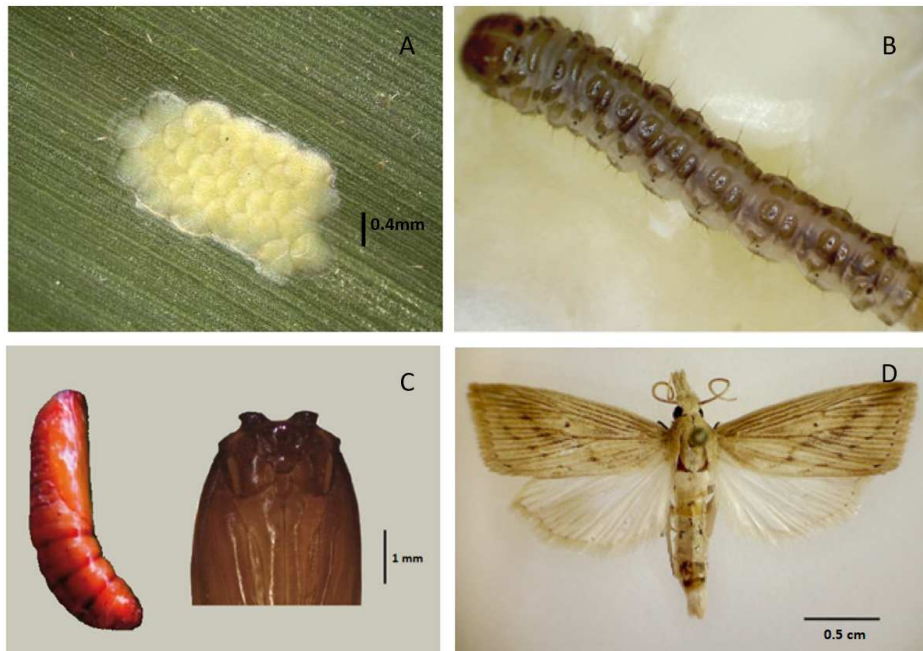


Figura 1. Etapas del ciclo de vida de *Diatraea saccharalis*. A) Huevos. B) Larva. C) Pupa y cuernos cefálicos. D) Macho adulto. Imágenes tomadas y adaptadas de (Gómez & Vargas, 2014; G. Vargas et al., 2015).

1.1.2 Daño y control en diferentes cultivos

El comportamiento y los hábitos alimentarios del barrenador son similares en todos los hospederos (Figura 2). Como consecuencia de la apertura de galerías en los tallos, se generan daños directos, de tipo fisiológico, relacionados con la limitación en el transporte de fotosintatos, lo que ocasiona reducción en la calidad y cantidad de los jugos utilizados para la producción de etanol y azúcar en cultivos de sorgo y caña de azúcar, respectivamente (Tarazona, 2011; Vilela et al., 2017), y de tipo físico como el llamado corazón muerto (Figura 2A) en cultivos de arroz, caña de azúcar y maíz, debido al daño generado en la yema apical (Ardila, 2015; Bustillo, 2013; Cuevas, 2010; Lv et al., 2010; Rice, 2012). También se generan daños indirectos asociados al ingreso de otros agentes patógenos. Por ejemplo, en caña de azúcar y sorgo, la contaminación de los jugos por *C. falcatum* y *Fusarium* está asociada a la presencia de tallos barrenados por *D. saccharalis* (Figura 2B y 2C), generando inversión de azúcares e inhibiendo la fermentación alcohólica (Aday et al., 2003; Vilela et al., 2017).

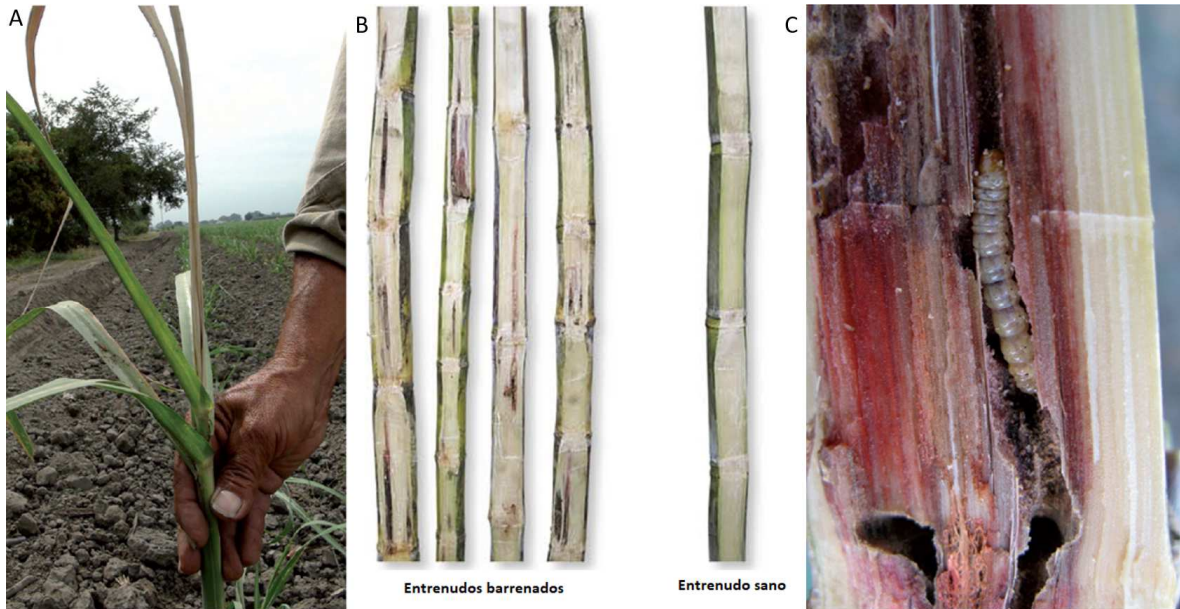


Figura 2. Daños generados por el barrenador del tallo *Diatraea* spp. en caña de azúcar. A) Síntoma de “corazón muerto”. B) diferencias en entrenudos barrenados por *Diatraea* spp. y sanos. C) Presencia de *Diatraea* spp. en entrenudo de caña barrenada. Fotos tomadas de (G. A. Vargas & Gómez, 2005; G. Vargas et al., 2015)

El impacto económico generado por *Diatraea* varía según el tipo de cultivo, su uso, etapa fenológica, condiciones climáticas y prácticas agrícolas. En cultivos de arroz, para el caso de Colombia, *D. saccharalis* es la segunda causa de reducción de rendimiento (Cuevas, 2010); en Louisiana, el barrenador destruyó más del 70% de los cultivos infestados en el 2002 (B. Castro, Riley, Leonard, & Baldwin, 2004) y se reportó reducción del rendimiento de las panículas en un 46,1% (Lv, 2008 citado en Lv et al., 2010). En cultivos de maíz de Brasil y Argentina, se reduce la producción en un 21% y 9,6%, respectivamente (Francischini et al., 2017; Serra & Trumper, 2006); en Norteamérica, específicamente *D. grandiosella*, al alimentarse de los tallos, ocasiona pérdidas en rendimiento de 29% y al alimentarse de los granos de entre 50 y 75% (Rice, 2012).

En Brasil y Colombia las pérdidas por el ataque de *Diatraea* en caña de azúcar, reducen el peso de las cañas entre 0,77% - 0,8% t/h, la producción de azúcar entre 0,25% y 0,26% t/h y de alcohol en un 0,20% (Brasil) por cada unidad porcentual de infestación (Francischini et al., 2017; G. A. Vargas & Gómez, 2005; G. A. Vargas & Posada, 2013). En la provincia de Villa Clara en Cuba, entre los periodos 1991-1992 y 1997-1998, las pérdidas económicas alcanzaron los \$19'646.989 dólares (U.S.D) (Aday et al., 2003). De modo similar, para el

año 2011 en el departamento de Santander en Colombia, se reportaron pérdidas de \$2'475.200 por hectárea, debido a que para ese año el porcentaje de intensidad de infestación fue del 14%, en cultivos de caña para la producción de panela (ICA, 2011b). Por otro lado, el sector bioenergético brasilero, se ve afectado en la producción final de etanol debido a las infestaciones de *D. saccharalis*; en cultivos de sorgo con una intensidad de infestación de 4,1%, se redujo el rendimiento de los jugos en 2,62% y el contenido de azúcar en 34% (Vilela et al., 2017).

El control químico de las poblaciones de *Diatraea* spp. es poco viable debido a los hábitos de alimentación criptica del insecto, haciendo que la mayor parte del ciclo de vida permanezca al interior de la planta y a la presencia en lotes aledaños de cultivos permanentes con susceptibilidad por el barrenador, generando un flujo permanente de poblaciones de la plaga (Cuevas, 2010; Francischini et al., 2017; Svedese et al., 2013). En diferentes cultivos, el manejo de las poblaciones del barrenador se realiza a través de estrategias relacionadas con prácticas de manejo. Por ejemplo, prácticas culturales como el mantenimiento de arvenses nectaríferas en cultivos de caña de azúcar, como fuente de alimento para la fauna benéfica (Bustillo, 2013), destrucción poscosecha de material vegetal con el fin de reducir reinfestaciones y adelanto de las fechas de siembra en cultivos de maíz, con el fin de reducir la supervivencia de la plaga durante el invierno (Rice, 2012). Otra estrategia de control, es el uso de variedades de arroz, con características genotípicas resistentes a *D. saccharalis* o de variedades mejoradas, como maíz Bt y el control etológico de los adultos, con el uso de trampas de feromonas (Correa et al., 2017; Cuevas, 2010; Rice, 2012).

El control biológico a través del uso de enemigos naturales (Figura 3), dentro de los que se destaca el uso de avispas como *Trichogramma exiguum*, parasitoides de huevos y moscas, como *Paratheresia claripalpis*, *Lydella minense* y *Geinea jaynesi*, parasitoides de larvas, son usados en cultivos de caña de azúcar y arroz (Ardila, 2015; Bustillo, 2013; Cuevas, 2010). El uso de parasitoides puede reducir hasta en un 65% el nivel de daño producido por *D. saccharalis* en caña de azúcar (Bustillo, 2013; Osorio, 2007; Tarazona, 2011; G. A. Vargas & Gómez, 2005). Sin embargo, la presencia de estos controladores se ve afectada por diferentes factores que ocasionan fluctuaciones en las poblaciones tanto de controladores, como de la plaga. Es así como variaciones en las condiciones climáticas, generan incrementos de las poblaciones del barrenador, por ejemplo, en la temporada

invernal, el porcentaje de infestación incrementa hasta en un 80%, debido al aumento de la humedad relativa, lo que propicia la postura de huevos de *Diatraea* y la disminución de la floración de arvenses nectaríferas de las que se alimentan los parasitoides a causa de las fuertes lluvias o a temporadas secas prolongadas; de modo similar, el uso de herbicidas para el control de malezas disminuye las poblaciones de arvenses y, por consiguiente, de los controladores (Bustillo, 2013; ICA, 2011b; Tarazona, 2011).

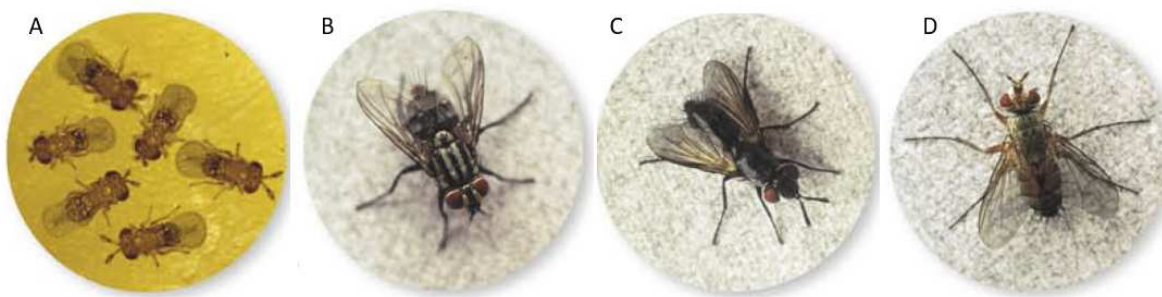


Figura 3. Parasitoides usados actualmente en Colombia para el control de *Diatraea* spp. A) Avispas de *Trichogramma exiguum*. B y C) *Paratheresia claripalpis* y *Lydella minense*, respectivamente, parasitoides de larvas criados en laboratorio y liberados en campo. D) *Geinea jaynesi*, mosca nativa controlador natural de *Diatraea* spp. Fotos tomadas de (G. A. Vargas & Gómez, 2005)

La susceptibilidad de los enemigos naturales ha conllevado a la búsqueda de nuevas estrategias de control biológico que sean compatibles con las actuales, para lo cual, el uso de hongos entomopatógenos en la producción de bioplaguicidas, se constituye como una alternativa prometedora en la construcción de nuevas estrategias dirigidas al manejo integrado de plagas, que permitan atacar a los insectos en sus primeros estadios larvales y prevenir su ingreso a la planta (Hernández-Velázquez, Lina-García, Obregón-Barboza, Trejo-Loyo, & Peña-Chora, 2012). Algunos estudios reportan la presencia natural de hongos hifomicetos causantes de mortalidad en larvas de *D. saccharalis*, dentro de las que encontraron aislamientos de *Isaria* spp., *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) y *Beauveria bassiana* (Báls.) Vuill (Estrada, Romero, & Rivero, 2004; Yasem de Romero, Salvatore, López, & Willink, 2008) y en algunos, se ha evaluado la virulencia de *B. bassiana* en pruebas de laboratorio sobre larvas de *D. saccharalis* (Alves, Rossi, Lopes, Tamai, & Pereira, 2002; Cardona, L.F & Soto, 2015; García et al., 2018).

1.2 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos causantes de enfermedades en artrópodos juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio dinámico de diferentes poblaciones de insectos (Maina, Galadima, Gambo, & Zakaria, 2018). Muchas especies de hongos son utilizadas en la formulación de bioplaguicidas, como una alternativa ambientalmente amigable al uso de insecticidas químicos, debido a su especificidad en la gama de huéspedes que atacan (Butt et al., 2016). Los hongos hifomicetos (Deuteromicota) *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son los entomopatógenos más utilizados en control biológico, con presencia en el 80% de los bioinsecticidas disponibles en el mercado (Butt et al., 2016; Haseeb & Srivastava, 2014).

1.2.1 *Beauveria bassiana*: Taxonomía, morfología y biología.

Beauveria bassiana (Báls.) Vuill, es un hongo perteneciente al Filo Ascomycota, orden Hypocreales y a la familia Cordycipitaceae. Fue reportado por primera vez en 1835 por Agostino Bassi, quien lo detectó en gusanos de seda causando la enfermedad conocida como muscardina blanca; sin embargo, fue Balsamo Crivelli quien realizó el reconocimiento taxonómico en 1835 y Paul Vuillemin (1912) quien formalmente describió el género.

Este hongo se caracteriza por tener hifas septadas con un diámetro de 2,5 a 25 μm y células conidiógenas con forma globosa (Hoog, 1972; Rehner & Buckley, 2005). Las condiciones óptimas de crecimiento en cultivo son entre 25 y 30°C. Las colonias crecidas en agar PDA suelen ser de color blanco y de consistencia algodonosa y pulverulenta, que con el paso del tiempo se tornan amarillentas y cremosas (Cañedo & Ames, 2004). Generalmente, los conidios se producen en medio sólido, se caracterizan por ser unicelulares, hialinos, lisos y esféricos (1,7–5,5 μm), mientras que en cultivo líquido es más común la formación de blastosporas; éstas tienen forma elipsoidal y pared lisa, con una longitud promedio de 6,5 y un diámetro de 2,5 μm (M. G. Feng, Poprawski, & Khachatourians, 1994; Hoog, 1972).

El ciclo de vida en general de los Hypocreales, incluye etapas dentro y fuera del hospedero, con fases anamórficas y teleomórficas, en las que producen estructuras sexuales (conidios) y asexuales (ascosporas), respectivamente, las cuales pueden permanecer en el suelo o en las plantas, por períodos prolongados (Boomsma, Jensen, Meyling, & Eilenberg, 2014). Aunque se ha descrito con frecuencia que *Beauveria* es estrictamente asexual, análisis

filogenéticos moleculares han demostrado que debido a su estrecha relación con el género *Cordyceps*, muchas especies de *Beauveria* pueden ser sexuales, sin embargo, esto es poco frecuente en la naturaleza y no han sido inducidas en laboratorio, por lo que el conocimiento al respecto aún necesita ser esclarecido (Rehner & Buckley, 2005; Xiao et al., 2012).

1.2.2 Ciclo de infección

El modo principal de acción de *B. bassiana* es por contacto a través de la ruptura del integumento del insecto (Figura 4), sin embargo, también se ha reportado que este hongo puede infectar por vía oral, especialmente en insectos con aparatos bucales masticadores (Feng et al., 1994).

En la naturaleza, la dispersión por agua y aire de conidios, así como el crecimiento saprofito del hongo, son las principales vías de contacto de las estructuras del patógeno con el insecto (Holder & Keyhani, 2005). El ciclo de infección puede resumirse en cuatro fases. La primera, es la **adhesión de los conidios a la superficie del hospedero** (Figura 4 A), este proceso está mediado por la acción de hidrofobinas. Específicamente en *B. bassiana* se han descrito dos proteínas *hyd1* e *hyd2*, que cubren el conidio y le permiten adherirse a superficies hidrofóbicas (D.J. Holder & Keyhani, 2005; S. Zhang, Xia, Kim, & Keyhani, 2011); estas características diferencian a los conidios de otras estructuras infecciosas como las blastosporas, las cuales tienen características hidrofílicas (Diane J. Holder, Kirkland, Lewis, & Keyhani, 2007).

La siguiente fase del proceso es la **germinación y penetración de la cutícula** (Figura 4 B). Una vez los conidios se han adherido, bajo condiciones adecuadas de humedad, temperatura y fuente de carbono, estos germinan (Valero et al., 2016). El tubo germinal crece y desarrolla una estructura denominada apresorio, que inicia el proceso de perforación de la cutícula del insecto, generalmente en las zonas menos esclerotizadas, partes bucales y el ano (Ortiz & Keyhani, 2016); la formación del apresorio está regulada en *B. bassiana* por el gen BbMAPK1 (Zhang et al., 2010). La penetración de la cutícula es el resultado de procesos mecánicos que aumentan la presión ejercida por el apresorio sobre el tegumento del hospedero y la acción conjunta de un conjunto de enzimas hidrolíticas, lipasas, proteasas y quitinasas, que degradan la cutícula del insecto; dichas enzimas han sido descritas como importantes factores de virulencia (Butt et al., 2016), ya que al

acelerarse el rompimiento de la cutícula, se reduce la exposición del entomopatógeno a diferentes condiciones de estrés ambiental y a las respuestas de defensa del insecto (Valero et al., 2016).

La tercera fase, consiste en la **invasión y colonización del hemocele** (Figura 4 C). Durante el proceso de invasión, surgen una serie de interacciones patógeno-hospedero, que permiten evidenciar diferentes estrategias de defensa por parte del insecto y de evasión del sistema inmune por parte del hongo. Después del ingreso del hongo a través de la cutícula, tanto patógeno como hospedero, producen sustancias antioxidantes (super óxido dismutasa (SOD), catalasas, proteasas y peroxidasas) con el fin de contrarrestar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que pueden causar graves daños en sus ácidos nucleicos y estructuras lipídicas y peptídicas (Figura 4B) (Butt et al., 2016). El insecto sintetiza melanina, pigmento que limita el crecimiento del hongo y utiliza diferentes tipos de hemocitos para encapsular y fagocitar las estructuras fúngicas (Dubovskiy et al., 2013) (Figura 4 B y C). Por su parte, los hongos evaden este mecanismo de defensa formando blastosporas en el hemocele; Butt y colaboradores (2016), proponen que la formación de estas estructuras se debe a la presencia de grandes cantidades de nutrientes (específicamente trehalosa) y oxígeno presentes en la hemolinfa. Este tipo de estructura posee pocos epítopes de carbohidratos inmunogénicos, que, junto con una serie de fibras a modo de cepillo, presentes en su pared celular, pueden ayudar al hongo a pasar desapercibido ante los hemocitos y receptores libres del sistema inmune del insecto, posibilitando su proliferación y movilidad. Esta idea se refuerza al evidenciar que este tipo de arquitectura no se produce en condiciones *in vitro* (Wanchoo, Lewis, & Keyhani, 2009).

La **muerte y esporulación sobre el hospedero** (Figura 4 D) constituyen el final del proceso infeccioso. La muerte, es generada como consecuencia de una serie de eventos provocados por el hongo, para garantizar su proliferación. Dentro de estos eventos se destacan entre otros, la acidificación del hemocele, la reducción de nutrientes disponibles para el insecto y la secreción de toxinas citotóxicas (Valero et al., 2016). Después de la muerte del insecto, las condiciones que indujeron la formación de blastosporas desaparecen y se genera el ambiente propicio para la producción de hifas. Estas estructuras crecen hacia el exterior del insecto, por lo que es necesario la producción de enzimas hidrolíticas fúngicas que permitan el rompimiento cuticular, esta vez desde el interior, para permitir la extrusión de las hifas y su consiguiente conidiación sobre la

superficie del insecto. Este proceso, al igual que en las etapas iniciales de la infección, es mediado por proteasas y quitinasas, las cuales debido a la diversidad en el genoma de *B. bassiana*, pueden ser diferentes y estar especializadas para cada fase del ciclo de infección (Ortiz & Keyhani, 2016; Valero et al., 2016).

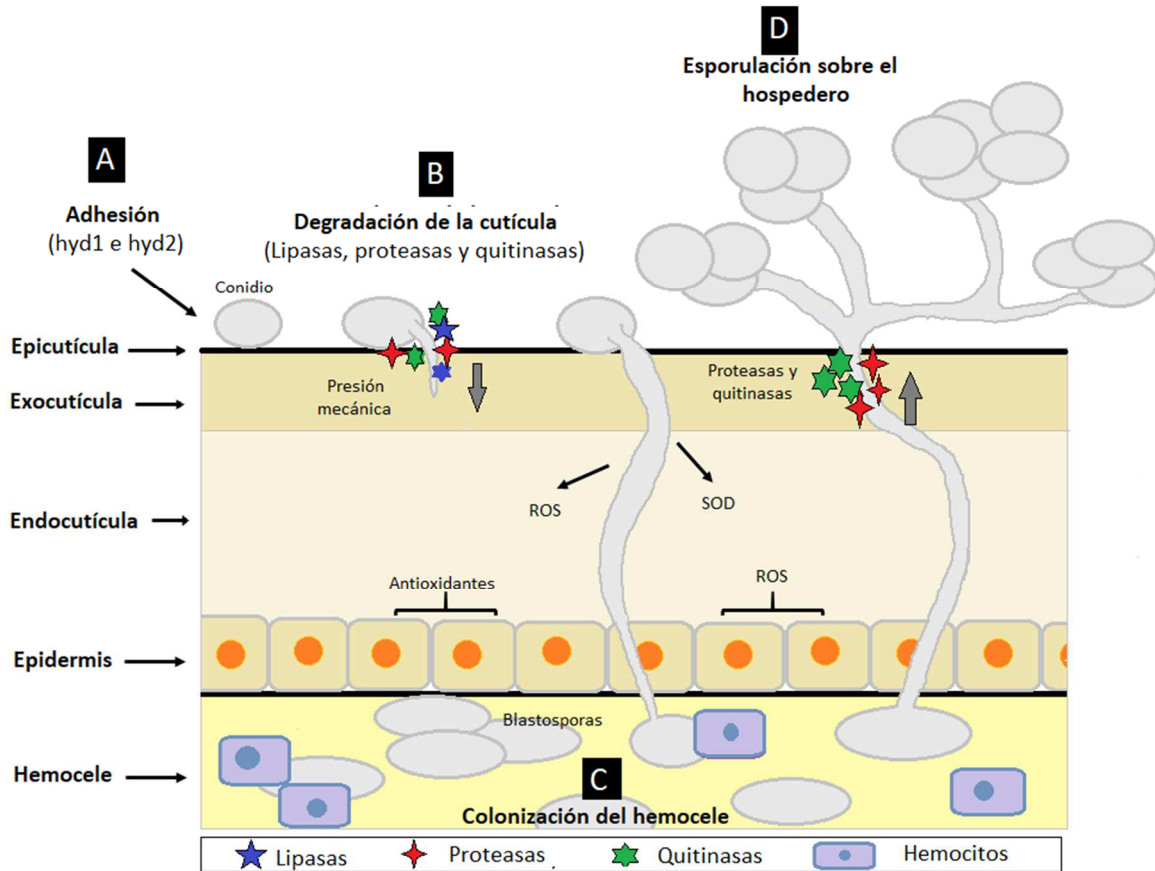


Figura 4. Esquema del proceso de infección de *Beauveria bassiana*. A) adhesión de conidios a la superficie del insecto hospedero. B) Germinación de conidios y penetración de la cutícula. C) Invasión y colonización del hospedero. D) Muerte y esporulación sobre el cadáver del insecto.

1.2.3 Bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos

Los bioplaguicidas se han convertido en los últimos años en una alternativa para los productos químicos utilizados convencionalmente como insecticidas, debido a que son ambientalmente sostenibles y mucho más específicos en la gama de huéspedes que atacan (Shternshis, 2004). La eficacia de estos productos depende de un adecuado proceso de formulación que debe garantizar tres condiciones básicas: primero, que se use tanto el propágulo adecuado como la dosis necesaria para atacar al hospedero, segundo, que se

caracterice por tener alta tolerancia a las condiciones ambientales a las que estará expuesto y, por último, que sea compatible con otras prácticas agrícolas (Lacey, *et al* 2001).

Dentro de los diferentes organismos con potencial como agentes de control biológico, los hongos han despertado interés en el desarrollo de bioplaguicidas, debido a que más de 90 géneros y 700 especies, se encuentran relacionadas con artrópodos, en especial a insectos (St Leger & Screen, 2001). Específicamente *Beauveria bassiana*, es utilizado ampliamente, como principio activo en formulaciones de bioinsecticidas comerciales, debido a que se caracteriza por tener un amplio rango de hospederos, rápido crecimiento *in vitro* en diferentes medios de cultivo, capacidad de evadir las respuestas de defensa del insecto y habilidad para penetrar las cutículas de los artrópodos (Haseeb & Srivastava, 2014; L. A. Lacey et al., 2001; Y. Zhang et al., 2010).

El modo de acción por contacto de los micoinsecticidas a base de *Beauveria*, provee ventaja respecto a otros microorganismos entomopatógenos como bacterias y virus, quienes utilizan factores de virulencia que actúan específicamente en el intestino del insecto y su mecanismo de entrega debe superar las condiciones adversas del canal alimenticio (Federici, 1999; Ortiz & Keyhani, 2016; Xiao et al., 2012).

A pesar de las ventajas antes mencionadas, algunos autores reportan inconvenientes asociados al rendimiento del hongo y su rentabilidad económica. St Leger y Screen (2001) afirman que algunos bioinsecticidas de origen entomopatógeno generan procesos infectivos lentos en comparación con los productos químicos. Adicionalmente, se requiere gran cantidad de producto para obtener una alta tasa de virulencia. Según datos reportado por Federici (1999), en promedio se necesitan 1×10^{14} conidios de *B. bassiana* por hectárea para obtener una concentración letal noventa (CL_{90}) sobre larvas de lepidópteros.

Estos inconvenientes han enfocado la investigación hacia la búsqueda de nuevas alternativas para mejorar la eficacia de bioplaguicidas a base de hongos. Uno foco principal es la identificación y aumento de factores de virulencia (toxinas y enzimas hidrolíticas) que intervienen en el proceso de infección, bien sea produciendo cepas recombinantes (St Leger & Screen 2001), usando mezclas de diferentes entomopatógenos (bacterias, virus y hongos) con acción sinérgica o aditiva y por último la aplicación de enzimas hidrolíticas dentro de las que se destacan las quitinasas (Shternshis, 2004).

1.3 Quitinasas

Las quitinasas (E.C. 3.2.2.14) son glucósido hidrolasas (GH) que catalizan la degradación de quitina por la escisión de los enlaces 1,4- β -glucosídicos de las subunidades de N acetil-D- Glucosamina (NAG). Estas enzimas, se encuentran presentes tanto en organismos que contienen quitina en su estructura como levaduras, hongos, insectos, crustáceos etc., y en organismos que no poseen quitina, como bacterias, y plantas (Goñi, 2011; Laribi-habchi, Biche, Drouiche, & Boudjema, 2014; Singh, Singh, & Joshi, 2016; St Leger et al., 1996). Las quitinasas están relacionadas con procesos fisiológicos y morfológicos, y sus funciones varían según el tipo de organismo, por ejemplo en plantas, están implicadas en mecanismos de defensa frente a agentes patógenos, en las bacterias están relacionadas con procesos de patogénesis y nutrición, en los insectos son fundamentales en los procesos de ecdisis, en los hongos permiten la degradación extracelular de quitina y la reestructuración celular y en algunos virus, como los baculovirus, están estrictamente relacionadas con el proceso de infección (traspaso de barreras en el intestino medio) y la diseminación horizontal de viriones (licuefacción de larvas) (Berini et al., 2018; Goñi, 2011; Hartl, Zach, & Seidl-seiboth, 2012).

1.3.1 Quitina

La quitina $[(C_8H_{13}NO_5)_n]$ es un polisacárido lineal, cristalino y poco soluble, formado por subunidades de NAG. Estructuralmente es similar a la celulosa, su diferencia radica en la presencia de un grupo acetamida, en lugar del grupo hidroxilo, en el carbono 2 de la subunidad de glucosa (Figura 5) (Veliz, Martínez-hidalgo, & Hirsch, 2017). Después de la celulosa, la quitina es el polímero más abundante en la naturaleza y es un componente esencial en la estructura de la pared celular de hongos, el exoesqueleto de artrópodos, la matriz peritrófica de insectos, el caparazón de crustáceos y en el recubrimiento de huevos de nematodos (Castro *et al.*, 2011; Goñi, 2011; Hartl *et al.*, 2012; Laribi-habchi *et al.*, 2015; St Leger *et al.*, 1996). Existen tres formas de quitina, α , β y γ , las cuales se diferencian en la disposición de las cadenas paralelas de polímeros que forman las láminas de quitina (Figura 6). Así, la quitina α , propia de la pared de hongos y la cutícula de artrópodos, presenta cadenas antiparalelas con fuertes uniones entre las mismas, dando rigidez a dichas estructuras; mientras que en estructuras más flexibles como la matriz peritrófica y los capullos de los insectos, predominan quitina β (cadenas paralelas) y quitina γ (dos cadenas que van en una dirección y una cadena que va en la dirección opuesta), las cuales

tienen menor número de puentes de hidrogeno y menor rigidez en su estructura (Jang, Kong, Jeong, Lee, & Nah, 2004; Merzendorfer, 2003).

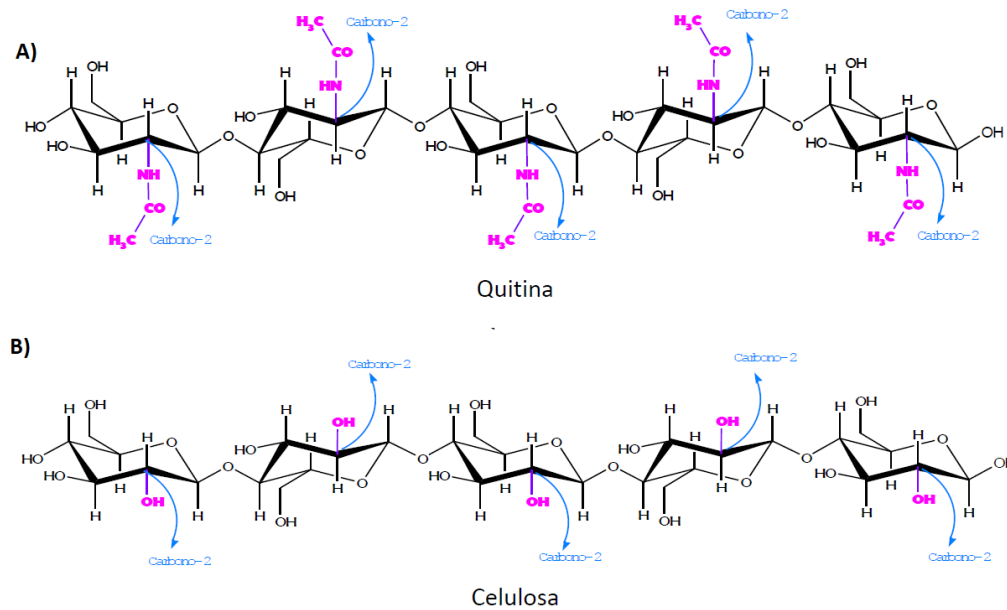


Figura 5. Comparación estructural de la quitina y la celulosa. A) Estructura molecular de la quitina. B) Estructura molecular de la celulosa. Imagen tomada y adaptada de Nava, (2009)

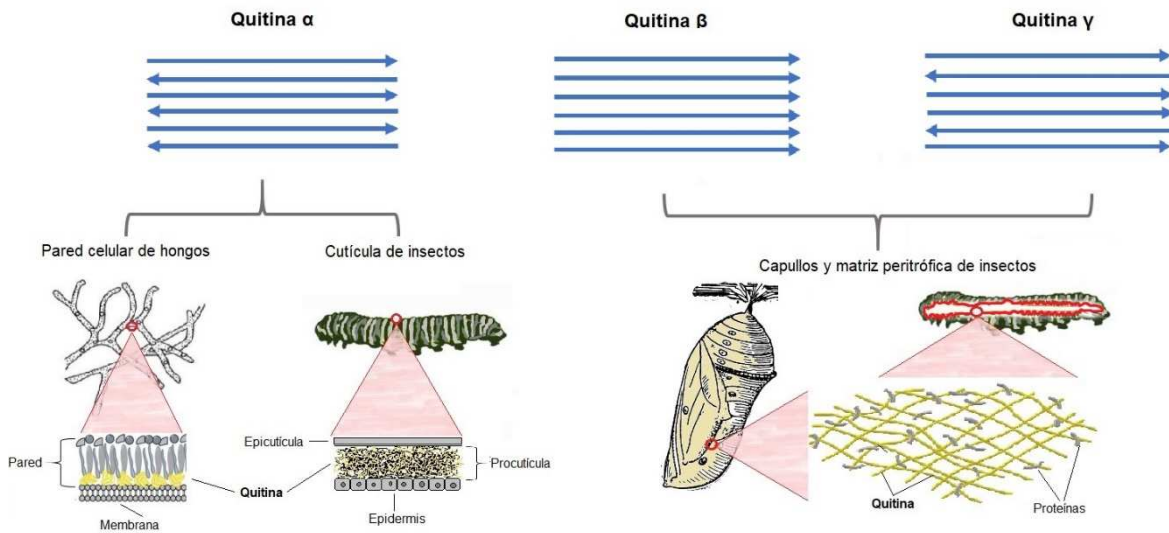


Figura 6. Tipos de quitina presentes en diferentes estructuras de hongos e insectos. Las flechas azules representan la dirección de las cadenas de quitina y en amarillo se representan las fibras de quitina al interior de las estructuras.

1.3.2 Clasificación de quitinasas

La clasificación de las quitinasas ha sufrido varias modificaciones en el tiempo y continúa transformándose a medida que avanzan las investigaciones en enzimología. En el sistema de clasificación de glicósido hidrolasas propuesto por Henrissat y colaboradores, (1991), las quitinasas pueden clasificarse en dos familias: 18 (GH18) y 19 (GH19), las cuales son principalmente endoquitinasas, pertenecientes en el caso de la primera, a hongos, bacterias, animales, virus y plantas, y en la segunda, principalmente a plantas. Sin embargo, otras enzimas que también rompen enlaces glicosídicos de la quitina como las 1,4- β -(N)-acetilglucosaminidasas son clasificadas en la familia 20 (GH20) y han sido encontradas en algunos protozoos, bacterias, hongos y humanos (Patil, Ghormade, & Deshpande, 2000; Slámová, Bojarová, Petrásková, & Křen, 2010).

En este trabajo la definición de quitinasa, se basa en la clasificación según el patrón de escisión y hace referencia a todas aquellas enzimas capaces de degradar la quitina por hidrólisis de los enlaces 1,4- β -glicosídicos (Figura 7). Se utilizará la categoría de **endoquitinasa** (EC 3.2.2.14) para aquellas enzimas que rompen los enlaces de la quitina aleatoriamente generando quitooligosacaridos de diferentes tamaños como quitotetraosa, quitotriosa o diacetilquitobiosa y la categoría **exoquitinasa** para aquellas que escinden los enlaces de NAG desde el extremo no reductor de polímeros de quitina o quitooligosacaridos, diferenciando dos mecanismos específicos de hidrólisis: **1,4- β -(N)-acetilglucosaminidasas** (EC 3.2.1.52), que liberan monómeros de NAG y **quitobiosidasas**, que liberan dímeros de NAG (Goñi, 2011; Rocha, 2009; Veliz et al., 2017).

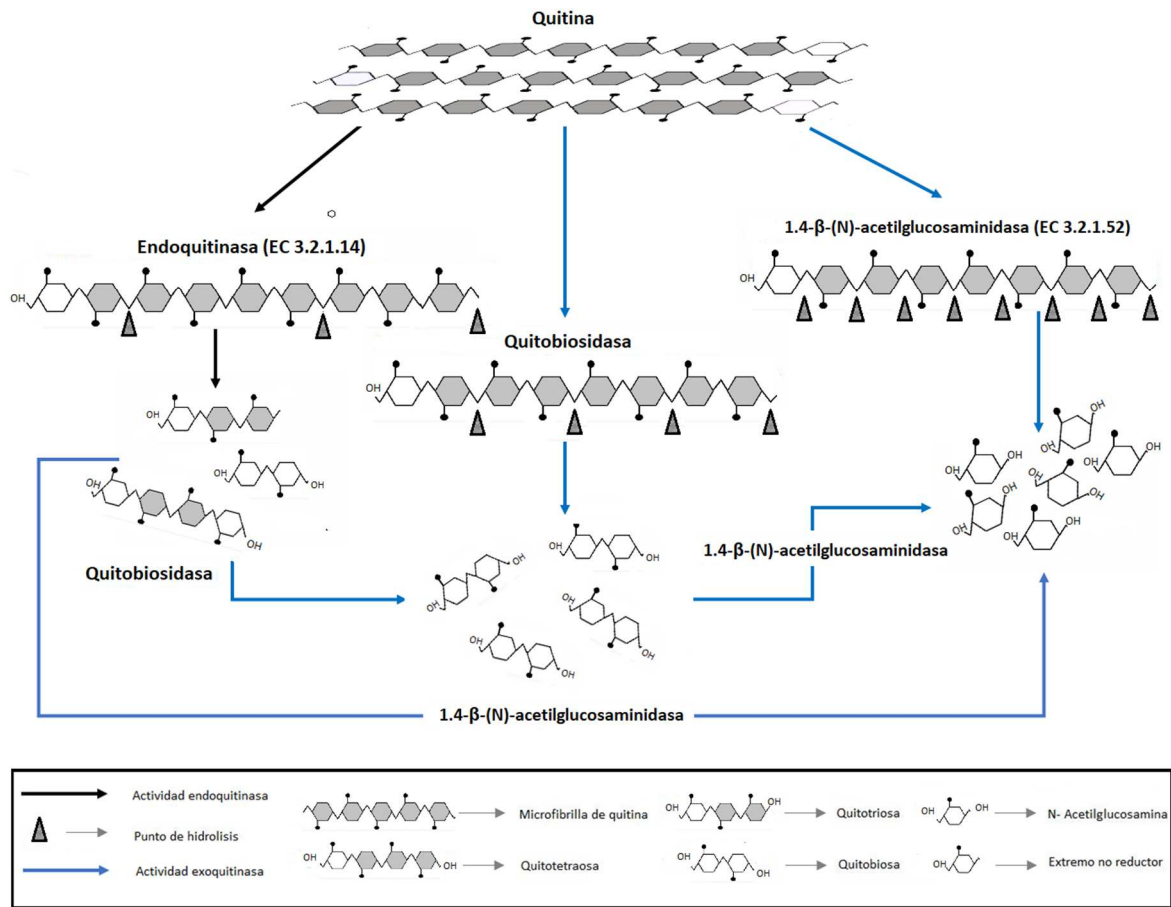


Figura 7. Mecanismo hidrolítico de las quitinasas según el patrón de escisión. Se observa en la imagen el tipo de escisión realizado por los diferentes tipos de quitinasas y los productos generados por cada una. Las flechas indican la dirección de la reacción y el sustrato sobre el cual se realiza el proceso hidrolítico.

1.3.3 Mecanismo catalítico

A modo general, las glucósido hidrolasas llevan a cabo la hidrólisis enzimática por un mecanismo de catálisis ácida. En las quitinasas, estos mecanismos varían según la familia a la que pertenecen, ya que éstas presentan claras diferencias en sus secuencias, dominio catalítico y estructura tridimensional (Duo-Chuan, 2006). Las GH19 presentan un dominio catalítico con dos lóbulos, compuestos por dos hélices α y una hoja β con tres puentes disulfuro altamente conservados y su hendidura de unión a sustrato presenta 4 subsitios (S. Liu et al., 2015). Tienen un mecanismo catalítico de inversión, en el que se requiere la presencia de dos residuos de ácido glutámico orientados de forma enfrentada en el sitio de hidrólisis (S. Liu et al., 2015)

Las quitinasas de las familias 18 y 20 (presentes en microorganismos) se caracterizan por tener un mecanismo de retención asistido por sustrato (Sasaki et al., 2002; Seidl, Huemer, Seiboth, & Kubicek, 2005; Sirimontree et al., 2016) y por tener un dominio funcional compuesto por un barril de Triosa fosfato isomerasa (TIM) conformado por 8 hélices α y 8 hojas β , que conforman una ranura larga con varios subsitios que permiten la unión de la enzima a las cadenas del sustrato (Hamid et al., 2013; Martinez et al., 2012; Slámová et al., 2010); no obstante, se diferencian en la forma y disposición molecular de dichos subsitios alrededor del sitio activo. Las GH18 presentan dos motivos altamente conservados (SxGG y DxxDxDxE) (Terwisscha van Scheltinga, Kalk, Beintema, & Dijkstra, 1994), en donde el ácido glutámico, ubicado en la cuarta cadena β del barril TIM, es el residuo catalítico (Aronson et al., 2003). Por su parte, el sitio activo de la familia GH20 tiene un motivo característico (H/N-X-G-A/C/G/M-D-E-A/I/L/V) presente en todas las 1,4- β -(N)-acetilglucosaminidasas (Gutternigg et al., 2007).

1.3.4 Quitinasas fúngicas

Las quitinasas tienen roles fundamentales en el desarrollo y funcionamiento de los hongos, por lo que no es raro encontrar que, en comparación con las bacterias, estos genes pueden encontrarse en múltiples copias. Específicamente, los hongos filamentosos tienen entre 10 y 25 quitinasas diferentes en sus genomas, mientras que en promedio una bacteria posee tan solo 2 a 4 (Seidl, 2008). Dichas enzimas están implicadas en la degradación de quitina endógena y son fundamentales en diferentes etapas del ciclo de vida, como la remodelación de su pared celular, esporulación, germinación, el crecimiento y autólisis de las hifas en el caso de hongos filamentosos y en la división celular de levaduras (Adams, 2004; Duo-Chuan, 2006). También, se encuentran relacionadas con la degradación de quitina exógena para diferentes propósitos. Por ejemplo, procesan estructuras como exoesqueletos de artrópodos, hifas y paredes celulares de otros hongos con el fin de obtener nutrientes, defenderse o competir en su hábitat; incluso, algunos hongos se han especializado como micoparásitos, entomopatógenos y nematófagos, y utilizan las quitinasas junto con otras enzimas hidrolíticas en estrategias parasíticas para invadir diversos hospederos (Seidl, 2008).

La mayoría de las quitinasas de hongos pertenecen a la familia de glicósido hidrolasas GH18 (Duo-Chuan, 2006; Hamid et al., 2013; Seidl, 2008); sin embargo, recientemente se reportó una quitinasa fúngica perteneciente a la familia GH19 (Han et al., 2016).

Estructuralmente las quitinasas fúngicas de la familia 18 están compuestas por 5 regiones, un péptido señal, un dominio catalítico altamente conservado que ocupa la mitad de la región N terminal, un dominio de unión a carbohidratos (celulosa o quitina), una región rica en S/T y una extensión en la región C terminal (Seidl et al., 2005). Es importante resaltar, que no todos los dominios estructurales intervienen en la función enzimática y los últimos tres dominios están ausentes en algunas quitinasas, así como la presencia o ausencia de una secuencia de señalización N terminal, dependerá de la localización y función fisiológica de la enzima (Duo-Chuan, 2006).

Basado en la presencia o ausencia de los dominios antes mencionados y en relaciones filogenéticas, Seidl y colaboradores, (2005) propusieron una clasificación de las quitinasas fúngicas en tres subgrupos (sg) A, B y C (Tabla 1), los cuales presentan diferencias en el tipo de actividad, la arquitectura de su sitio activo o hendidura de unión a sustrato (Figura 8) y la presencia o ausencia de péptidos señal (SP) y módulos de unión a carbohidrato (CBM).

Tabla 1. Características de los subgrupos de quitinasas GH18. Datos tomados de (Seidl, 2008)

Sg	Tipo de actividad	Sitio activo	Masa (kDa)	Tipo de CBMs	Ubicación de CBM	Localización subcelular
A	Exoquitinasa	Profundo y estrecho	40-50	Ausentes	-	Secretadas (SP) o intracelulares
B	Endoquitinasa	Superficial y abierto	Pequeñas (30-50)	CBM 1,	C-terminal	-
			Grandes (>90)	GPI* ó Domini rico en S/T	C-terminal	Membrana plasmática
C	Exoquitinasa	Profundo y estrecho	140-170	CBM 18 Motivo Lys	N-terminal	Secretadas (SP)

*GPI: Anclaje glicosilfosfatidilinositol

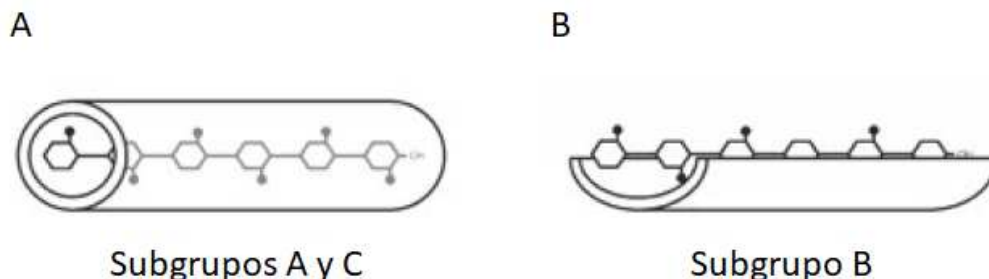


Figura 8. Representación esquemática de la arquitectura de los sitios activos en GH18. A) Sitio activos de quitinasas fúngicas de los subgrupos A y C: presenta forma de túnel largo, estrecho y profundo. B) Sitio activo de quitinasas fúngicas del subgrupo B: es abierto y superficial. (Seidl et al., 2005)

1.3.5 Quitinasas virales

Las quitinasas de baculovirus son altamente conservadas en los genomas de nucleopoliedrovirus y granulovirus de lepidópteros (Hodgson, 2011) y son fundamentales en dos etapas del mecanismo de infección. Primero actúan sobre la matriz peritrófica que protege la células del epitelio intestinal, permitiendo que los ODV recién liberados de los CI puedan atravesar la barrera y entrar en contacto con las microvellosidades del intestino medio (Berini et al., 2018; Hawtin et al., 1997; Rao et al., 2004); y segundo, intervienen en el proceso de licuefacción terminal de los tejidos del insecto, junto con las catepsinas (proteasas lisosómicas), permitiendo la liberación y diseminación de los viriones al ambiente (Berini et al., 2018; Hawtin et al., 1997; Hodgson, 2011). Por lo anterior, algunos autores (Cuartas, Barrera, Gómez, Barreto, & Villamizar, n.d.; Hawtin et al., 1997) consideran las quitinasas como importantes factores de virulencia en baculovirus.

En comparación con las quitinasas bacterianas y fúngicas, poco se conoce de estas enzimas en virus y todas las descritas hasta el momento han sido clasificadas dentro de la familia GH18 (Berini et al., 2018). En la familia *Baculoviridae*, la quitinasa más estudiada es la denominada ChiA del nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), la cual es homóloga a la enzima del mismo nombre en *Serratia marcescens* (Berini et al., 2018). Hawtin y colaboradores (1997) sugieren que los baculovirus pudieron haber adquirido la capacidad de infectar insectos a partir de genes quitinasa de bacterias. Otra hipótesis menciona la posible adquisición de este tipo de genes a partir de los insectos hospederos, debido a que la ChiA de AcMNPV presenta una secuencia N-terminal de 17

aminoácidos que se asemeja a un péptido señal eucariótico (Hodgson, 2011) y las quitinasas ChiA de AcMNPV y del nucleopoliedrovirus de *Bombix mori* (BmNPV) son homólogas a la quitinasa BmCHI-h, propia de insectos, la cual está relacionada con la degradación de quitina durante el proceso de ecdisis y es altamente conservada en lepidópteros (Daimon, Katsuma, Kang, & Shimada, 2006). Teniendo en cuenta las diferentes propiedades de las quitinasas bacterianas, virales y de insectos, todas podrían tener un origen ancestral común, pero cada una ha evolucionado para cumplir las funciones biológicas de cada organismo, por ejemplo, las quitinasas de AcMNPV funcionan a pH alcalino, mientras que sus homólogas en lepidópteros son secretadas y disminuyen su actividad enzimática a pH alto (Rohrmann, 2013).

Las estructuras de quitinasas en el género *Alfabaculovirus* presentan un motivo conservado de retención en el retículo endoplasmático (RE) denominado KDEL, en donde interactúa con la catepsina V-CATH, regulando su permanencia intracelular y liberación hasta la etapa final de la infección, ya que estas dos proteínas están implicadas en la licuefacción del hospedero en la etapa final de la infección (Hodgson, 2011). Las quitinasas en el género *Betabaculovirus*, no presentan motivos relacionados con retención en el RE, por lo que se propone que la quitinasa es liberada más rápido en comparación con los *Alfabaculovirus* (Salvador & Ferrelli, 2014); sin embargo, las funciones de esta secreción temprana se encuentran aún por explorar.

1.3.6 Quitinasas en el control biológico de insectos plaga

Las enzimas provenientes de hongos entomopatógenos recientemente han adquirido importancia en diferentes campos de aplicación, por su origen natural, especificidad de acción, baja toxicidad y residualidad en el ambiente (Mondal, Baksi, Koris, & Vatai, 2016). Específicamente las quitinasas, se han convertido en un blanco de desarrollo, para establecer nuevas estrategias de manejo integrado de plagas agrícolas, debido a la presencia de quitina en las estructuras protectoras de los insectos y su importancia en los procesos de desarrollo y crecimiento (Berini et al., 2017; Herrera-Estrella & Chet, 1999). Así mismo, en comparación con otras enzimas implicadas en la patogenicidad de agentes de control biológico como las proteasas, las enzimas quitinolíticas son inofensivas para organismos no objetivo como plantas y vertebrados, quienes no contienen quitina en su estructura (Berini et al., 2018).

En los hongos entomopatógenos, se ha demostrado que la acción quitinasa sobre la cutícula del hospedero, está directamente asociada con su actividad insecticida, por esta razón, diferentes autores coinciden en que las quitinasas son un importante factor de virulencia (Butt *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2007; Ortiz & Keyhani, 2016; Valero *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2012). Lo anterior se ha demostrado con el estudio de cepas modificadas para la sobreexpresión de quitinasas, en las que se evidencia un notable incremento en su virulencia y una disminución tanto en el tiempo letal medio (TL₅₀) como en la CL₅₀ (Fan *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2005b; Meng *et al.*, 2015).

En este contexto, está demostrado el potencial que tienen las enzimas quitinolíticas para superar algunas limitaciones del uso de bioinsecticidas en campo, como su baja tasa de mortalidad en comparación con insecticidas químicos, la necesidad de una elevada cantidad de propágulo para generar una tasa de mortalidad eficiente y un largo periodo inicial de latencia, necesario para el establecimiento de la infección (Fan, Fang, *et al.*, 2007; St Leger & Screen, 2001). Sin embargo, teniendo en cuenta que el uso de microorganismos genéticamente modificados está restringido para la formulación de productos de control agrícola en Colombia (ICA, 2011a) y otros países, la producción de quitinasas recombinantes puede ser una alternativa como aditivo para potenciar la actividad insecticida de los agentes de control biológico.

1.4 Proteínas recombinantes

La tecnología de ADN recombinante ha permitido sintetizar proteínas en organismos que no las producen de forma natural, estas proteínas son conocidas como recombinantes (Guevara *et al.* 2013). Tal como lo afirman Ferrer-Millares y colaboradores (2015), la necesidad de producir proteínas en sistemas heterólogos se debe a la imposibilidad de obtener altos rendimientos a partir de la fuente natural, por lo que esta tecnología ha adquirido importancia en diferentes campos de la industria, ya que posibilita obtener en poco tiempo y a gran escala proteínas o péptidos con interés biotecnológico.

Para la producción de proteínas recombinantes, se pueden utilizar diferentes sistemas de expresión. Los procariontes incluyen bacterias ácido-lácticas, psicrófilos y diversas cepas de *E. coli*. Por otro lado, se encuentran los eucariotes, que incluyen células de mamífero e insecto, levaduras, hongos filamentosos y microalgas. También existen sistemas derivados

de plantas y animales transgénicos. Por último, se encuentran los sistemas libres de células (Ferrer-Millares *et al.*, 2015).

Según Guevara y colaboradores (2013), *E. coli* es el sistema de expresión más comúnmente usado para la producción de proteínas recombinantes, que se caracteriza por ser un sistema económico, fácil de manipular, crecer rápidamente, tener un alto rendimiento en la producción, facilitar el escalamiento de los procesos a nivel industrial y por tener disponible en el mercado, un gran número de herramientas que favorecen los procesos de expresión en este sistema. La producción de recombinantes en este organismo tiene tantas ventajas, que según datos reportados por Ferrer-Millares y colaboradores (2015), el 88% de las proteínas registradas en el banco de datos de proteínas (PDB por sus siglas en inglés), son producidas en este hospedero.

Sin embargo, la producción de recombinantes en *E. coli* tiene algunas desventajas respecto a otros sistemas de expresión; la principal está relacionada a su incapacidad para generar modificaciones postraduccionales, por lo que algunas proteínas de origen eucariota, pueden quedar mal plegadas o no ser funcionales biológicamente; esto lleva a otra desventaja de este sistema, la baja solubilidad de los productos de sobreexpresión, pues generalmente se producen agregados conocidos como cuerpos de inclusión, haciendo que se requieran varios pasos en el proceso de purificación; de igual forma, en desventaja con levaduras y células de mamífero e insecto, muchos hospederos procariotas no secretan la proteína directamente al medio, lo que dificulta su recuperación (Ferrer-Millares *et al.*, 2015; Molecular European Biology Laboratory, 2016).

Con el fin de superar estas dificultades, han surgido estrategias que permiten mejorar la solubilidad de la proteína, por ejemplo, se han diseñado vectores que expresan diferentes etiquetas de fusión, incluyendo la Glutación-S-Transferasa (GST), la Proteína de Unión a Maltosa (MBP, del inglés Maltose Binding Protein), así como etiquetas que facilitan la purificación posterior, como las histidinas, argininas o tiorredoxina; también se han insertado secuencias que codifican para chaperonas que favorecen el plegamiento de las proteínas de interés. Otras estrategias están dirigidas a la reducción del estrés metabólico que ocasiona la sobreexpresión de proteínas foráneas, para lo cual se ha trabajado en el diseño de medios de cultivo específicos y la optimización de las condiciones de crecimiento en los procesos de fermentación (Ferrer-Millares *et al.*, 2015; Guevara *et al.*, 2013).

2 Objetivos

2.1 General

Estudiar el efecto de dos quitinasas recombinantes como potenciadoras de la actividad insecticida de un aislamiento de *Beauveria bassiana* para el control de *Diatraea saccharalis*

2.2 Específicos

1. Producir dos quitinasas recombinantes seleccionadas a partir de las producidas por los aislamientos de *Beauveria bassiana* Bv062 y del Granulovirus de *Spodoptera frugiperda* (SpfrGV) VG008.
2. Determinar la actividad hidrolítica de las quitinasas recombinantes sobre diferentes sustratos.
3. Estudiar el efecto de las quitinasas recombinantes en la actividad insecticida de un aislamiento de *B. bassiana* sobre larvas de *D. saccharalis*.

3 Materiales y métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Microorganismos

Las quitinasas se amplificaron a partir de ADN genómico del aislamiento BV062 de *Beauveria bassiana* y el aislamiento VG008 de Granulovirus de *Spodoptera frugiperda* (SpfrGV), que fueron reportados como agentes entomopatógenos de lepidópteros en estudios previos (Cuartas et al., 2015; García et al., 2018). Las cepas pertenecen al Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de investigación Tibaitatá.

La cepa Bv062 estaba conservada en solución crioprotectante (Glicerol al 10% y agua peptonada al 0,1%). Su reactivación se realizó sobre agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) a una temperatura de incubación de 25°C durante 8 días (García et al., 2018).

El aislamiento VG008 estaba conservado en suspensión acuosa, la cual contenía cuerpos de inclusión (CI) purificados a partir de larvas infectadas de *Spodoptera frugiperda* (Espinel-correal et al., 2010). Los CI se purificaron por maceración de las larvas muertas por infección, en dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% y purificados por filtración y centrifugación.

3.1.2 Insectos

Para los ensayos de interacción biológica, se utilizaron larvas de la cría de *D. saccharalis* mantenidas en la unidad de crías del laboratorio de entomología (AGROSAVIA) bajo

condiciones controladas de temperatura (25°C), humedad relativa (60%) y foto período 16:8 horas (luz:oscuridad).

3.2 Producción y purificación de quitinasas

3.2.1 Análisis bioinformático y diseño de cebadores

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se obtuvieron de los genomas previamente secuenciados de los aislamientos. El genoma del granulovirus SpfrGV VG008 publicado en el GenBank con número de acceso NC_026511.1 (Cuartas et al., 2015), posee 4 genes codificantes para quitinasas: *Chit1* (GeneID:23632136), *Chit2A* (GeneID: 23632073), *Chit2B* (GeneID:23632074) y *Chit2C* (GeneID:23632136). El genoma de *Beauveria bassiana* aislamiento Bv062 (no publicado), posee 3 genes que codifican para quitinasas: *Bb01_00452*, *Bb01_03008* y *Bb01_03026*.

Para la caracterización bioinformática, se utilizaron programas y herramientas disponibles en línea. Se realizó búsqueda y comparación de secuencias homólogas, con las herramientas Protein blast y Muscle 3.8 (Altschul, Gish, Miller, & Lipman, 1990; Edgar, 2004). En el análisis del perfil secretorio, se utilizaron los programas SignalP 4.1 (Nordahl et al, 2011), Phobius (Kall, Krogh, & EL, 2007) y el servidor TMHMM V 2.0 (Krogh, Larsson, Heijne, & Sonnhammer, 2001) que permiten la identificación de péptidos señales y regiones transmembranales. Adicionalmente, se predijo la localización subcelular con los programas Bacello (Pierleoni, Martelli, Fariselli, & Casadio, 2007) para las quitinasas del hongo y Virus-mPloc (Hong-Bing & Kuo-Chen, 2010) para las quitinasas del granulovirus. La predicción de características fisicoquímicas se realizó con la herramienta ProtParam (Gasteiger et al., 2005). La anotación funcional de las proteínas se predijo utilizando las herramientas InterProScan 5 (Jones, et al. 2014) y PrositeScan (E. de Castro et al., 2006), que permiten la predicción de dominios, motivos y sitios funcionales.

Con base en el análisis *in silico* de las secuencias y teniendo en cuenta las especificaciones requeridas para su posterior clonación en el vector pEXP-5CT/TOPO (Invitrogen, California, USA), se diseñaron cebadores específicos con el programa Gene Runner versión 5.1.06 Beta, que amplifican los marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) excluyendo las regiones hidrofóbicas predichas (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de cebadores para quitinasas de SpfrGV VG008 y Bv062

Organismo	ORF	Secuencia cebadora (5'-3')	TM	Longitud del amplicón
SpfrGV VG008	Chit1	Dir.: ATGAATTTACAACAGAAACAGTGGC	60°C	222 pb
		Rev.: AAGCAAATTGCGGTTTCATCAT	54°C	
	Chit2A	Dir.: ATGCAGACGCGAGTCAAAATTCG	62°C	417 pb
		Rev.: CGACTTACTTTCAACGGGACA	62°C	
	Chit2B	Dir.: ATGCGACCGCCGCCCCGAAGCCGA	62°C	411 pb
		Rev.: GGTTGCGTTCCCGCAGTCTTG	62°C	
Chit2C	Dir.: ATGAGTAATAAAATAGTAGACGA	54°C	414 pb	
	Rev.: ATACATTTTTGGTCTGTCACCAC	60°C		
Bv062	Bb01_03008	Dir.: ATGGCTCCTTTTCTTCAAACCA	58°C	1044 pb
		Rev.: CGCAGTCCCCAAAGTCCCCTTG	60°C	

3.2.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico (ADNg) del hongo se llevó a cabo con el Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ (Zymo Research), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La purificación del ADNg del granulovirus se realizó a partir de una suspensión de CI purificados ($3,2 \times 10^6$), siguiendo el protocolo propuesto por Espinel-correal y colaboradores (2010), con modificaciones menores. Primero se liberaron los viriones, sometiendo los CI a un proceso de incubación a 60°C durante 10 minutos con Na_2CO_3 0,5M y SDS al 10% en un volumen final de reacción de 500µL, seguido por una incubación con proteinasa K a 30°C durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN viral con Fenol y cloroformo, seguida por un proceso de precipitación con acetato de sodio 3M y etanol absoluto, el pellet obtenido fue lavado con etanol al 70%, suspendido en agua ultra pura y almacenado a -20°C.

3.2.3 Amplificación y clonación

La amplificación por PCR de los ORF *Chit2A* del granulovirus SpfrGV y *Bb01_03008* de *B. bassiana* Bv062 se realizó a partir del ADNg (extraído bajo las condiciones antes mencionadas) utilizando la PCR master mix 2X (© Thermo Fisher Scientific Inc.) en un

volumen final de reacción de 20 μL que contenía: 10 μL de mix 2X, 2 μL de cebadores directo y reverso a una concentración de 10 μM cada uno, 2 μL de ADN molde y agua ultra pura para completar el volumen de la reacción. El proceso de PCR comenzó con un ciclo de denaturación inicial de 5 min a 94°C; seguido por 35 ciclos de 10 seg a 92°C, 15 seg a 55°C, 1 min a 72°C y terminó con un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

Una vez amplificados y analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, los amplímeros fueron recuperados de los geles y se purificaron con el kit Wizard® SV gel and PCR Clean –up system (Promega, Madison, W.I, USA).

Los productos purificados se ligaron al vector pEXP5-CT/TOPO® (Invitrogen), usando el kit del mismo nombre y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El producto de PCR se ligó al vector, gracias a la acción de la topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, que reconoce en la cadena doble de ADN del vector, la secuencia CCCTT y rompe el enlace fosfodiéster en una hebra. La energía producida por el rompimiento es utilizada para la formación de un enlace entre el fosfato 3' de la hebra y el residuo tirosil (Y-274) de la enzima (Figura 9A). Durante la PCR, la polimerasa agrega a los extremos del producto amplificado, una desoxiadenosina (A), que posteriormente se liga a los residuos de timidina (T) del vector linealizado (Invitrogen, 2006).

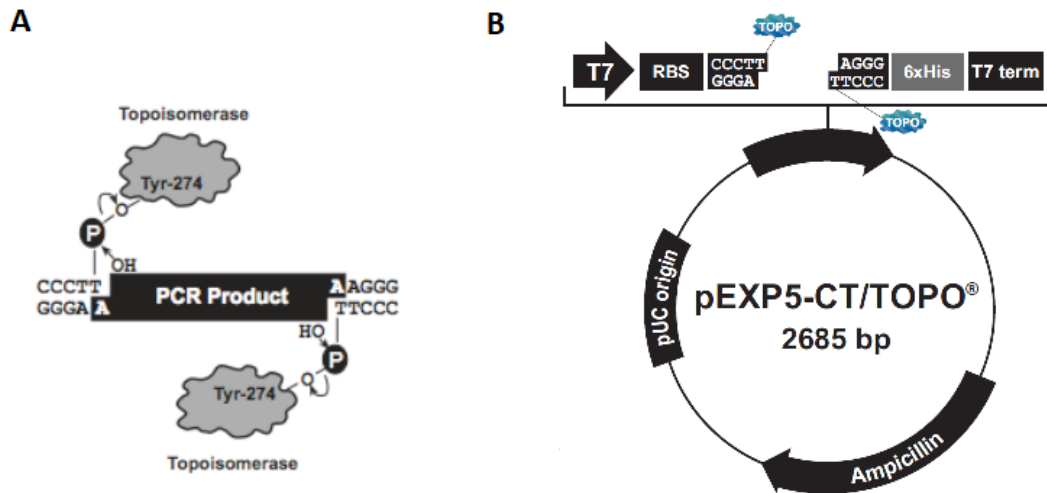


Figura 9. Clonación en pEXP5-CT/TOPO A) Acción de la topoisomerasa I del virus *Vaccinia* en la activación del vector pEXP5-CT/TOPO® y la ligación del producto de PCR de interés. B) Mapa del vector pEXP5-CT/TOPO, se muestra el gen de resistencia a ampicilina y las características de la región de inserción del producto de interés: promotor (T7), sitio de unión a ribosoma (RBS), sitios de reconocimiento de la topoisomerasa I (TOPO), etiqueta

de polihistidinas (6x His) y terminador de la transcripción (T7 term). Tomada de (Invitrogen, 2006).

El constructo resultante, se insertó por transformación con choque térmico de células *E. coli* TOP10 (Invitrogen), las cuales se incubaron en agitación a 37°C durante 24 horas, en placa con medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (100 µg/mL) como medio selectivo, ya que el vector posee el gen que confiere resistencia a dicho antibiótico (Figura 9 B). Los clones recombinantes se verificaron por PCR de colonia utilizando cebadores externos e internos, correspondientes al vector (cebador directo T7) y la secuencia de interés respectivamente (cebador reverso). El ADN plasmídico de tres clones recombinantes se extrajo con el kit Ultraclean® 6 minute mini plasmid prep kit simple (Mo Bio, laboratorios, Inc.) y se verificó la correcta orientación e integridad del gen por secuenciación bidireccional usando el método de Sanger (MACROGEN, Seúl, Corea del sur).

3.2.4 Expresión en células BL21-DE3

Los ADN plasmídicos se utilizaron para transformar células *E. coli* BL21-DE3 (Invitrogen) y se realizó la selección de transformantes como se describió anteriormente.

Para las pruebas de expresión, se creció un inóculo toda la noche a 37° C con agitación, el cual se empleó para inocular caldo LB con Ampicilina (100 µg/mL) hasta una DO_{600} de 0,5. Una alícuota se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1mM y otra se dejó como control sin inducir. Para evaluar la expresión en el tiempo, se colectaron alícuotas de 1 mL del cultivo 1, 2, 3 y 4 horas después de la inducción. Las células se centrifugaron a 4000 g a 4°C durante 10 min y el pellet se lisó con 400 µL de buffer de lisis desnaturante (Anexo 1a) toda la noche, a 4°C en agitación constante (10 rpm). Finalmente, los productos de lisis se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot, como se explica detalladamente más adelante.

Por otra parte, se evaluó el efecto de la concentración de IPTG en el nivel de expresión de las proteínas recombinantes, para ello se realizó la inducción con diferentes concentraciones de IPTG (0,2mM, 0,5 mM y 1mM) bajo las condiciones de cultivo anotadas anteriormente. Una vez determinadas, las condiciones óptimas de expresión para cada recombinante, los cultivos se escalaron a un volumen mayor.

3.2.5 Extracción de proteínas solubles e insolubles

Las células recuperadas de los cultivos se lisaron en buffer de lisis nativo (Anexo 1b) y se sometieron a tres ciclos de congelación (15 min a -80°C) y descongelación (30 min en agua con hielo). La muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 min., se recuperó el sobrenadante, del cual una parte se utilizó para purificación de la proteína soluble por cromatografía de afinidad con Ni-NTA agarosa y la otra parte se utilizó como extracto crudo. Los pellets se utilizaron para purificar la proteína insoluble, retenida en cuerpos de inclusión. Para lo anterior, se realizaron dos lavados con buffer (Anexo 1c) y se lisaron con buffer de lisis desnaturizante (Anexo 1a) toda la noche a 4°C , en agitación a 10 rpm. El sobrenadante fue recuperado por ultracentrifugación durante 2 horas a 60.000 g a 4°C y la proteína se purificó por cromatografía de afinidad (sección 3.2.7) bajo dos protocolos, en el primero el sobrenadante se dializó por 16 horas en buffer de diálisis (Anexo 1d) con y sin detergente (Triton X100 0,1%). En el segundo protocolo, el producto se purificó directamente sin dializar.

3.2.6 Análisis de expresión por SDS-PAGE y Western blot

El análisis de la expresión se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), utilizando un gel de separación al 12% y de concentración al 4%, en condiciones desnaturizantes. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular XL-OptiProtein (New England, Biolabs). El Western blot se realizó con anticuerpo monoclonal anti-Histidinas (A7058, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), el cual reconoce la etiqueta de 6-his en el C-terminal que posee cada proteína recombinante. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® SD-Semi-Dry Electroforetic transfer Cell), la cual se sometió a tres lavados de 5 min en con PBS-Tween al 0,05%. Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% durante 1 h. Después de tres lavados, la membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal por 1 h y finalmente se reveló con el kit de sustrato peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, Canadá) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

3.2.7 Purificación bajo condiciones solubles y desnaturizantes

Una vez confirmadas por Western blot las fracciones soluble (S) e insoluble (I), obtenidas en los procesos de extracción antes mencionados, se purificaron por cromatografía de

afinidad en fase sólida con la resina de Ni²⁺-NTA (Qiagen, California, USA) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, con modificaciones menores. En resumen, las fracciones proteicas se acoplaron a la resina durante toda la noche a 4°C a 10 rpm por minuto. La proteína acoplada se transfirió a una columna de purificación, a la cual se adicionó 1 mL de buffer de extracción bajo condiciones solubles (Anexo 1e) para la fracción soluble y 1 mL de buffer de extracción desnaturante (Anexo 1a) para la fracción insoluble y se guardó como la fracción no retenida. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 100 mL de los respectivos buffers de extracción adicionando en el segundo lavado Triton X114 al 0,1% con el fin de eliminar proteínas débilmente unidas a la resina. Para la purificación bajo condiciones desnaturantes, se realizaron 5 lavados adicionales (con 20 mL cada uno) de urea preparada en PBS en concentración descendente (3M, 1,5M, 0,75M, 0,3M, 0M). Posteriormente, la proteína soluble e insoluble se eluyó en 8 fracciones separadas de 2 mL de imidazol en PBS (Anexo 1f) en concentraciones ascendentes (50mM, 75mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM, 300mM y 500mM).

Se hizo seguimiento al proceso de purificación para cada fracción mediante SDS-PAGE y se verificó por tinción con azul de Coomassie y Western blot. Una vez confirmada la pureza de éstas, se dializaron en buffer de diálisis (Anexo 1d) y se concentraron con membranas de ultrafiltración en Amicon® Ultra 4. Finalmente, la cantidad de proteína recuperada se cuantificó con el Kit Micro BCA™ Protein Assay (Thermo scientific, Waltham MA, USA) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

3.3 Caracterización enzimática de las proteínas recombinantes.

Con el fin de caracterizar el tipo de actividad quitinolítica de las proteínas recombinantes purificadas, se utilizaron tres sustratos solubles, los cuales permitieron determinar el tipo de actividad hidrolítica utilizado en la degradación de quitina; una vez determinado el sustrato adecuado para cada enzima, se evaluó la temperatura y pH óptimo.

3.3.1 Determinación de actividad endoquitinasa y exoquitinasa

La actividad enzimática de las proteínas recombinantes purificadas y en los extractos crudos (solubles e insolubles) se evaluó sobre tres sustratos solubles, con el fin de determinar el tipo de actividad hidrolítica.

Para determinar la actividad exoquitinasa se utilizaron dos sustratos: 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina (1mg/mL) y 4-Nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosa (0,2 mg/mL), los cuales permiten detectar específicamente las actividades β -N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.52) y quitobiosidasa, respectivamente. Para evaluar la actividad endoquitinasa (EC 3.2.1.14) se utilizó el sustrato 4-Nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosa (0,5 mg/mL).

La reacción enzimática se llevó a cabo con el kit Chitinase Assay (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA) siguiendo el procedimiento propuesto por la casa comercial. Cada sustrato (90 μ L) junto con la enzima (10 μ L) se adicionaron en una placa de 96 pozos, la reacción fue incubada por 30 minutos a 37°C. Durante el proceso de hidrolisis se libera p-nitrofenol, el cual al detener la reacción con 200 μ L de carbonato de sodio es ionizado a p-nitrofenilato, cuya absorbancia es medida a 405nm. Una unidad de actividad quitinasa se definió como la liberación de una μ mol de p-nitrofenol desde cada sustrato por minuto, bajo las condiciones de la prueba (pH 4,8 a 37°C). Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado. Como control positivo de la reacción enzimática, se utilizó una quitinasa comercial de *Trichoderma viride* (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA), como blanco cada uno de los sustratos sin enzima y como estándar p-nitrofenol.

3.3.2 Determinación de pH óptimo

Con el fin de establecer el pH óptimo de las enzimas recombinantes purificadas, la actividad quitinasa se evaluó con el sustrato sobre el cual la enzima demostró tener mayor actividad quitinasa. El sustrato adecuado se preparó en varias soluciones amortiguadoras dentro de un rango de pH entre 4,0 y 7,0, para lo cual fueron usados: buffer acetato 0,1 M (pH 4,0), buffer citrato trisódico 0,1 M (pH 5,0) y buffer fosfato de potasio 0,1M (pH 6,0 – 7,0). El efecto del pH en la actividad enzimática se evaluó con 10 μ L de proteína recombinante purificada y 90 μ L del sustrato adecuado preparado en buffer con pH diferente, bajo las condiciones de tiempo y temperatura mencionados en la sección 3.3.1. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.3.3 Determinación de temperatura óptima

La determinación del efecto que tiene la temperatura en la actividad quitinasa de la proteína recombinante purificada, se realizó con el sustrato sobre el cual la enzima demostró tener

mayor actividad enzimática; el sustrato adecuado fue preparado en buffer de ensayo según recomendaciones del fabricante (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA). La reacción enzimática se realizó como se mencionó en la sección 3.3.1 durante 30 minutos a diferentes temperaturas de incubación: 25°C, 35°C, 45°C, 55°C y 65°C. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

3.4 Efecto de las quitinasas recombinantes en la actividad insecticida de BV062 sobre larvas de *D. saccharalis*.

3.4.1 Preparación de conidios

Los conidios utilizados en los bioensayos se produjeron en medio sólido sobre agar PDA suplementado con cloranfenicol al 0,1% después de 7 días de incubación. Los conidios se prepararon en una solución concentrada en Tween 80 al 0,1%, la cual fue utilizada para realizar soluciones ajustadas a una concentración de 1×10^6 conidios/mL.

Con el fin de determinar la viabilidad de los conidios utilizados en los bioensayos, se evaluó el porcentaje de germinación, siguiendo la metodología propuesta Santos, (2014) con algunas modificaciones. En resumen, 100mg de conidios recuperados se suspendieron en 900µL de Tween 80 al 0,1% (V/V). Se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-5} y esta última dilución se sembró por triplicado, en agar agua (Sigma) suplementado con extracto de malta al 0,1%, cloranfenicol al 0,1% y Benomil al 0,00015%. Luego de incubar durante 24 horas a 25°C, a un fragmento de 1 cm² se adicionó azul de lactofenol y se realizó el conteo de conidios germinados y no germinados mediante observación de 10 campos ópticos al microscopio. Se consideró como germinado una estructura con un tubo germinal de longitud igual o superior al diámetro del conidio (Y.-J. Zhang et al., 2008).

3.4.2 Determinación de efecto de quitinasa recombinante en la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* Bv062

Con el fin de establecer el efecto que tienen las diferentes mezclas utilizadas en los bioensayos, sobre la viabilidad de los conidios de Bv062, se determinó la velocidad de germinación y elongación del tubo germinal en el tiempo, como sigue.

Se preparó una suspensión de conidios en Tween 0,1% a partir de un cultivo en caja de 7 días, y se ajustó a una concentración de 1×10^8 con/mL, la cual fue utilizada para preparar tres tratamientos: conidios diluidos en Tween 80 al 0,1% (control del hongo), diluidos en quitinasa rChit37 purificada y diluidos en extracto crudo rChit37. Todos los tratamientos se ajustaron a una concentración de 5×10^7 con/mL y a una concentración final de 300 µg/mL de proteína para los tratamientos suplementados con quitinasa cruda y purificada. Una vez ajustadas cada una de las mezclas, los tratamientos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la evaluación del crecimiento del tubo germinal y la tasa de germinación, 100 µL de una dilución 10^{-1} de cada tratamiento se sembró por triplicado en cajas de agar agua suplementado con cloranfenicol y extracto de malta al 0,1%, se incubaron a 25°C y se tomaron muestras de cada tratamiento por triplicado de aproximadamente 1 cm^2 de agar, cada 4 horas a partir de las 12 horas de incubación, se tiñeron con azul de lactofenol para su observación al microscopio y se registraron fotográficamente bajo el mismo aumento, con una barra de escala previamente calibrada.

La longitud neta de los tubos germinales, definida como la longitud del tubo sin el diámetro de la espora (Nguyen, Bodiroga, Kelemen, Joo, & Gwinn, 2010), se estimó realizando las mediciones con el programa ImageJ 1.52a (Rasband, n.d.); los datos obtenidos fueron sometidos a una transformación logarítmica, seguido por una regresión lineal; una vez confirmada la normalidad de los mismos, los datos transformados fueron usados para calcular la velocidad de elongación y finalmente se sometieron a un ANOVA ($p < 0,05$).

Asimismo, fueron registrados los conidios germinados y no germinados. Los datos de las tres replicas por tratamiento, fueron utilizados para calcular la tasa de germinación en el tiempo. La razón de cambio se calculó y analizó mediante un ANOVA y prueba de Tukey (95%) utilizando el programa estadístico Statistix (8,0).

3.4.3 Ensayos de actividad insecticida sobre larvas de *D. saccharalis*

Se realizó un bioensayo, en el que se aplicaron 2 µL de cada tratamiento (Tabla 3) sobre el dorso de larvas de *D. saccharalis* de segundo instar (García et al., 2018). Una vez inoculadas, las larvas se individualizaron en un recipiente de media onza con una dieta natural consistente en un grano de maíz tierno. Cada tratamiento constó de 15 larvas

ubicadas en un recipiente Selloplus®, las cuales se mantuvieron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Adicionalmente, los bioensayos tuvieron un testigo absoluto en el que las larvas no recibieron ningún tratamiento. El diseño experimental fue completamente aleatorio con tres repeticiones por tratamiento.

La mortalidad se evaluó cada dos días hasta el día 14 posterior a la infección. La eficacia fue calculada mediante la fórmula de Schneider – Orelli (Zar, 1999). Para la comparación de tratamientos, inicialmente se determinó la normalidad de los datos por la prueba de Barlett (95% de confianza), posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante comparación de medias por la prueba de Tukey (95%) utilizando el programa estadístico Statistix (8,0). Los tiempos letales medio (TL_{50}) y 90 (TL_{90}) se estimaron mediante análisis probit (Throne, Weaver, Chew, & Baker, 1995) con el programa BioStat versión 5,8,1.

Tabla 3: Tratamientos de ensayo biológico. Descripción de los tratamientos evaluados para determinar el efecto de quitinasas recombinantes en la actividad insecticida de *B. bassiana* sobre larvas de *D. saccharalis*

Tratamiento	Descripción	Conidios (con/mL)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
Testigo absoluto	-	-	-
1	Bv062 (Bv)	1×10^6	0
2	rChit37*	0	200
3	rChit37*	0	300
4	EC rChit37**	0	200
5	EC rChit37**	0	300
6	Bv + rChit37*	1×10^6	200
7	Bv + rChit37*	1×10^6	300
8	Bv + EC rChit37**	1×10^6	200
9	Bv + EC rChit37**	1×10^6	300

* Quitinasa recombinante de Bv062, purificada bajo condiciones solubles.

**Extracto crudo soluble obtenido de la fracción citoplasmática de *E. coli* recombinante.

3.4.4 Análisis estadístico

Para todos los datos, los valores de las medias y desviación estándar se calcularon a partir de las mediciones de cada una de las réplicas. Se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro Wilk y la homocedasticidad mediante la prueba de Barlett con un nivel de confianza del 0,05. Una vez confirmados estos supuestos, se determinó la diferencia entre tratamientos a través de un análisis de varianza (ANOVA) y la significancia estadística se evaluó por comparación de medias con una confiabilidad del 95% mediante la prueba de Tukey, utilizando el programa estadístico Statistix (8,0).

4 Resultados y discusión

4.1 Caracterización *in silico*

Con el fin de seleccionar dos ORF como candidatos para la expresión y producción de proteínas recombinantes, se obtuvo las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de quitinasas de los genomas completamente secuenciados de dos aislamientos colombianos previamente reportados como agentes entomopatógenos: el granulovirus SpfrGV VG008 (INSDC: KM371112 y RefSeq: NC_026511.1) y el hongo *B. bassiana* Bv062 (Datos propios, no publicados) y posteriormente, se sometieron a un análisis bioinformático con herramientas disponibles en línea.

4.1.1 Análisis bioinformático de las quitinasas de SpfrGV VG008

En un trabajo previo (Cuartas et al., 2015) utilizando la tecnología 454 (GS) FLX™ Standard (Roche), se secuenció el genoma completo del granulovirus SpfrGV VG008 (GenBank: KM371112), en el cual se identificaron 4 potenciales genes de quitinasas (Figura 10). El ORF de Chit1 (GeneID:[23632012](#)) tiene una longitud de 300 pb y codifica para una proteína de 99 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 11,43 kDa y un punto isoeléctrico (P.I) teórico de 4,74 (Figura 10 A). Los ORFs Chit2A (GeneID: [23632073](#)) y Chit2C (GeneID:[23632136](#)) tienen 489 pb y codifican proteínas de 162 aminoácidos, con pesos moleculares estimados de 18,6 y 17,61 kDa, respectivamente, y un P.I teórico para la primera de 4,74 y para la segunda de 4,34 (Figura 10 B y D). El ORF Chit2B (GeneID:[23632074](#)) de 480 pb codifica una proteína de 159 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 18,64 kDa y un P.I de 4,44 (Figura 10 C).

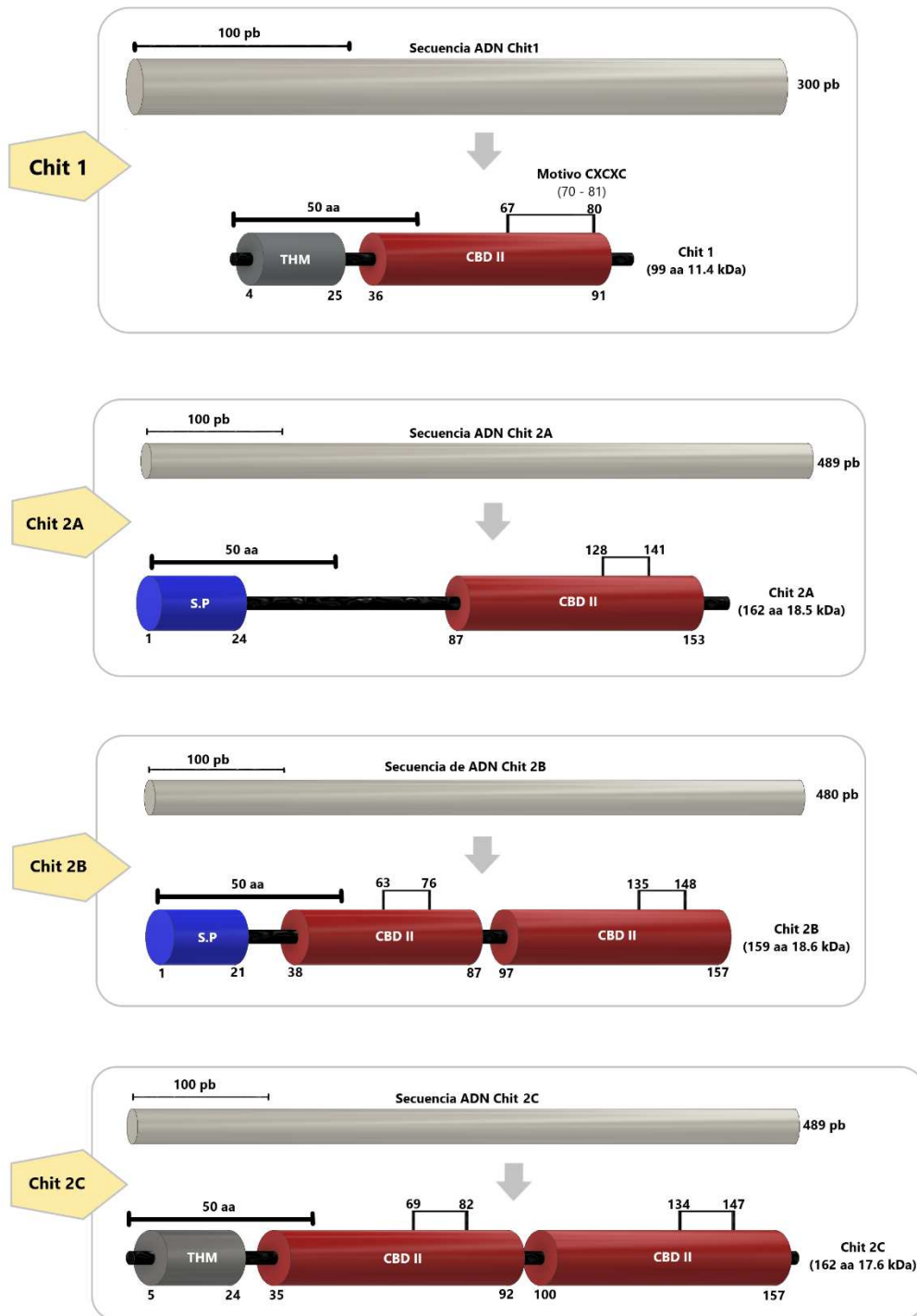


Figura 10. Representación esquemática de los ORF de *SpfrGV* VG008 que codifican las proteínas Chit1 (A), Chit2A (B), Chit2B (C) y Chit2C (D). Se observa en gris, las secuencias codificantes de ADN para cada ORF. En los esquemas de proteínas se resaltan las regiones, motivos y dominios (localización indicada en números) predichos por el programa PrositeScan. El diagrama muestra en gris la región transmembranal (THM), en

azul el péptido señal (S.P), en rojo los dominios de unión a quitina II (CBDII) y los corchetes, representan puentes disulfuro. Fuente propia.

Según el análisis funcional de las secuencias de aminoácidos, utilizando las herramientas InterProScan y ScanProSite, no fue posible clasificar bioinformáticamente las proteínas de SpfrGV VG008, dentro de ninguna de las tres familias de glicósido hidrolasas (GH18, GH19 y GH20) en las que son clasificadas las quitinasas (Henrissat et al., 1991). Este resultado contrasta con lo encontrado para las quitinasas presentes en los genomas completamente secuenciados de 8 de 16 aislamientos de granulovirus revisados (Anexo 2) y reportados en GenBank (NC_03921.1, NC_022646, NC_002816, NC_018875, NC_013772, NC_013797, NC_002331, NC_010240), los cuales tienen un gen quitinasa, que codifica para una proteína GH18 de entre 570 y 590 aminoácidos, que no presentan dominios de unión a quitina. Sin embargo, a modo general, las cuatro proteínas del aislamiento VG008, catalogadas como quitinasas, presentan similitud con secuencias de proteínas en los genomas de los granulovirus arriba mencionados, así como con proteínas de los granulovirus de *Choristoneura fumiferana* CoGV (NC_008168), *Mythima unipuncta* MyunGV (NC_033780) y *Mocis latipes* MolaGV (NC_029996) que no poseen secuencias quitinasas de la familia GH18, pero presentan secuencias proteicas, de tamaño similar al estimado para las de VG008, con la presencia de 1 o 2 dominios de unión a quitina tipo II (CBDII).

Las proteínas Chit1 y Chit2A presentan solamente un dominio de unión a quitina tipo II (CDBII), ubicado en los residuos 36-91 y 87-153 respectivamente; mientras que las Chit2B y Chit2C poseen dos dominios en los residuos 38-87 y 97-157 para la primera, y 5-92 y 100-157 para la segunda (Figura 10B). El CBDII pertenece a la topología tipo A de los dominios de unión a carbohidratos y se caracteriza por tener un plegamiento de hojas β "sándwich" que tiene una superficie hidrofóbica de residuos aromáticos que permite su interacción con la superficie de polisacáridos cristalinos como la quitina; es propio de animales y baculovirus, se caracteriza por tener un motivo conservado de 6 residuos de cisteína C-x(13,20)-C-x(5,6)-C-x(9,19)-C-x-(10,14)-C-x(4,14)-C (Guillén & Sánchez, 2010). No obstante, aunque todas las proteínas de SpfrGV presentan entre 5 y 6 cisteínas y un puente disulfuro en la región C-terminal por cada CBDII, el motivo C solo se predijo para la Chit1.

El análisis de identidad y similitud por alineamiento local utilizando el algoritmo Blastp, mostró que las quitinasas más cercanas a las proteínas Chit1, Chit2A y Chit2B son las de los granulovirus de *Xestia c-nigrum*, *Pseudaletia unipuncta*, *Helicoverpa armigera*, *Mythimna unipuncta* y *Mocis latipes* (Tabla 4); todos caracterizados por utilizar como hospederos, insectos del orden Lepidoptera y la familia Noctuidae, que han sido reportados como plagas en diferentes especies de gramíneas y herbáceas. Entre las quitinasas de VG008, Chi1 presenta la mayor identidad (> 70%) y similitud (> 90%) con proteínas de granulovirus previamente reportadas, con las cuales comparte la presencia de un solo dominio CDB II y su correspondiente motivo de cisteínas, en una región altamente conservada.

Las quitinasas 2A y 2B son similares entre sí y son similares con proteínas hipotéticas de GV previamente reportadas (Tabla 4). Por su parte, la quitinasa 2C presenta mayor similitud con proteínas hipotéticas de arácnidos y moluscos, que posiblemente son peritrofinas; sin embargo, la identidad con estas proteínas no supera el 32%, lo que se debe a la variación en tamaño y al gran número de CBD (3-11) que presentan las peritrofinas hipotéticas.

Tabla 4. Identidad y similaridad de proteínas de SfGV VG008 con proteínas hipotéticas en otros betabaculovirus

PROTEÍNAS SfGV VG008	PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS				
	XecnGV	PsunGV	HaGV	MolaGV	MyunGV
Chit1	ORF 11 (NP_059159.1) [84% - 93%]	PsunGV_gp010 (YP_003422349.1) [84% - 94%]	HaGV_gp010 (YP_001648992.1) [83% - 92%]	ORF-10 (YP_009249848.1) [80% - 91%]	chitin-binding protein 1 (YP_009345729.1) [76% - 90%]
	Chit2A	ORF 87 (NP_059235.1) [29% - 55%]	PsunGV_gp090 (YP_003422429.1) [30% - 51%]	HaGV_gp085 (YP_001649067.1) [30% - 55%]	ORF-71 (YP_009249909.1) [30% - 51%]
Chit2B		ORF 87 (NP_059235.1) [35% - 55%]	PsunGV_gp090 (YP_003422429.1) [41% - 56%]	HaGV_gp085 (YP_001649067.1) [39% - 57%]	ORF-71 (YP_009249909.1) [39% - 56%]
Chit2C	ORF 20 (NP_059168.1) [31% - 53%]	-	-	-	-

(Número de accesión, base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information)
[% de identidad - %similaridad])

La predicción de topología transmembrana y péptido señal, realizados con diferentes herramientas bioinformáticas, muestra diferencias en la posición y presencia de este tipo de regiones hidrofóbicas; así, algunos predictores ubican en el mismo sitio el péptido señal y las regiones transmembranales. En todos los casos, los predictores TMHMM server V 2.0 y HMMTOP V 2.0, predijeron 1 dominio transmembranal, con longitudes variables dentro de los primeros 25 aminoácidos y en las mismas regiones, la herramienta Phobius predijo la presencia de un péptido señal para las quitinasas Chit2A y Chit2B, entre los aminoácidos 1-24 y 1-21, respectivamente. Para resolver esta inconsistencia, se estableció una región consenso para las hélices transmembrana predichas y se utilizó el predictor SignalP V 4.1 server, el cual utiliza un algoritmo de predicción basado en redes neuronales, que permite discriminar entre péptidos señal (con sus respectivos sitios de clivaje) y hélices transmembrana, presentes en la región N-terminal. Previamente han sido reportados péptidos señal de tipo eucariota en quitinasas de Alfabaculovirus como la CHIA de AcMNP (Hodgson, 2011) y en los granulovirus CpGV (Daimon *et al.*, 2007) y EpapGV (Salvador, 2010); sin embargo, su función aun continua sin elucidar.

La predicción de localización subcelular, arrojó que la Chit2A se encuentra en el citoplasma del hospedero, a diferencia de las Chit1, Chit2B y Chit2C para las que se predijo su ubicación en el retículo endoplasmático (R.E) del hospedero; lo que es inusual, pues no se predijo para ninguna de las proteínas, es la presencia de dominios C-terminales como el KDEL, característico de las quitinasas de nucleopoliedrovirus, el cual señala la retención de la proteína en el R.E. durante la primera fase de la infección y permite su liberación en la fase final (Hodgson, 2011), así como tampoco se predijo la presencia de motivos PKD, que han sido encontrados en algunas quitinasas de granulovirus (T. Daimon *et al.*, 2007).

La caracterización bioinformática de las secuencias del granulovirus SprfGV VG008 antes descrita permitió tener un acercamiento a las características fisicoquímicas, arquitectura proteica en términos de dominios y motivos, y determinar la similitud con otro tipo de proteínas. Con base en dicha información y con el fin de proseguir con la caracterización proteómica y biológica, se hizo la abstracción funcional de los ORFs, a partir de la cual se diseñaron juegos de cebadores específicos para las 4 proteínas, excluyendo señales de localización y regiones hidrofóbicas, para su posterior clonación y producción recombinante en el sistema de expresión *E. coli*.

4.1.2 Análisis bioinformático de las quitinasas de *B. bassiana* BV062

La secuencia genómica completa del hongo *B. bassiana* cepa Bv062 (no publicado), fue obtenida usando el método de Secuenciación de Molécula Única en Tiempo Real (SMRT) de la compañía Pacific Biosciences. En este genoma, se identificaron tres genes quitinasa (Figura 11). El ORF Bb01_00452 tiene 2.870 pb, posee 9 exones que codificarían para una proteína de 599 aminoácidos (contemplando todos los exones), con una masa molecular de 66,5 kDa y un P.I teórico de 5,87 (Figura 11 A). El ORF Bb01_03026 tiene 1,456pb, posee 4 exones y su producto, en su versión íntegra, sería una proteína de 423 aminoácidos, para la cual se predijo una masa molecular de 44,4 kDa y un P.I de 5,03 (Figura 11 B). A diferencia de los otros genes, *Bb01_03008* no posee regiones intrónicas y consiste de un ORF de 1.047 pb, codificante para una proteína de 348 aminoácidos, con una masa molecular y P.I predicho de 36,7 kDa y 5,94, respectivamente (Figura 11 C). Con el fin de denominar cada uno de los productos génicos obtenidos de los ORF descritos anteriormente, se designó a cada molécula el prefijo -Chit- (del inglés Chitinases), seguido de un número, correspondiente a la masa molecular predicha; así, las quitinasas del aislamiento Bv062 se mencionarán en adelante como Chit66, Chit44 y Chit37.

Una vez analizadas las secuencias de aminoácidos, se predijo que ninguna de las tres proteínas tiene hélices transmembrana y que únicamente la quitinasa Chit37 posee un péptido señal (P.S) ubicado en las posiciones 1-22 con un sitio de clivaje entre los residuos 22 y 23 (Figura 11 B), adicionalmente, con el programa Bacello, se predijo la localización subcelular como extracelular (Pierleoni et al., 2007), lo que sugiere que puede tratarse de una proteína secretada. La proteína Chit44 también se predijo como una proteína secretada; sin embargo, según el predictor SecretomeP 2.0 (disponible en línea), la molécula no presenta una etiqueta de secreción clásica N-terminal ni otro tipo de señalización que permita establecer una ruta de secreción no convencional, a diferencia de la reportada para la endoquitinasa Cts1 del hongo *Ustilago maydis* (Stock et al., 2012). Por su parte, la predicción de la localización de la quitinasa Chit66 arrojó como resultado que se trata de una proteína intracelular.

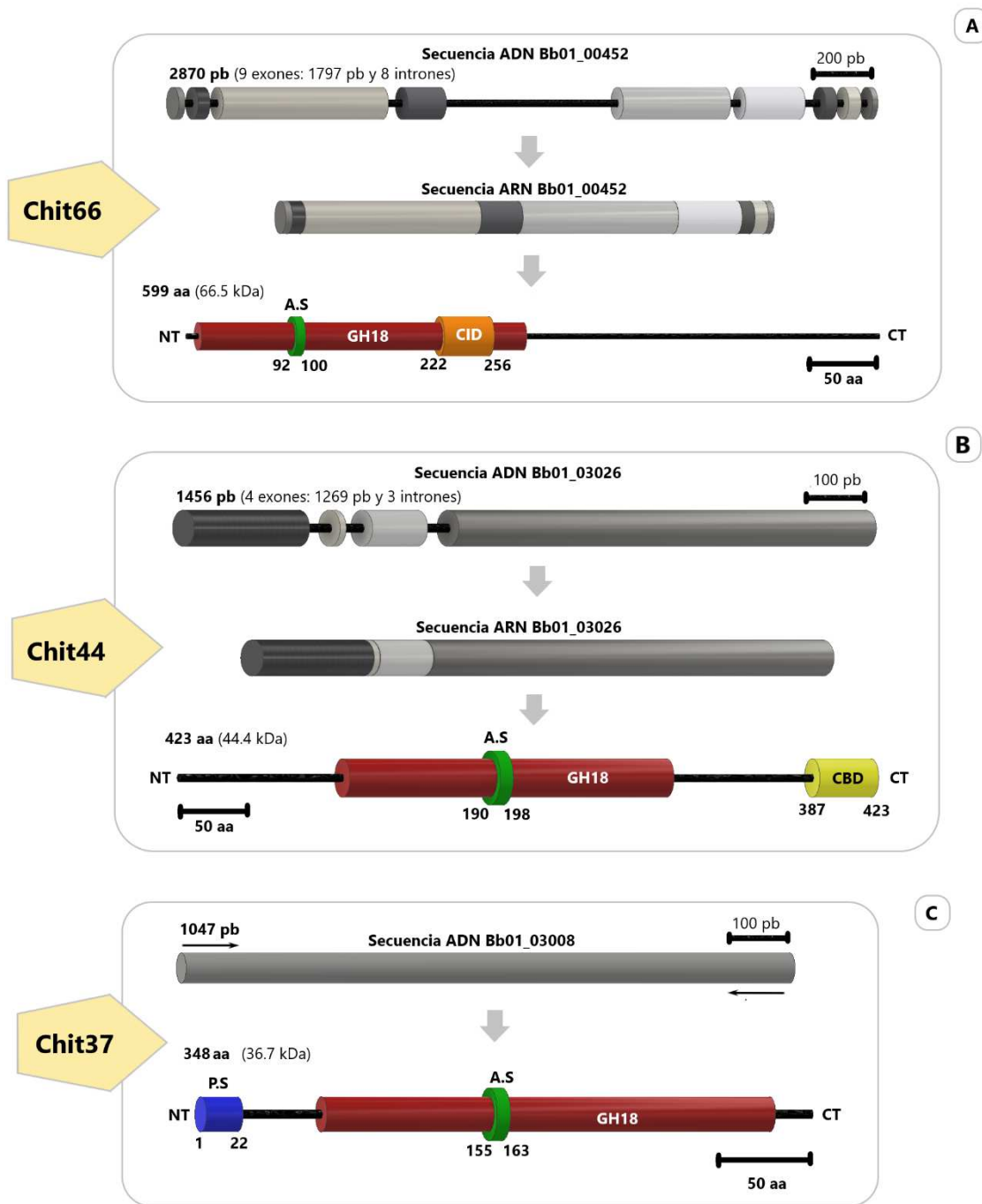


Figura 11 Representación esquemática de los ORF de Bv062 que codifican para **Chit66 (A)**, **Chit44 (B)** y **Chit37 (C)**. Se observa en gris, las secuencias codificantes de ADN y ARN para cada ORF; los módulos en escalas de grises representan exones y las barras negras regiones intrónicas. En los esquemas de proteínas se resaltan las regiones, motivos y dominios (localización indicada en números) predichos por el programa

Prositescan. El diagrama muestra en azul el péptido señal (P.S), en rojo el dominio catalítico glicosido hidrolasa de la familia 18, en verde el sitio activo (AS), en naranja el dominio de inserción quitinasa (CID) y en amarillo el dominio de unión a celulosa. Fuente propia.

Previamente, se propuso que la virulencia de hongos está determinada por enzimas extracelulares de tipo quitinasa y proteasa (Michael J. Bidochka & Khachatourians, 1991; Mondal et al., 2016); adicionalmente, se encontró que quitinasas extracelulares no se encuentran relacionadas con procesos morfogénicos, como se comprobó al disrumpir las quitinasas ChiB1p de *A. fumigatus* y Cts1p de *Coccidioides immitis* (Jaques et al., 2003; Reichard, Hung, Thomas, & Cole, 2000). Se considera que este tipo de enzimas juegan un papel importante en la degradación de quitina exógena para la obtención de energía, a diferencia de las quitinasas que no poseen una señal secretora, las cuales están relacionadas con la morfogénesis (Duo-Chuan, 2006), como fue predicho para la quitinasa intracelular III de *Rhizopus oligosporus* (Takaya, Yamazaki, Horiuchi, Ohta, & Takagi, 1998). Por lo anterior, este trabajo plantea que la proteína Chit37, posiblemente tiene un papel importante en la primera fase de invasión del hongo al hospedero, en lo que respecta a la degradación de quitina presente en la cutícula del insecto.

La predicción de dominios funcionales, mostró que las tres proteínas poseen los motivos SxGG y DxxDxDxE característicos del sitio activo (Terwisscha van Scheltinga, Kalk, Beintema, & Dijkstra, 1994) en el dominio catalítico glicosido hidrolasa de la familia 18 (Figura 11 B), grupo en el que son clasificadas la mayoría de quitinasas de hongos (Meng, et al., 2015), a excepción de la quitinasa NbChiA del hongo *Nosema bombycis* ubicada en la familia 13 (Han et al., 2016) y la β -N-acetilglucosaminidasa del hongo *Rhizomucor miehei* perteneciente a la familia 3 (Yang et al., 2014).

Con base en la categorización por subgrupos de las quitinasas fúngicas propuesta por Seidl (2008), los resultados permiten sugerir la clasificación de las proteínas Chit66 y Chit37 en el sub grupo A, al que pertenecen las quitinasas previamente clasificadas como tipo V. La quitinasa Chit66 presenta un dominio de inserción quitina (CID) entre los aminoácidos 222-256, el cual puede ser encontrado en el grupo A, pero está ausente en los subgrupos B y C (Li & Greene, 2010). Las dos quitinasas (Chit66 y Chit37) no poseen módulos de unión a carbohidratos, característica que las diferencia de las proteínas del subgrupo B (Tipo III), dentro del que se sugiere la clasificación de la quitinasa Chit44, pues se encontró que presenta un módulo de unión a celulosa (CDB) en su extremo C terminal, entre los

aminoácidos 387 - 423. Teniendo en cuenta que las quitinasas tipo V se caracterizan por poseer en el sitio activo un surco de unión a sustrato profundo en forma de túnel, mientras que las tipo III tienen surcos poco profundos y abiertos, lo que corresponde a enzimas procesivas y no procesivas, respectivamente (Seidl, 2008), se propone que las proteínas Chit66 y Chit37 pueden ser exoquitinasas y la Chit44 endoquitinasa.

La comparación con otras secuencias reportadas en GenBank a través del algoritmo Blastp, arrojó como resultado que en general las tres quitinasas de BV062, presentan un alto porcentaje de identidad con las cepas de *Beauveria bassiana* ARSF2860 y D1-5. En el caso de la proteína Chit66, se encontró que la región N terminal es la más conservada. La Chit44, mostró identidad superior al 76% con quitinasas de hongos de la familia Cordycipitaceae y por encima del 68% con enzimas de diferentes especies de hongos entomopatógenos de la familia Clavicipitaceae, con las que comparte la presencia en el C terminal de un CDB. Específicamente, a nivel de aminoácidos se encontró que Chit37 es una proteína altamente conservada (Figura 12), tanto con endoquitinasas en especies de otros hongos entomopatógenos, encontrándose identidad superior al 85% en proteínas pertenecientes al género *Cordyceps* (OAA72018.1 y OAA46530.1, XP_018706707.1, ATY58848.1 y XP_006670951.1) y superior al 80 % con especies de los géneros *Metarhizium* (KFG86059.1, XP_007824504.1, XP_014539654.1) y *Purpureocillium* (OAQ69415.1), así como en cepas de su misma especie, presentando un porcentaje de identidad de 100% con la quitinasa de la cepa D1-5 (KGQ05237.1) y de 99% con las cepas ARSF2860 (XP_008599636.1), (AEG21075.1), (ADP44708.1), (ACZ28129.1) y (AAN41259.1); esta última codifica para una endoquitinasa Bbchit 1, previamente estudiada (Fan, Fang, et al., 2007; Fan, Zhang, et al., 2007) y sobreexpresada por Fang y colaboradores (2005), demostrando que incrementa la virulencia de la cepa mutante de *B. bassiana* sobre áfidos. Estos resultados y el grado de conservación de esta proteína sugieren que Chit37 puede ser un factor determinante en la patogenicidad de la especie.

Sin embargo, a pesar de la alta similitud en la secuencia de aminoácidos, se ha encontrado que especies diferentes y aislamientos de la misma especie de hongos entomopatógenos, se comportan diferente y varían dependiendo del hospedero, condiciones ambientales y pequeños cambios a nivel de aminoácidos (como los reportados para la Chit37 en los aminoácidos 30 y 264 respecto a Bbchit 1), lo que puede estimular una divergencia

funcional, que les permite evolucionar en el ecosistema y establecer interacciones específicas con su hospedero (Mondal et al., 2016).

Teniendo en cuenta las características *in silico* predichas para las quitinasas del hongo BV062, en lo que atañe al tipo de secreción y su posible papel en los procesos infecciosos, se seleccionó la proteína Chit37, para evaluar el efecto que tiene su uso como aditivo en la actividad insecticida del hongo *B. bassiana* BV062 sobre larvas de *D. saccharalis*.

ATY58848.1 MAPFLQTGLALLPLLLASSAVSASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 XP_006670951.1 MAPFLQTGLALLPLLLASSAVSASPLAPCADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 XP_018706707.1 MAPFLQTSLALLP-LLASTMVGASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 OAA72018.1 MAPSLQNSLALLP-LLASTMVGASPLTPRADTCATKGRPAGKVVQGYWENWDGAKNGVHP
 OAA46530.1 -----MVDASPLAPRADTCATKGRPAKVQGYWENWDGAKNGVHP
 ACZ28129.1 MAPFLQTSLALLL-CVASTMVSASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 KGQ05237.1 -----MVSASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
Bb01_03008 MAPFLQTSLALLP-LLASTMVSASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 ADP44708.1 MAPFLQTSLALLS-LLASTMVSASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 AAN41259.1 MAPFLQTSLALLP-LLASTMVSASPLAPRAGTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 AEG21075.1 MAPFLQTSLALLP-LLASTMVSASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 OAQ69415.1 MAGLLKTGLVLLG----STLVAAAPLTERADTCATKGRPSGKVLQGYWENWDGSSNGVHP
 KFG86059.1 MAPLLHTGLVMLP-LIVSTLLGMPAFQNETCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 XP_007824504.1 MAPLLNTGLVILP-LIVSTLLGMPAFQNETCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 XP_014539654.1 MAPLLNTGLVILP-LIVSTLLGPIPAFQNETCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHP
 : . * *****.*:.*:*****:.*:*****

ATY58848.1 PFGWTPITNPVIRQHGYNVINAAFPVIYPDGTAMWEDGMDAGVKVATPAEMCAAKAAGAT
 XP_006670951.1 PFGWTPITNPVIRQHGYNVINAAFPVIHPDGTVMWEDGMDAGVKVATPAEMCAAKAAGAT
 XP_018706707.1 PFGWTPIQNPDIRAHGYNVLSAAFPVILPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCAAKAGAT
 OAA72018.1 PFGWTPIQNPDIRKHGYNVINAAFP IILPDGTALWEDGMDTDVKVATPAEMCAAKAAGAT
 OAA46530.1 PFGWTPIQNPEIRKHGYNVINAAFPVIQPDGTAHWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGAT
 ACZ28129.1 PFGWTPIQNPDIRKHGYNVINAAFP IIQPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGAT
 KGQ05237.1 PFGWTPIQNPDIRKHGYNVINAAFP IIQPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGAT
Bb01_03008 PFGWTPIQNPDIRKHGYNVINAAFP IIQPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGAT
 ADP44708.1 PFGWTPIQNPDIRKHGYNVINAAFP IIQPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGAT
 AAN41259.1 PFGWTPIQNPDIRKHGYNVINAAFP IIQPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGAT
 AEG21075.1 PFGWTPIQNPDIRKHGYNVINAAFP IIQPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGAT
 OAQ69415.1 PFGWVPI TDSRIKQHGYNVINAAFPVIRSDGTALWEDGMDTGKVATPAEMCAAKAAGAT
 KFG86059.1 PLGWIP IQDARIRQHGYNVI SAAFPVILPDGTALWEDGMDANVKVATPAEMCAAKAAGAT
 XP_007824504.1 PFGWTP IQDAQIRQHGYNVI SAAFPVILPNTALWEDGMDANVKVATPAEMCAAKAAGAT
 XP_014539654.1 PFGWTAIQDAQIRQHGYNVI SAAFPVILPNTALWEDGMDANVKVATPAEMCAAKAAGAT
 : . * : . . *****:.*:.*:*****:.*:.*:*****:.*:.*:*****

ATY58848.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADKFIATIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGGGSFSSLSLSQ
 XP_006670951.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADKFIATIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGGGSFSSLSLSQ
 XP_018706707.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADKFIATIVPILKKYNE **DGIDIDIE**AGLTGSGSITLSLSQ
 OAA72018.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**AGLTGSGNINTLSLSQ
 OAA46530.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGTGNINTLSLSQ
 ACZ28129.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGTGNINTLSLSQ
 KGQ05237.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGTGNINTLSLSQ
Bb01_03008 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGTGNINTLSLSQ
 ADP44708.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGTGNINTLSLSQ
 AAN41259.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGTGNINTLSLSQ
 AEG21075.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGIDIDIE**SGLTGTGNINTLSLSQ
 OAQ69415.1 ILMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKKYNE **DGVDIDIE**TGLSGSGNINLSLSQ
 KFG86059.1 IVMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKQYNE **DGVDIDIE**AGLSGSGTFTLSLSQ
 XP_007824504.1 IVMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKRYNE **DGVDIDIE**AGLSGSGTIGTLSLSQ
 XP_014539654.1 IVMSIGGATAAIDLSSAAVADK FVSTIVPILKRYNE **DGVDIDIE**AGLTGSGTIGTLSLSQ
 :*:*****:.*:*****:.*:*****:.*:*****:.*:*****:.*:*****:.*:*****

ATY58848.1 TNLIRI IDGVLAQMPNFGFLTMAPETAYVTGGSVTYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 XP_006670951.1 TNLIRI IDGVLAQMPNFGFLTMAPETAYVTGGSVTYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 XP_018706707.1 ANLIRI IDGILAQMPANFGFLTMAPETAYVTGGSVTYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 OAA72018.1 ANLIRI IDGVLAQMPNFGFLTMAPETAYVTGGSVTYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 OAA46530.1 ANLIRI IDGVLAQMPNFGFLTMAPETAYVTGGSVTYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 ACZ28129.1 TNLIRI IDGVLAQMPANFGFLTMAPETAYVTGGTITYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 KGQ05237.1 TNLIRI IDGVLAQMPANFGFLTMAPETAYVTGGTITYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
Bb01_03008 TNLIRI IDGVLAQMPANFGFLTMAPETAYVTGGTITYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 ADP44708.1 TNLIRI IDGVLAQMPANFGFLTMAPETAYVTGGTITYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 AAN41259.1 TNLIRI IDGVLAQMPANFGFLTMAPETAYVTGGTITYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 AEG21075.1 TNLIRI IDGVLAQMPANFGFLTMAPETAYVTGGTITYGSIWGSYLP I IKKYLDNGLRLLWLN
 OAQ69415.1 ANLIRI IDGILAAMPNFGFLTMAPETAYVTGGSVTYGSIWGSYLP I IKKYADNGLRLLWLN

```

KFG86059.1      ANLVRIIDGILAQMPSNFGLTMAPETAYVTGGSVTYGAIWGAYLPIIKKYADNGRLWWLN
XP_007824504.1 ANLVRIIDGILAQMPSNFGLTMAPETAYVTGGSVTYGAIWGAYLPIIKKYADNGRLWWLN
XP_014539654.1 ANLVRIIDGILAQMPSNFGLTMAPETAYVTGGSVTYGAIWGAYLPIIKKYVDNGRLWWLN
                  :*:*:*:*:*: * * . *****:.*: * *:*:*:*: * * * * *
                  :*:*:*:*:*: * * . *****:.*: * *:*:*:*: * * * * *

ATY58848.1      MQYYNGAMYGCAGDSYQAGTVAGFTAQTDCLNKGLTIQGVTIKIPYDKQVPLPAQPAG
XP_006670951.1 MQYYNGAMYGCAGDSYQAGTVAGFTAQTDCLNKGLTIQGVTIKIPYDKQVPLPAQPAG
XP_018706707.1 MQYYNGAMYGCAGDSYEAGTVKGFQAQTDCLNSGLTIQGVTIKIPYDKQVPLPAQPAG
OAA72018.1      MQYYNGAMYGCAGDSYEAGTVNGFIAQTDCLNKGLTVQGVTVKIPYDKQVPGIPAQPAG
OAA46530.1      MQYYNGEMYGCSGDSYKAGTVEGFIAQTDCLNKGLTIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPAG
ACZ28129.1      TQYYNGEMYGCSGDSHKAGTVEGFVAQTDCLNKGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPAG
KGQ05237.1      MQYYNGEMYGCSGDSHKAGTVEGFVAQTDCLNKGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPAG
Bb01_03008    MQYYNGEMYGCSGDSHKAGTVEGFVAQTDCLNKGLTIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPAG
ADP44708.1      MQYYNGEMYGCSGDSHKAGTVEGFIAQTDCLNKGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPAG
AAN41259.1      MQYYNGEMYGCSGDSHKAGTVEGFIAQTDCLNKGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPAG
AEG21075.1      MQYYNGEMYGCSGDSHKAGTVEGFIAQTDCLNKGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPAG
OAQ69415.1      MQYYNGAMYGCSGDSYSAGTVEGFVAQTDCLNKGLVIQGTTIKVPYDMQAPGLPAQSGAG
KFG86059.1      MQYYNGAMYGCSGDSYEAGTVKGFVAQTDCLDKGLVIQGTTIKVPYDKQVPLPAQSGAG
XP_007824504.1 MQYYNGDMYGCSGDSYKAGTVEGFVAQTDCLNKGLVIQGTTIKVPYDKQVPLPAQSGAG
XP_014539654.1 MQYYNGNMYGCSGDSYSAGTVEGFVAQTDCLDKGLVIQGTTIKVPYDKQVPLPAQSGAG
                  ***** :*:*:*:*: * * . *****:.*: * *:*:*:*: * * * * *

ATY58848.1      GGYMSTANVAQVRLARYNGALKGLMTWSINWDGSKAWTFGDNVKAALRTT
XP_006670951.1 GGYMSTANVAQVRLARYNGALKGLMTWSINWDGSKAWTFGDTVKAALRTT
XP_018706707.1 GGYMSTANVAQVILSNYNGKLGKGLMTWSLNWDGSKAWTFGDNVKGALGTA
OAA72018.1      GGYMSTSNVAQVLSHYNGALKGLMTWSLNWDGSKGWF GDNVKGTLGTA
OAA46530.1      GGYMSTSNVAQVLSHYKALKGLMTWSLNWDGSKNWF GDNVKGTLGTA
ACZ28129.1      GGHMSPSNVAQVLSHYKALKGLMTWSLNWDGSKNWF GDNVKGTLGTA
KGQ05237.1      GGHMSPSNVAQVLSHYKALKGLMTWSLNWDGSKNWF GDNVKGTLGTA
Bb01_03008    GGHMSPSNVAQVLSHYKALKGLMTWSLNWDGSKNWF GDNVKGTLGTA
ADP44708.1      GGHMSPSNVAQVLSHYKALKGLMTWSLNWDGSKNWF GDNVKGTLGTA
AAN41259.1      GGHMSPSNVAQVLSHYKALKGLMTWSLNWDGSKNWF GDNVKGTLGTA
AEG21075.1      GGHMSPSNVAQVLSHYKALKGLMTWSLNWDGSKNWF GDNVKGTLGTA
OAQ69415.1      GGYMSPSLVGQAWDHYNGSLKGLMTWSINWDGSKGWFADNLKGRGLGTA
KFG86059.1      GGYMSPSLVGQAWDHYNGSLKGLMTWSINWDGSKNWF GDNVKGRL---
XP_007824504.1 GGYMSPSLVGQAWDHYNGSLKGLMTWSINWDGSKGWF GDNVKGRL---
XP_014539654.1 GGYMSPSLVGQAWDHYNGSLKGLMTWSINWDGSKNWSFGDNVKGRL---
                  **:*. . * . * . * * *:*:*:*: * * * * * *:*. . * . *

```

Figura 12. Alineamiento de secuencias proteicas similares a Chit37 (Bb01_03008). Los símbolos debajo de cada columna indican el porcentaje de identidad de los residuos: 100% (*), 80% (:), y 50% (.). El sombreado en gris indica la región correspondiente al dominio glicosidasa hidrolasa GH18 y las letras en fondo blanco en esta región muestran variaciones de los residuos respecto a la secuencia de Chit37, en fondo negro se encuentran dos motivos consenso: el motivo de unión a sustrato SXGG (letras blancas) y el motivo del dominio catalítico DXXDXDXE (letras azules), donde X es cualquier aminoácido; se encuentra en negrita el ácido glutámico reconocido como el residuo catalítico. A la izquierda se encuentran los códigos de las secuencias utilizadas para el alineamiento, las cuales incluyen secuencias de *Beauveria bassiana* (AEG21075.1), (ADP44708.1), (AAN41259.1), (ACZ28129.1), (KGQ05237.1); *Cordyceps* (OAA46530.1), (OAA72018.1), (XP_018706707.1), (ATY58848.1), (XP_006670951.1); *Purpureocillium* (OAQ69415.1) y *Metarhizium* (KFG86059.1), (XP_007824504.1), (XP_014539654.1).

4.2 Amplificación y clonación de quitinasas

A partir del ADN genómico, se amplificaron por PCR los ORFs Chit1, Chit2A, Chit2B y Chit2C del *SpfrGV* VG008 y Bb01_03008 del hongo *Bv062* (Figura 13). Los productos una vez amplificados, recuperados y purificados fueron ligados al vector pEXP5-CT/TOPO® (Invitrogen).

Los constructos resultantes pEXP-Chit1, pEXP-Chit2A, pEXP-Chit2B pEXP-Chit2C y pEXP-Bb01_03008, se transformaron por choque térmico en células *E. coli* Top 10 (Invitrogen). Los clones recombinantes se analizaron por PCR de colonia con un cebador externo del vector (Directo T7) y con uno interno (Reverso de cada gen), obteniéndose productos con 81pb adicionales (Figura 14). Los ADNs plasmídicos de 3 clones recombinantes positivos, seleccionados al azar, fueron analizados por secuenciación con el fin de confirmar su correcta orientación y la presencia del tag de histidinas en el C-terminal. Los resultados de secuenciación mostraron que los 3 clones de las quitinasas Chi2A, Chit2B, Chit2C y Bb01_03008, se insertaron correctamente, mientras que los correspondientes a la Chit1 no, razón por la cual las pruebas de expresión se llevaron a cabo con los primeros cuatro ORFs.

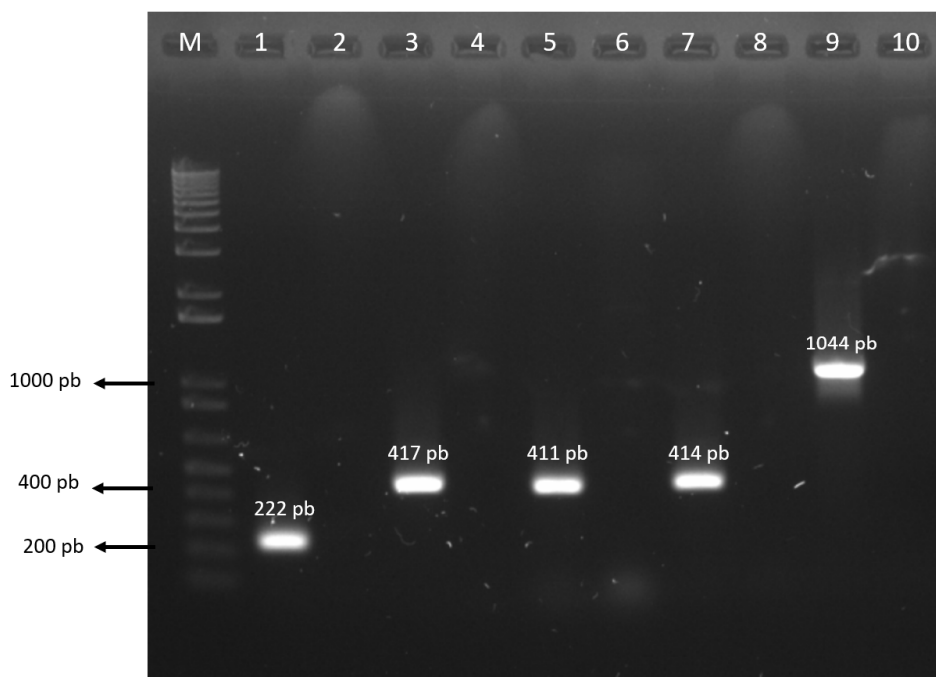


Figura 13. Amplificación por PCR de ORFs de *SpfrGV* y *Bv062*. Se observa en los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 los ORF que codifican para Chit1, Chit2A, Chit2B y Chit2C y Chit37, respectivamente. Controles negativos: carriles 2, 4, 6 y 8. M: marcador de peso molecular.

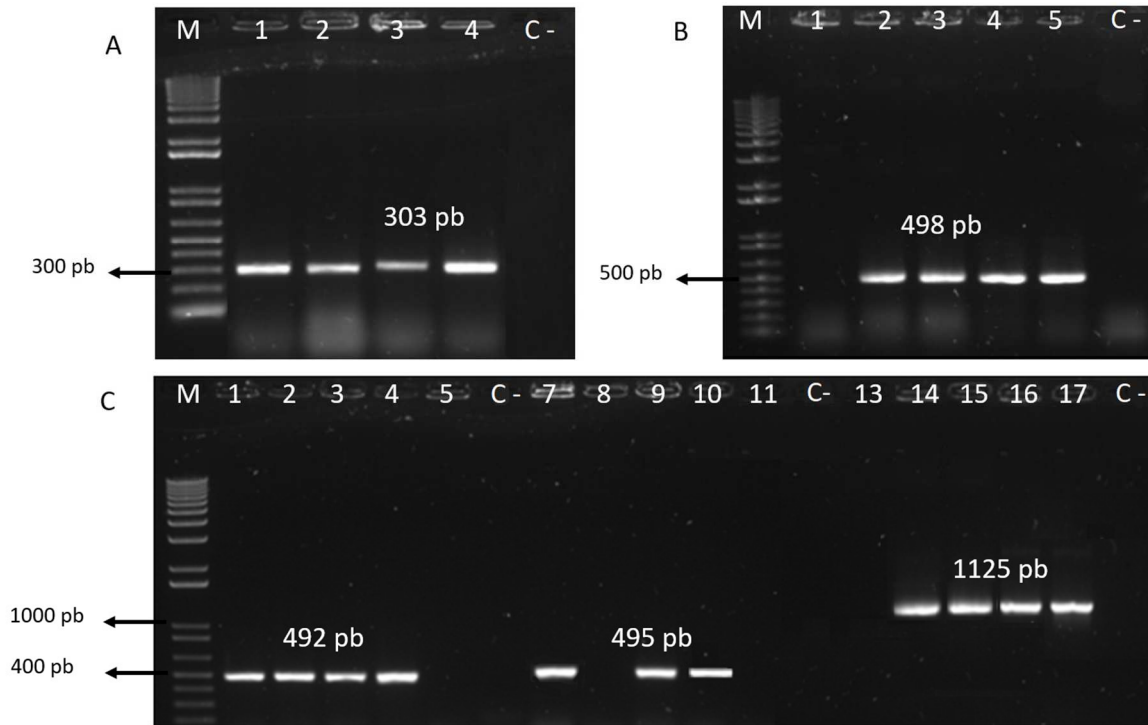


Figura 14. PCR colonia. Colonias recombinantes para: A) Chit1, B) Chit2A, C), Chit2B (1 - 5), Chit2C (7 - 11) y Chit37 (13 - 17). M, Marcador de peso molecular; C-, control negativo.

4.3 Expresión y purificación de quitinasas

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de expresión, los plásmidos recombinantes de cada proteína, confirmados por secuenciación, se transformaron en células *E. coli* BL21 DE3 (Invitrogen) y se sometieron a pruebas de expresión piloto a una escala de 5 mL, en las que se evaluó por separado, el efecto de dos variables: tiempo de inducción y concentración de IPTG sobre el nivel de expresión de las recombinantes.

Bajo las condiciones evaluadas, los resultados de expresión en el tiempo demostraron que a 4h post inducción, se obtuvo la mayor cantidad de proteína de las 4 recombinantes evaluadas, aunque con considerables variaciones en el nivel de expresión. Así, se obtuvieron bandas a las alturas esperadas para las tres recombinantes provenientes del SpfrGV VG008, mencionadas de aquí en adelante como: *rChit2A* (17 kDa), *rChit2B* (17,1 kDa), y *rChit2C* (15,8 kDa) y para la *rChit37* (37,7 kDa) del aislamiento Bv062. Sin embargo, a través de un análisis de Western blot semi-cuantitativo (partiendo de la misma cantidad de proteína por carril: 20µg) se estableció que las quitinasas *rChit2A* y *rChit37*, presentaron el mayor nivel de expresión relativa (carril 1 de la Figura 15 A y B, respectivamente); por lo

cual, estas dos proteínas fueron seleccionadas para continuar con el proceso de purificación.

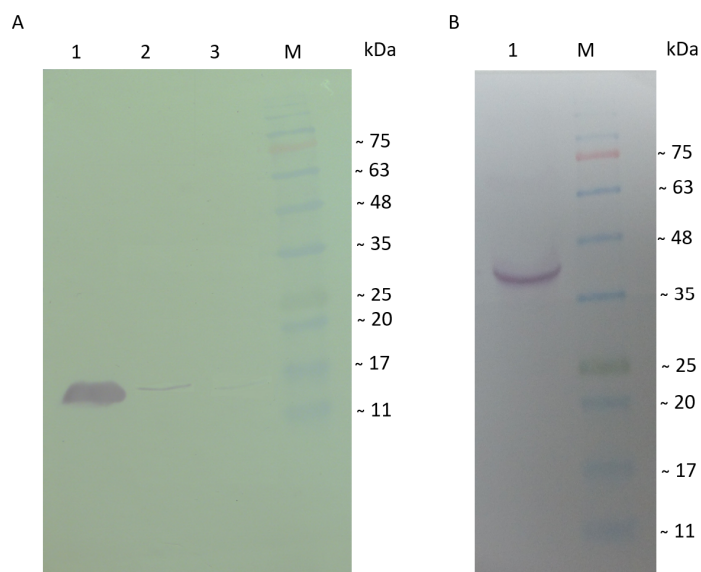


Figura 15. Análisis por Western blot de expresión piloto 4 horas después de inducción. A) proteínas de SpfrGV VG008: Carril 1, *rChit2A*; carril 2, *Chit2B* y carril 3, *Chit2C*. B) *rChit37*; M, marcador de peso molecular.

El efecto de la concentración de IPTG en el nivel de expresión de las recombinantes seleccionadas, se evaluó en cultivos de 12 mL a 37°C, a concentraciones de 0,2 mM, 0,5 mM y 1 mM de IPTG. Se observaron claras diferencias en el efecto del inductor sobre la expresión relativa de las dos quitinasas (Figura 16). La proteína *rChit37*, mostró un nivel de expresión directamente proporcional a la concentración de IPTG utilizada, alcanzando su máximo nivel de expresión con una concentración de 1 mM.

En comparación con la recombinante proveniente del hongo, la *rChit2A* muestra un alto nivel de expresión relativa en las tres concentraciones de inductor, siendo mayor a 0,5 mM. Adicionalmente, para esta recombinante se observó un nivel de expresión basal, lo que se explica debido a que el promotor *lacUV5*, que regula el gen T7 ARN polimerasa en la cepa BL21 Star™ (DE3) usada en la expresión, no es lo suficientemente fuerte para reprimir la expresión, por lo que en ocasiones se pueden generar fugas de expresión bajo condiciones no inducidas (Lara, 2011). También se observó un patrón de oligomerización con múltiples bandas con tamaños correspondientes a dímeros y trímeros (aproximadamente 36 kDa y 51 kDa), las cuales son más intensas al aumentar la cantidad de proteína, razón por la cual dichas características no fueron observadas en las expresiones piloto de menor volumen.

Este patrón de corrido, puede ser explicado por la presencia de agentes reductores y el pH básico de las soluciones utilizadas para la evaluación de la proteína por SDS-PAGE, los cuales favorecen las interacciones intra-proteína del tipo enlace disulfuro que pueden formarse debido a la gran cantidad de residuos de cisteína presentes en la secuencia de aminoácidos de Chit2A, por lo que a mayor cantidad de proteína mayor intensidad de bandas por encima del tamaño esperado (Tronsmo & Harman, 1993).

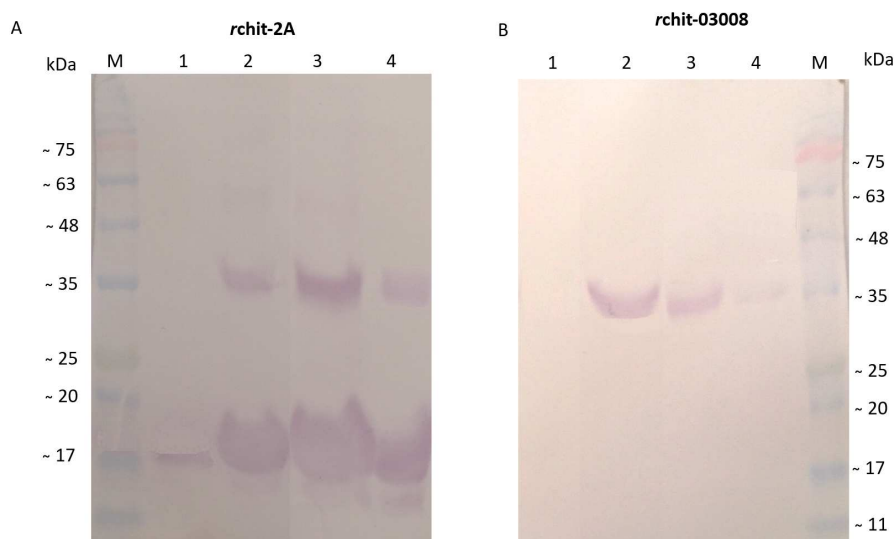


Figura 16. Efecto de la concentración de IPTG en el nivel de expresión relativa. Se observa el análisis por Western blot de la expresión de las quitinasas recombinantes *rChit2A* (A) y *rChit37* (B) a 37°C bajo tres concentraciones de imidazol. Carril 1, control no inducido; carril 2, 3 y 4 proteína recuperada de cultivos inducidos con 1, 0,5 y 0,2 mM de IPTG, respectivamente; M, marcador de peso molecular.

Teniendo en cuenta las condiciones óptimas de expresión, las proteínas *rChit2A* y *rChit37* fueron escaladas a mayor volumen y las fracciones solubles e insolubles fueron recuperadas y analizadas por Western blot. Los resultados, en congruencia con los obtenidos en las expresiones piloto, mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de las dos quitinasas y en la cantidad de proteína recuperada en cada fracción. En todas las fracciones se observa que la cantidad recuperada de la proteína *rChit2A* es mayor a la de *rChit37* (Figura 17 A y 18 A, respectivamente), incluso en la fracción no inducida (N.I). En ambos casos, se encontró que la mayor concentración de proteína es obtenida a partir de la fracción insoluble (I), luego de solubilizar los cuerpos de inclusión (C.I) en Urea. Un patrón de expresión similar fue reportado para otras quitinasas recombinantes (Boer, Simolin, Cottaz, Söderlund, & Koivula, 2007; Fan, Zhang, et al., 2007; Rao et al., 2004), pero diferente del reportado para la Chi18H8, en la que toda la proteína fue encontrada en forma de agregados o CI (Berini et al., 2017). Sin embargo, se logró

obtener mayor cantidad de *rChit37* en la fracción soluble al disminuir la temperatura a 30°C y la concentración de IPTG a 0,2mM (Figura 18 B), lo que puede explicarse debido a que a bajas temperaturas, se disminuye el metabolismo de *E. coli*, favoreciendo el correcto plegamiento y reducción de formación de agregados proteicos (Vallejo & Rinas, 2004).

Dos proteínas fueron purificadas a homogeneidad (por criterio SDS-PAGE) en un solo paso de cromatografía de afinidad, bajo condiciones desnaturalizantes (D) y solubles (S), con masa molecular superior a 17 y 35 kDa, las cuales corresponden a las masas predichas de 17,04 kDa para las recombinantes *rChit2A* (Figura 17 B y C) y 37,7 kDa para *rChit37* (Figura 18 C y D). Los resultados de purificación evaluados por Western blot y tinción con azul de Coomassie, muestran una única banda para la recombinante *rChit37* purificada tanto en condiciones solubles y desnaturalizantes, así como para la recombinante *rChit2A* purificada bajo condiciones solubles, lo cual permite evidenciar que las quitinasas se obtuvieron libres de contaminantes; la proteína *rChit2A* desnaturalizante, incluso después de purificada, se observa en forma oligomérica, que como se explicó antes, puede deberse a 6 residuos de C que presenta en su estructura, e interacciones intra-proteína generadas por las condiciones desnaturalizantes en las que fue extraída (Suresh Kumar, Gopalakrishna, & Prasad, 1993). Las diferentes bandas de *rChit2A* fueron reconocidas por el anticuerpo anti-histidinas en el Western Blot y no se observan inespecificidades en la tinción de Coomassie, indicando que la proteína se purificó a homogeneidad.

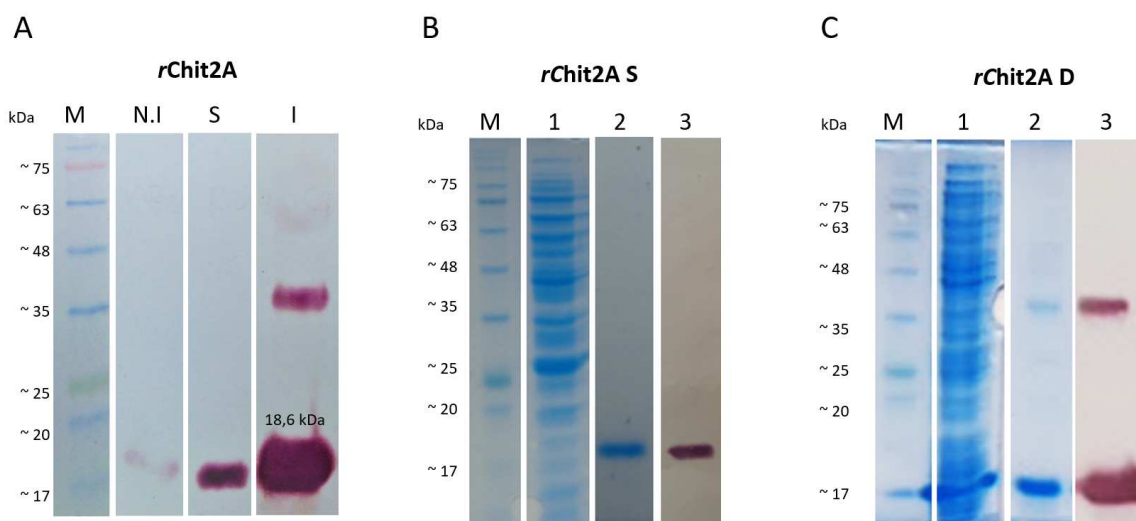


Figura 17. Extracción y purificación de *rChit2A* expresada de forma recombinante. A) Western blot de la fracción soluble e insoluble. [B y C] purificación bajo condiciones solubles (S) y desnaturalizantes (D), respectivamente: Carriles 1 y 2, proteína cruda y purificada teñida con azul de Coomassie; carril 3, Western blot de proteína purificada. M: marcador de

masa molecular; N.I: fracción no inducida; S: fracción soluble o citoplasmática; I: fracción insoluble.

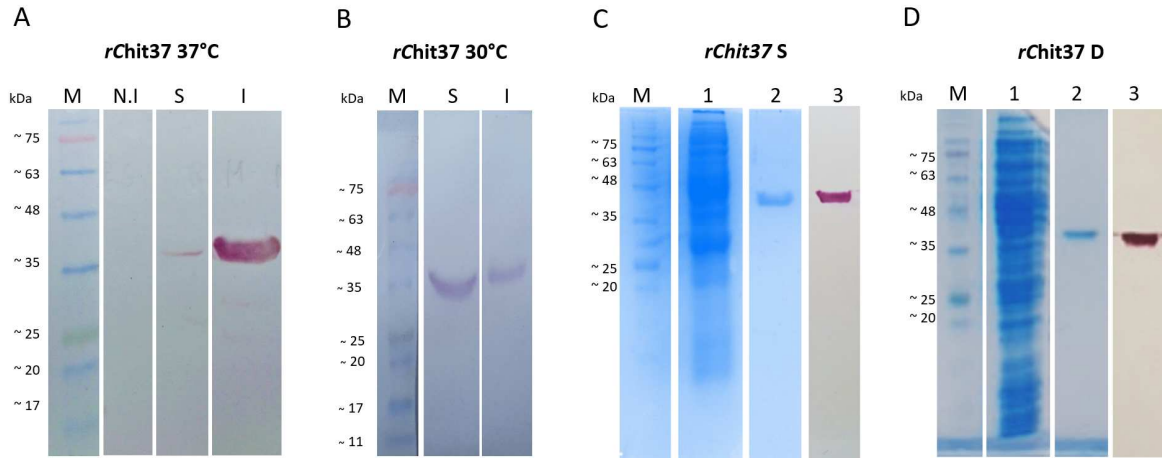


Figura 18. Extracción y purificación de *rChit37* expresada de forma recombinante. [A y B] Western blot de la fracción soluble e insoluble expresada a 37 y 30°C, respectivamente. [C y D] purificación bajo condiciones solubles (S) y desnaturalizantes (D) respectivamente: Carriles 1 y 2, proteína cruda y purificada teñida con azul de Coomassie; carril 3, Western blot de proteína purificada. M: marcador de masa molecular; N.I: fracción no inducida; S: fracción soluble o citoplasmática; I: fracción insoluble.

4.4 Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática fue evaluada para las quitinasas *rChit2A* y *rChit37* producidas tanto en condiciones solubles como desnaturalizantes, con tres tipos diferentes de sustratos: 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina (4-NP-[GlcNAc]), 4-Nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobioside (4-NP-(GlcNAc)₂) y 4-Nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosa (4-NP-(GlcNAc)₃); los resultados de ensayo son mostrados en la Figura 19.

4.4.1 *rChit2A* no presenta actividad quitinasa

La proteína *rChit2A* purificada tanto en condiciones solubles como insolubles no posee actividad quitinasa sobre ninguno de los tres sustratos empleados en la prueba. Dos planteamientos son propuestos en este trabajo como posibles explicaciones a la falta de actividad de esta proteína. El primero, sugiere que la proteína recombinante obtenida de la fracción soluble no fue correctamente plegada en el espacio citoplasmático de *E. coli* y que el proceso de diálisis realizado para la fracción insoluble es insuficiente para replegarla a una conformación funcional. Lo anterior puede deberse a que el citoplasma de *E. coli* carece

de la maquinaria proteica que cataliza la formación de puentes disulfuro (Berkmen, 2012; Lara, 2011), presentes en el dominio CBD de Chit2A. La ausencia de enlaces disulfuro puede afectar la estabilidad de la proteína y alterar el reconocimiento de la quitina, como fue establecido para el efector AVR4 que posee un CBD de origen invertebrado y para la quitinasa humana respectivamente (Tjoelker et al., 2000; Van den Burg et al., 2003). Sin embargo, la ausencia de CBD no afecta la capacidad de las quitinasas para hidrolizar sustratos solubles (Duo-Chuan, 2006; Tjoelker et al., 2000), lo que permite proponer un segundo planteamiento.

La molécula Chit2A probablemente es una proteína de unión a quitina (CBP) y no una quitinasa propiamente dicha, ya que a pesar de poseer un CBDII, carece de regiones catalíticas en su secuencia de aminoácidos correspondientes con los motivos anteriormente reportados para las diferentes familias de glicósido hidrolasas en las que se clasifican las quitinasas. Previamente, se encontró que los dominios de unión a quitina pueden hacer parte de la estructura de quitinasas o existir como como proteínas individuales (CBPs) caracterizadas por tener uno o varios módulos de unión a quitina (Manjeet, Purushotham, Neeraja, & Podile, 2013). En bacterias, son moléculas de pequeño tamaño (18 - 50 kDa), que actúan sinérgicamente con las quitinasas, pues se unen a la quitina, modifican su estructura y promueven la actividad quitinasa mejorando su accesibilidad al sustrato (Frederiksen et al., 2013; Manjeet et al., 2013; Raikhel & Lee, 1993; Vaaje-kolstad, Horn, Aalten, Synstad, & Vincent, 2005). Estas proteínas han sido reportadas por estar presentes en plantas en donde se cree que tienen funciones de defensa contra insectos y hongos (Raikhel & Lee, 1993). También se han descrito en baculovirus, en donde están relacionadas con un grupo de proteínas llamadas factores de infectividad *per os*, en las que los dominios de unión a quitina son fundamentales para infectar células epiteliales en el intestino medio, pues se unen a la quitina de la matriz peritrófica y posteriormente permiten la interacción de los viriones con células traqueales (Rohrmann, 2013).

Aunque algunas CBP presentan actividad enzimática por rompimiento oxidativo de quitina, las CBPs con módulos de unión a carbohidrato 2, como el que tiene la Chit2A son consideradas como proteínas no catalíticas (Frederiksen et al., 2013), razón por la cual se explicaría la ausencia de actividad quitinasa sobre los diferentes sustratos. No obstante, la futura exploración de *rChit2A* para potenciar la actividad insecticida de entomopatógenos de acción oral, puede ser viable, ya que previamente la proteína GP37 de CpGV,

caracterizada por poseer un dominio de unión a quitina en su estructura y producida de forma recombinante en *E. coli*, mejoró la infectividad oral en larvas de *S. exigua* al ser usada como aditivo de dos nucleopoliedrovirus de tipo múltiple y dos cepas de *B. thuringiensis* (X. Liu et al., 2011).

4.4.2 rChit37 se obtuvo funcionalmente activa desde las fracciones soluble e insoluble

La quitinasa recombinante rChit37, proveniente de la fracción citoplasmática, fue purificada bajo condiciones solubles como una enzima funcionalmente activa, mostrando actividad dual con un modo de acción catalítico de tipo endo/exo (Figura 22). Lo anterior sugiere que la proteína fue correctamente plegada en el espacio citoplasmático de *E. coli*, resultado que contrasta con el de Fan y colaboradores, (2007) quienes no lograron obtener Bbchit1 funcional de esta fracción. La rChit37 tiene principalmente actividad quitobiosidasa (0,17 U/mL), seguida por endoquitinasa (0,09U/mL) pero no presenta actividad exo- β -N-acetilglucosaminidasa, a diferencia de las quitinasas extracelulares NAGasa 1 y NAGasa 2, reportadas para otras cepas de *B. bassiana* (M J Bidochka, Tong, & Khachatourians, 1993).

La actividad quitobiosidasa total para la fracción soluble, fue de 1,584 U y 0,85 para el extracto crudo y proteína purificada respectivamente, lo que representa un factor de purificación de 17,86 (veces) y un rendimiento de recuperación de 53,6%. El rendimiento por litro para rChit37 soluble fue de 2,53mg, similar al reportado para Chit42 y ChiA (Boer et al., 2007; Rao et al., 2004) e inferior al rendimiento obtenido para Chit33 y Bbchit1 (Boer et al., 2007; Fan, Zhang, et al., 2007).

La proteína rChit37 obtenida de la fracción insoluble y purificada bajo condiciones desnaturalizantes, no se recuperó como una enzima activa, ya que ninguna de las actividades evaluadas fue detectada en la prueba (Figura 22). Sin embargo, la adición de un simple paso de diálisis, posterior al proceso de solubilización de Cl y previo a la purificación bajo condiciones solubles, fue suficiente para replegar la proteína proveniente de Cl, a una configuración funcionalmente activa, como también se reportó para las quitinasas Chit33 y Chit42 de *T. harzianum* (Boer et al., 2007) y Bbchit1 de *B. bassiana* (Fan, Zhang, et al., 2007). La quitinasa rChit37 replegada y purificada, mostró actividad

quitobiosidasa (0,22 U/mL), alcanzando un rendimiento de recuperación de 36,6%, un factor de purificación de 4,5 (veces) y un rendimiento por litro de 3,792 mg.

La obtención de proteína funcional a partir de la fracción insoluble, puede deberse a que los cuerpos de inclusión sirven como reservorios de diversos estados conformacionales de la proteína, donde algunos de los dominios funcionales pueden estar adecuadamente plegados (Ventura & Villaverde, 2006). Lo anterior, indica que no existe necesariamente una relación directa entre la solubilidad de la proteína y su correcto plegamiento (García-fruítos et al., 2005), razón por la que la enzima proveniente de C.I. presentó actividad enzimática similar e incluso mayor a la obtenida de la fracción soluble.

La actividad dual, descrita en este trabajo para *rChit37*, también ha sido reportada en quitinasas relacionadas con la virulencia de diferentes agentes de control, tales como Chi60 de *Serratia* spp. (Kuttiyawong, Nakapong, & Pichyangkura, 2008), ChiA del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcNPV) (Rao et al., 2004; Thomas, Gooday, King, & Possee, 2000), VChiA del granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) (Takaaki Daimon et al., 2006; Salvador & Ferrelli, 2014) y Bbchit1 de *B. bassiana* (Fan, Fang, et al., 2007). Poseer los dos tipos de actividad, puede conferirle a la *rChit37* una ventaja sobre el procesamiento de diferentes tipos de sustrato, dependiendo de cómo estén organizados molecularmente. Algunos investigadores han propuesto que enzimas con actividad dual, como la quitinasa bacteriana CHI60, usan su función endoquitinasa (acción no procesiva) principalmente sobre sustratos amorfos como quitina coloidal, los cuales están conformados por cadenas fuertemente unidas, que limitan el movimiento procesivo de la enzima (Kuttiyawong et al., 2008). De modo similar, la quitina α prevalente en la cutícula del insecto, tiene una organización antiparalela de microfibras compactas, debido a la gran cantidad de puentes de hidrógeno intra- e inter-moleculares (Merzendorfer, 2003); por lo tanto, la *Chit37* podría utilizar la actividad endoquitinasa en una fase inicial del proceso de degradación cuticular *in vivo*, haciendo varios ciclos de hidrólisis que implican asociación-disociación del sustrato; y probablemente, en una segunda etapa, usar la actividad exoquitinasa sobre sustratos que tienen menor rigidez entre sus microfibras, como los quitooligosacaridos, generados producto de la actividad tipo endoquitinasa.

Por otro lado, la actividad quitobiosidasa y endoquitinasa encontrada en este trabajo para la recombinante *rChit37* fue 17 y 12,8 veces más alta, que la reportada para conidios de

BV062 crecidos en PDA y 2 veces más alta para conidios cultivados en fermentación semisólida suplementados con salvado de trigo (inductor de actividad quitinasa); adicionalmente, dichos medios de cultivo indujeron principalmente actividad β -N acetilglucosaminidasa (Lovera et al., 2018). Lo anterior indica que la *rChit37* utilizada como aditivo, puede potenciar la actividad endo/exoquitinasa, que no es fácilmente inducible en cultivo y cuya actividad ha demostrado tener efecto sobre la virulencia de otros agentes de control biológico (Fang et al., 2005).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la *rChit37* purificada bajo condiciones solubles, fue seleccionada para evaluar su efecto como aditivo de una suspensión de conidios de BV062 sobre larvas de *D. saccharalis*.

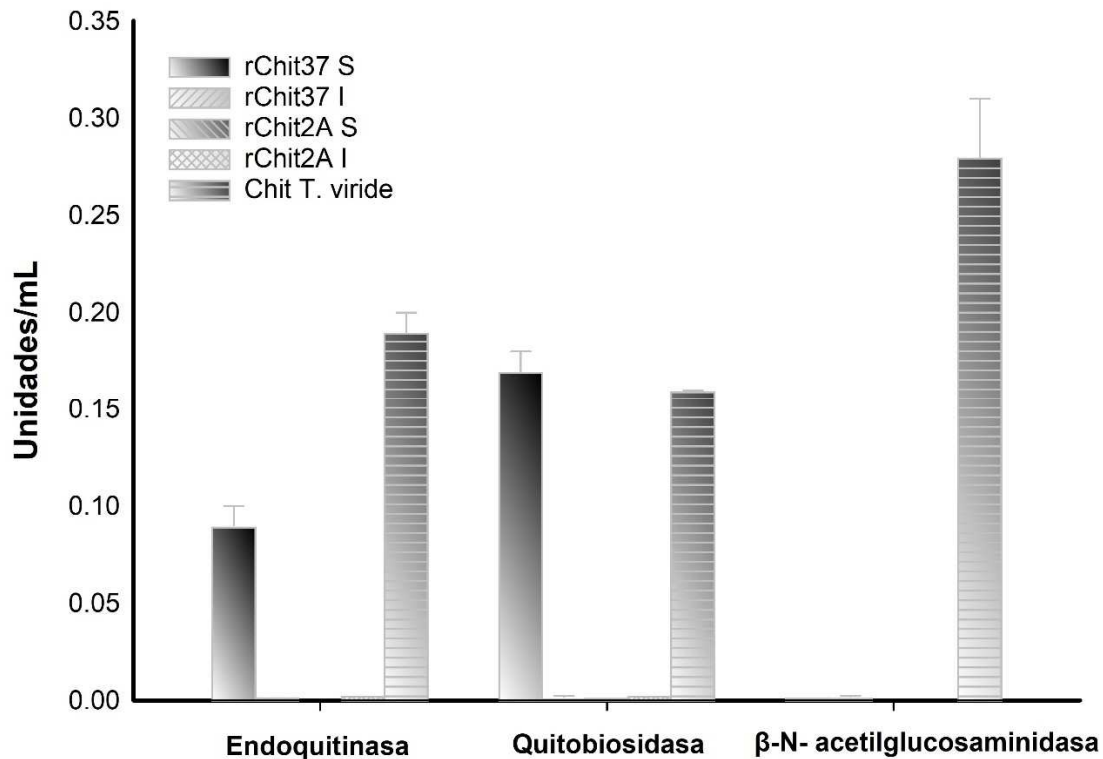


Figura 19. Actividad enzimática de *rChit2A* y *rChit37*. La actividad quitinasa se evaluó sobre tres sustratos insolubles: 4-Nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosa (endoquitinasa), 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina (quitobiosidasa), 4-Nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosa (β -N acetilglucosaminidasa). Proteínas recombinantes purificadas bajo condiciones solubles (*rChit2A* S y *rChit37* S) y bajo condiciones desnaturizantes (*rChit2A* I y *rChit37* I); Chit *T. viride*, quitinasa comercial (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA) usada como control positivo.

4.5 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de *rChit37*

4.5.1 pH óptimo

Con el fin de establecer un perfil enzimático en función del pH para la recombinante *rChit37* purificada bajo condiciones solubles, se determinó el efecto de la variación del pH de la solución de reacción, en la capacidad hidrolítica de la quitinasa sobre el sustrato 4-NP-(GlcNAc)₂, manteniendo la temperatura y el tiempo de incubación con el que fue determinado anteriormente el tipo de actividad quitinolítica (sección 3.3.1).

La actividad enzimática de *rChit37* disminuyó a medida que aumentó el pH, presentando máxima actividad a pH 5,0 (Figura 20); sin embargo, la enzima mantuvo su actividad en todas las condiciones evaluadas. Estos resultados son congruentes con los rangos de pH óptimo (4,0 – 7,0) previamente descritos para quitinasas fúngicas y particularmente con los valores descritos para la GH18 de hongos entomopatógenos, con pH óptimo entre 5,0 y 6,0 (M J Bidochka et al., 1993; Fan, Zhang, et al., 2007; Han et al., 2016; Ike et al., 2006; St. Leger, Cooper, & Charnley, 1991; Takaya et al., 1998; Yang et al., 2014). Sin embargo, difieren del amplio rango de pH óptimo (5,0 – 9,0) reportado para quitinasas bacterianas y virales con actividad insecticida (Busby et al., 2012; T. Daimon et al., 2007; Takaaki Daimon et al., 2006; Danişmazoğlu, Demir, Sezen, Muratoğlu, & Nalçacioğlu, 2015; D. Liu, Cai, Xie, Liu, & Chen, 2010; Ni et al., 2015).

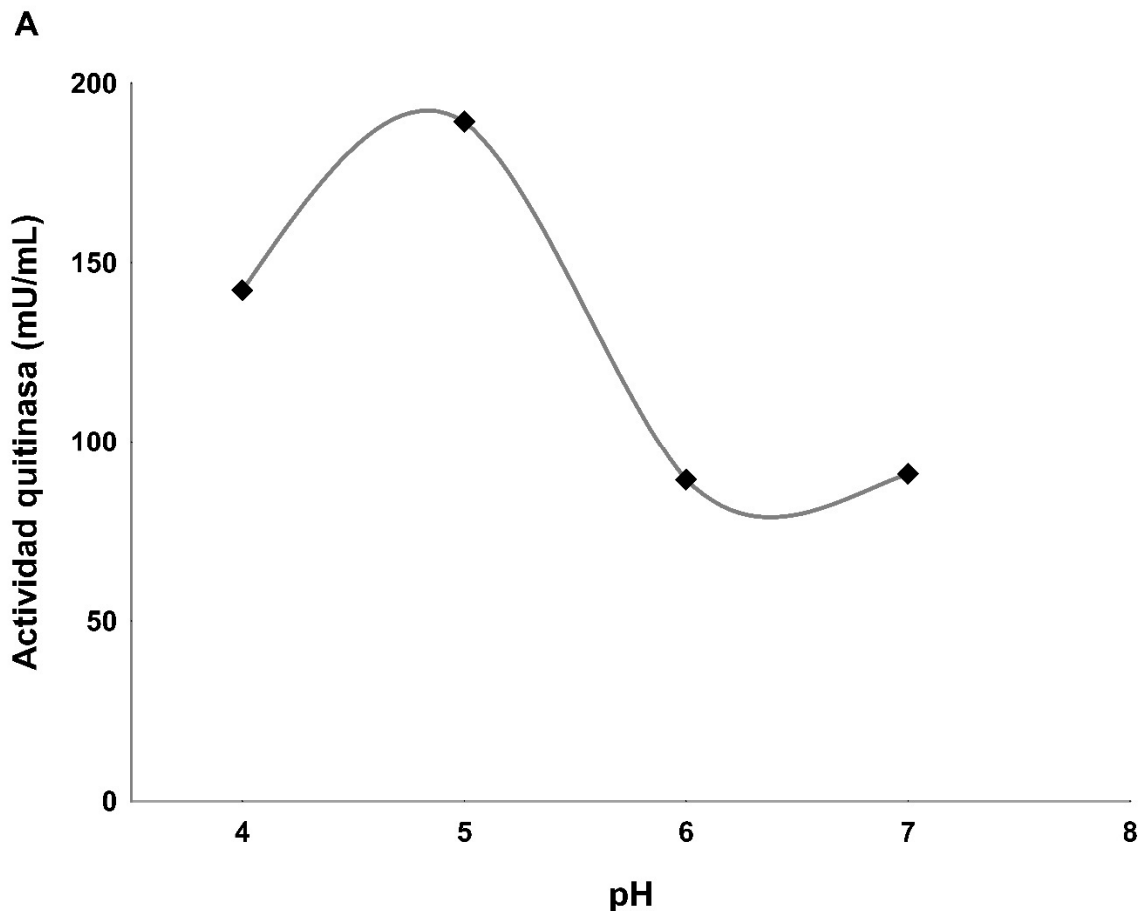


Figura 20. Efecto del pH en la actividad quitinasa de *rChit37*. El pH óptimo fue determinado espectrofotométricamente, posterior a la incubación de la enzima a 37°C por 30 minutos, con el sustrato 4-NP-(GlcNAc)₂ preparado en diferentes soluciones amortiguadoras 0,1M: buffer acetato (pH 4,0), buffer citrato trisódico (pH 5,0) y buffer fosfato de potasio (pH 6,0 – 8,0). Los valores representan el promedio de tres replicas y las barras, la desviación estándar calculada sobre dichas replicas.

4.5.2 Temperatura óptima

La temperatura óptima de la enzima purificada bajo condiciones solubles se determinó sobre el sustrato 4-NP-(GlcNAc)₂, evaluando el perfil enzimático a diferentes temperaturas de incubación, pero manteniendo constantes las condiciones de pH y tiempo de incubación descritos en la sección 3.3.1. Los resultados mostrados en la Figura 21, permiten establecer que la actividad quitinasa incrementa gradualmente con el aumento de la temperatura, alcanzando su máxima actividad a 45°C y comienza a disminuir a 55°C. Sin embargo, cabe resaltar que la enzima al parecer posee un amplio rango de temperaturas en los que se

mantiene como una enzima funcional activa, ya que mostro actividad quitobiosidasa, superior a 187 mU/mL bajo todas las temperaturas evaluadas.

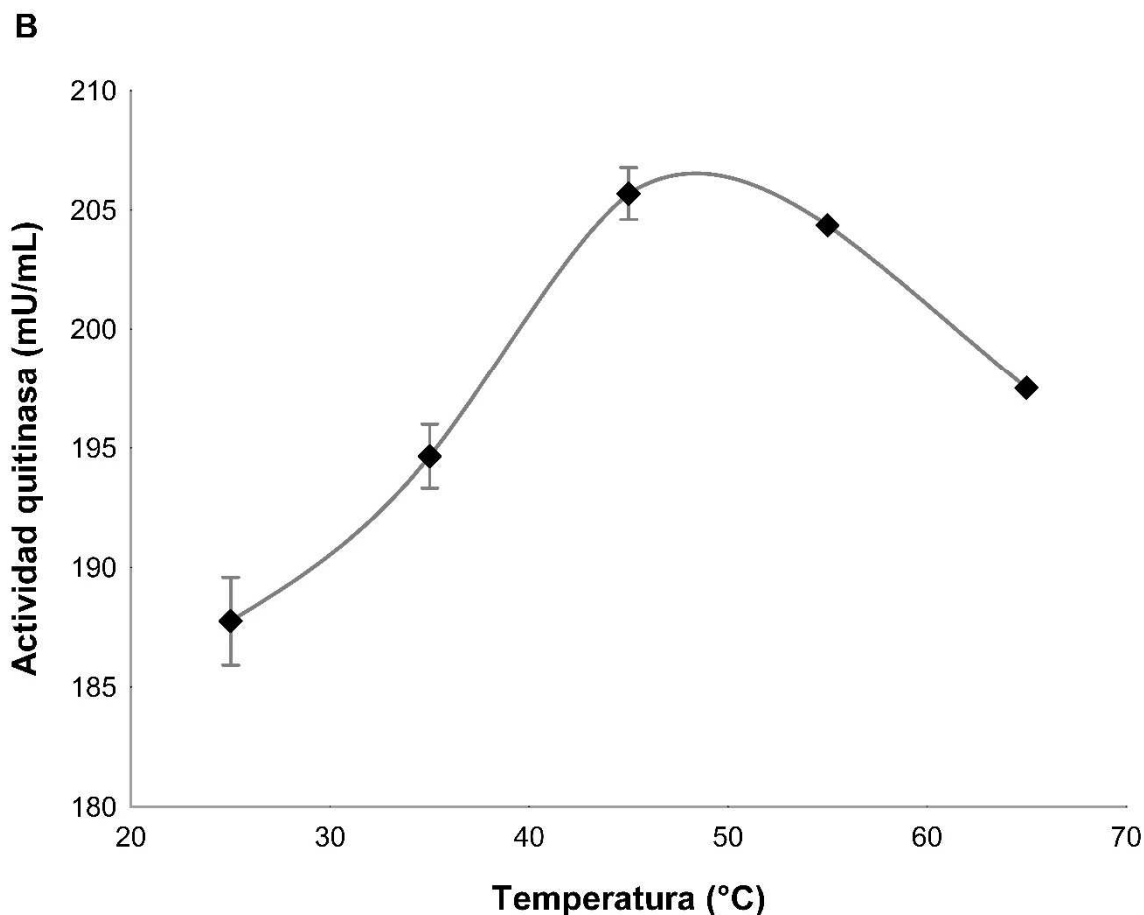


Figura 21. Efecto de la temperatura en la actividad quitinasas de *rChit37*. La temperatura óptima fue determinada espectrofotométricamente, posterior a la incubación de la enzima a diferentes temperaturas por 30 minutos, con el sustrato 4-NP-(GlcNAc)₂ preparado en Buffer citrato 0,1M pH 5,0. Los valores representan el promedio de tres replicas y las barras, la desviación estándar calculada sobre dichas replicas.

La temperatura óptima establecida para la *rChit37*, no difirió considerablemente de las reportadas previamente para la mayoría de enzimas quitinolíticas de otros hongos entomopatógenos, siendo igual a la determinada para las quitinasas de *M. anisopliae* y similar a su homóloga *Bbchit1* (55°C) (Fan, Zhang, et al., 2007; St. Leger et al., 1991), pero superior a la de la *NAGAsa2* (37°C) de *B. bassiana* (M J Bidochka et al., 1993). Cabe destacar que *rChit37* es activa en un amplio rango de temperaturas, incluso mostró

actividad a 65°C, temperatura a la que Bbchit1 nativa, producida en *P. pastoris* y en *E. coli* es inactiva (Fan, Zhang, et al., 2007). No obstante, la temperatura óptima de la recombinante fue mucho más alta, en comparación con quitinasas previamente reportadas, provenientes de bacterias con actividad entomopatógena, las cuales, en su mayoría, presentaron pH óptimos alcalinos y mostraron la mayor actividad a temperaturas entre 35 y 37°C (Busby et al., 2012; Danişmazoğlu et al., 2015; Ni et al., 2015).

4.6 Efecto del uso de *rChit37* como aditivo de Bv062

Diferentes concentraciones de *rChit37* cruda y purificada, determinadas a través de ensayos piloto (datos no mostrados), fueron utilizadas en dos bioensayos, solas o en conjunto con una suspensión de conidios de Bv062 ajustada a la CL₅₀, previamente establecida (García et al., 2018), con el fin de observar su efecto en: la actividad insecticida de *B. bassiana* sobre larvas de segundo instar de *D. saccharalis* y la viabilidad de conidios del hongo, evaluada en términos de germinación y crecimiento del tubo germinal.

4.6.1 Comportamiento y signos de infección de Bv062 en larvas de *D. saccharalis*

Con excepción del testigo absoluto, todas las larvas muertas en los diferentes tratamientos mostraron un patrón de signos y comportamientos que dan cuenta de la infección y muerte a causa del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Así, a medida que avanzó la infección se observó ralentización de movimientos larvales y traslado desde el interior hacia la superficie del grano de maíz. En condiciones naturales de campo, se ha reportado un comportamiento conocido como “enfermedad de la cumbre” en el que larvas infectadas con hongos y virus entomopatógenos, buscan los puntos más altos de la planta antes de morir (L. Lacey & Solter, 2012); este comportamiento podría estar relacionado con una elevación de la temperatura larval a causa del periodo de incubación del hongo al interior del hospedero (Zimmermann, 2007).

Una vez muertas, las larvas se tornaron de color rosado pálido (Figura 22 A) y se evidenció rigidez corporal. La coloración rosácea ha sido descrita en larvas barrenadoras de maíz (L. Lacey & Solter, 2012) y se ha atribuido a la producción del metabolito oosporeina durante la producción de cuerpos hifales en el hemocele del insecto, el cual es un compuesto rojo derivado de bibenzoquinona, sintetizado por una policétido sintasa (PKS) cuyo gen es sobre

regulado en la primera fase de la infección (Zimmermann, 2007). La oosporeina ha sido reportada como un metabolito fundamental en la virulencia del hongo, que permite evadir el sistema inmune del insecto por inhibición de la actividad profeniloxidasa y disminución de péptidos antifúngicos (P. Feng, Shang, Cen, & Wang, 2015; Lai et al., 2017).

Finalmente, se observaron los primeros signos de esporulación, generalmente iniciando en el espacio que se encuentra entre los segmentos abdominales (Figura 22 B), posiblemente por ser zonas menos esclerotizadas, como ocurre en la penetración inicial de la cutícula (Zimmermann, 2007). Posteriormente, se observó una cobertura blanca pulverulenta que generalmente avanzó desde el abdomen hacia la cabeza (Figura 22 C) y finalizó con el recubrimiento total de la larva con micelio fúngico (Figura 22 D). Adicional a los antes descritos, no se observaron signos de infección diferentes en los tratamientos con *rChit37* cruda y purificada, que puedan atribuirse al uso de la quitinasas como aditivo.

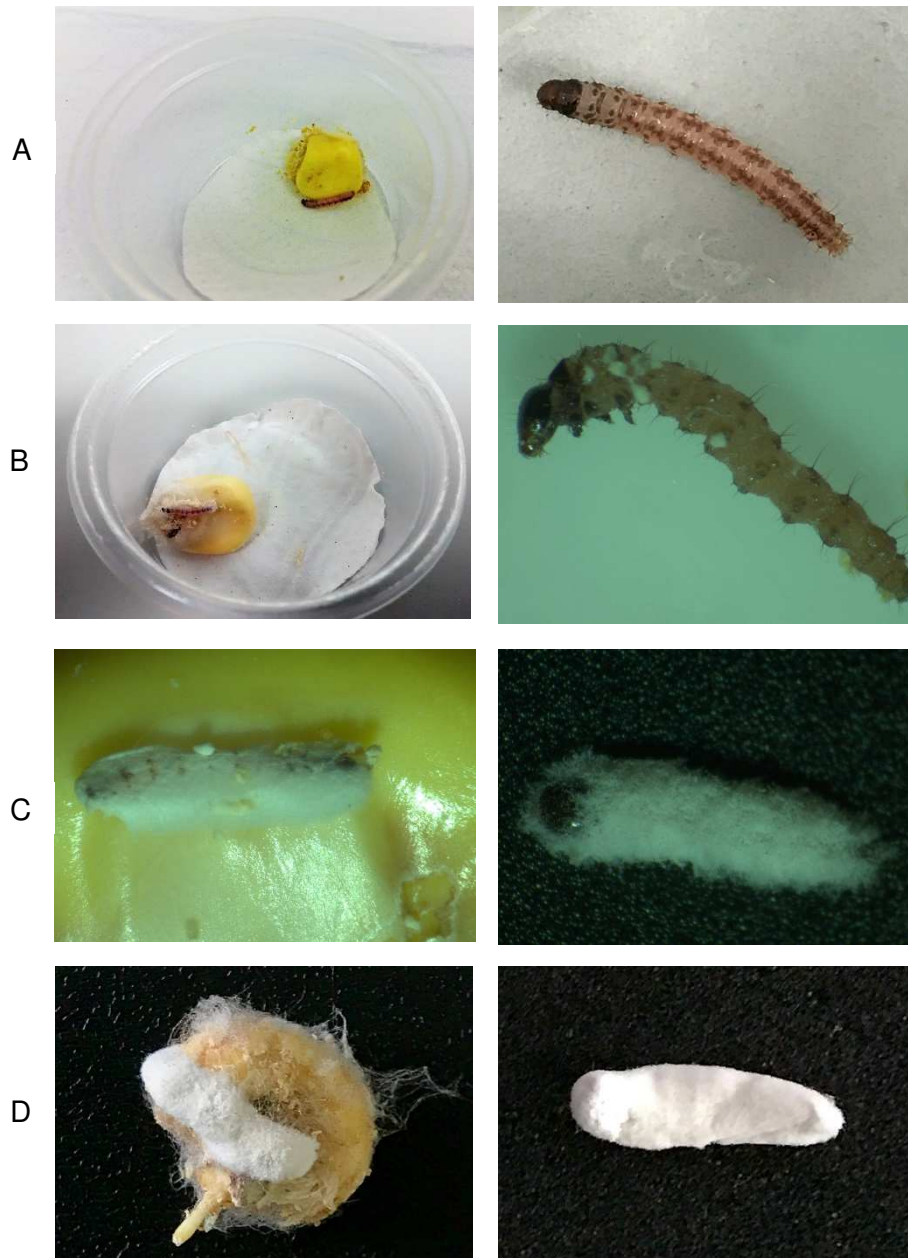


Figura 22. Progreso de la infección generada por *B. bassiana* en larvas de *D. saccharalis*. A). coloración rosácea. B). Endurecimiento larval y primeros signos de esporulación. C). Cubierta blanca pulverulenta. D). Recubrimiento total con micelio fúngico y momificación larval

4.6.2 Efecto de *rChit37* sobre la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* Bv062

Previo a realizar los ensayos de interacción biológica, se estableció la compatibilidad entre *rChit37* (cruda y purificada) y el desarrollo del hongo, por lo que se evaluó el efecto de la recombinante sobre la viabilidad de los conidios en términos de velocidad de elongación del tubo germinal y tasa de germinación de *B. bassiana* Bv062.

Los conidios con y sin tratamiento enzimático, mostraron un patrón de desarrollo consistente con la transición de espora a hifas descrito para *B. bassiana* (H. Liu, Zhao, Guo, Liu, & Zheng, 2015). Se observó una gran cantidad de conidios germinados después de 12 horas de incubación y el alargamiento del tubo germinal se hizo evidente después de 16 horas, además se encontró ramificación de hifas 20 a 24 horas después (Figura 23).

La germinación de conidios fue similar para los tres tratamientos en todos los momentos evaluados, entre 55 y 63% a las 16 horas, entre 87% y 93% después de 20 horas, y entre 93% y 100% a las 24 horas (Figura 24). La germinación alcanzada en este estudio para todos los tratamientos a las 24 horas de incubación, se encuentra por encima del porcentaje mínimo (85%) recomendado como adecuado para asegurar la calidad de formulaciones comerciales a base de *B. bassiana* (Marín, Posada, Gonzalez, & Bustillo, 2000). Los porcentajes de germinación vs tiempo, fueron sometidos a un análisis de regresión lineal, estimándose coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0,91, que sugieren un adecuado ajuste al modelo de una cinética de orden cero. Con la ecuación obtenida, se estimó la pendiente de la recta, correspondiente a la velocidad de germinación de los conidios de cada tratamiento; valores que no fueron estadísticamente diferentes entre sí ($F_{2,6} = 0,80$; $P = 0,4903$), indicando que las enzimas evaluadas no afectaron la tasa de germinación. La velocidad de germinación es un parámetro crítico que determina la eficacia de los conidios de un hongo entomopatógeno para ejercer su actividad insecticida, como fue reportado por Faria y colaboradores (Faria, Lopes, Souza, & Wraight, 2015) para *B. bassiana*. Estos autores demostraron que los conidios capaces de germinar a las 16 horas de incubación (considerados vigorosos) fueron más virulentos, causando una mayor mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* que aquellos con máxima tasa de germinación a las 48 horas. En el presente estudio, los conidios de los tres tratamientos mostraron ser igualmente vigorosos en ausencia y presencia de *rChit37* y *ECrChit37*, con más del 90% de los mismos germinando antes de las 24 horas de incubación.

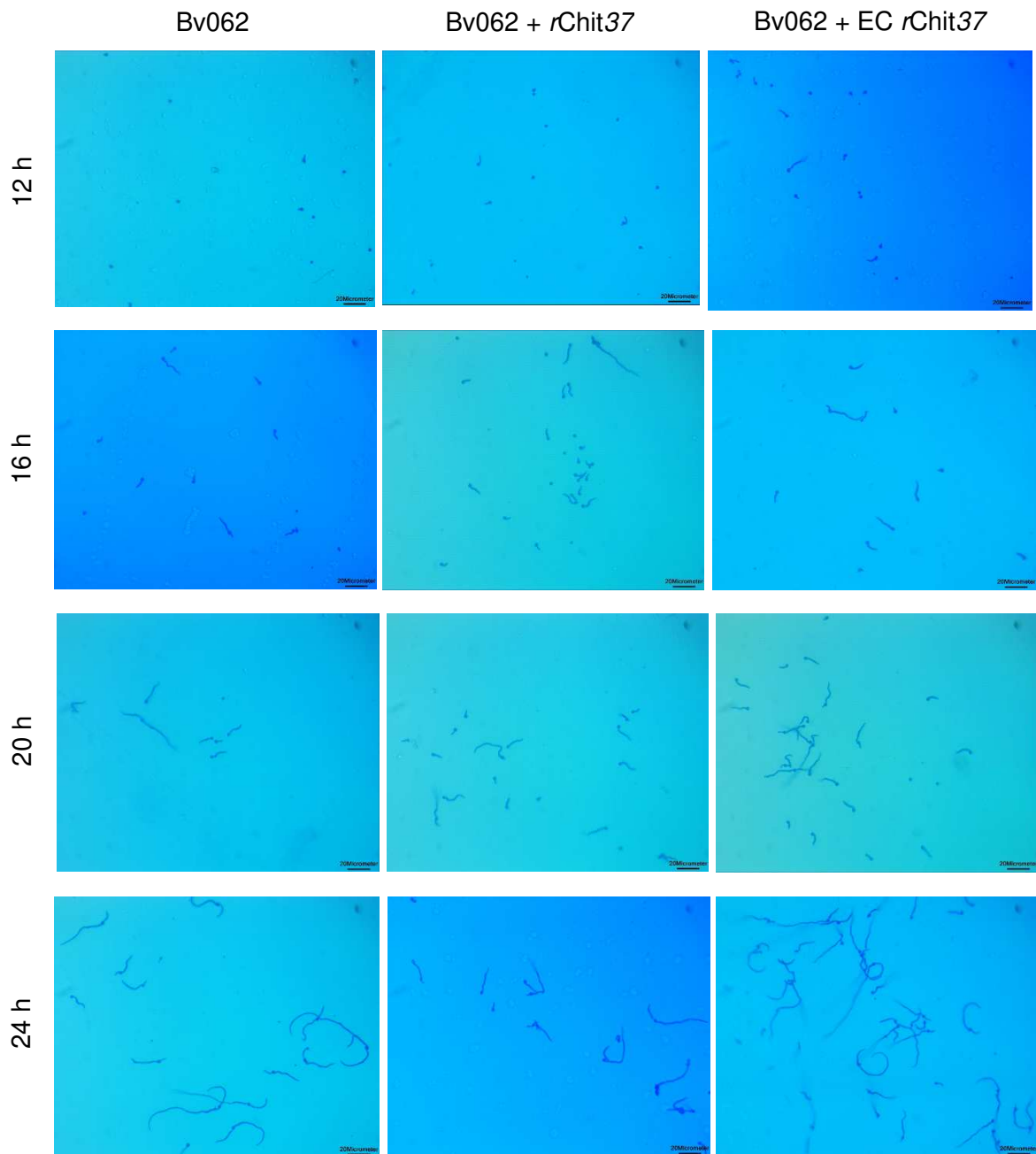


Figura 23. Evolución del desarrollo del tubo germinal de conidios de Bv062 solos y en mezcla con rChit37. Las columnas muestran los tratamientos y las filas el tiempo en hora al que fue evaluada la longitud del tubo germinal. La barra en las fotografías corresponde a una escala de 20 μm , todas las imágenes se registraron con un aumento de 40X.

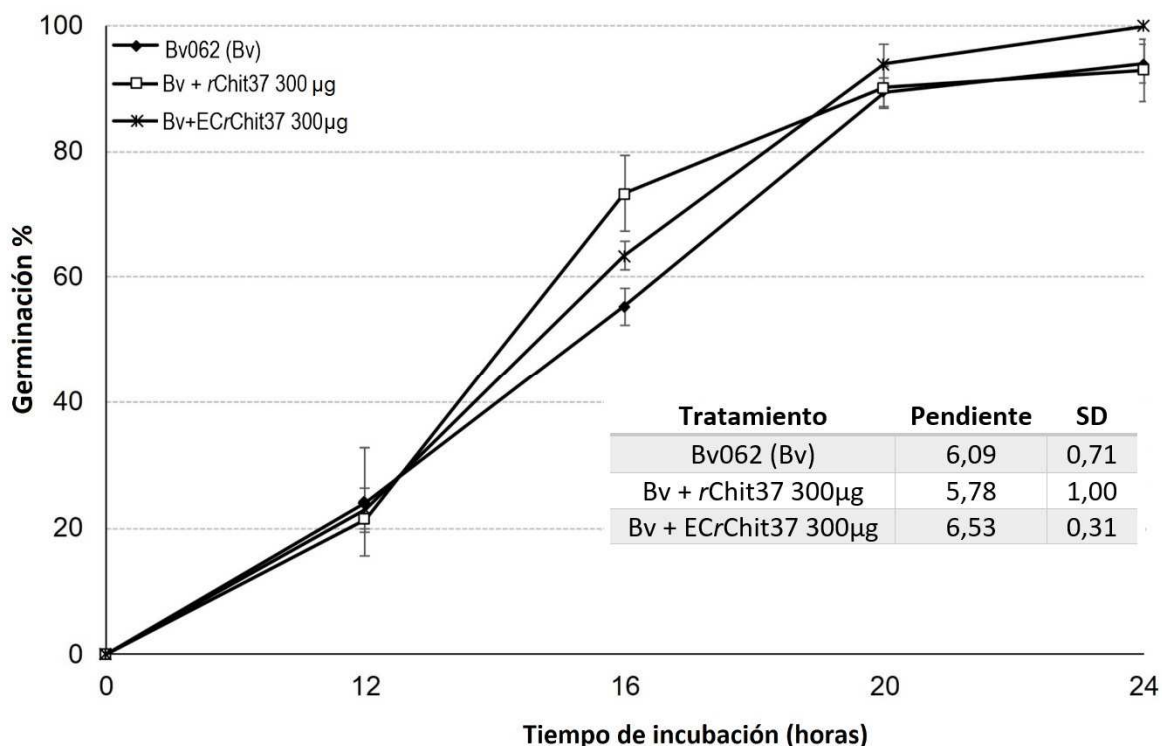


Figura 24. Efecto de la rChit37 sobre la tasa de germinación. La velocidad de germinación se calculó para los tres tratamientos con un R^2 superior a 0,91. El análisis de varianza con un nivel de significación de $p < 0,05$ no mostró diferencias significativas $F(2,6) = 0,80$ $p = 0,4903$.

En la figura 25 se puede observar el desarrollo del tubo germinal de los conidios en ausencia y presencia de rChit37 y ECrChit37 entre las 12 y 24 horas de incubación. Para calcular la velocidad de elongación del tubo germinal, los datos fueron transformados logarítmicamente y se sometieron a un análisis de regresión lineal, obteniéndose un adecuado ajuste al modelo matemático, con valores de $R^2 > 0,99$ para todos los tratamientos. Las pendientes de las rectas obtenidas (Figura 25) fueron asumidas como una expresión de la velocidad de elongación y su comparación mediante ANOVA no detectó diferencias significativas entre tratamientos ($F_{2,6} = 0,26$, $p = 0,7791$), sugiriendo que las enzimas no afectaron el desarrollo del tubo germinal de los conidios.

La germinación y desarrollo del tubo germinal de conidios de *B. bassiana* ocurre normalmente dentro de las primeras 36 horas después del proceso de adherencia a la cutícula del insecto (Lai et al., 2017). Este tiempo es superior al requerido cuando los

conidios son sembrados en agar (*in vitro*), posiblemente porque en condiciones *in vivo*, el hongo requiere más tiempo para adaptarse y asimilar los componentes de la epicutícula del insecto, al mismo tiempo que puede ser afectado por cierto tipo de hidrocarburos y lípidos inhibidores de la germinación (Pedrini et al., 2013).

Los resultados anteriores, permiten concluir que la quitinasa recombinante cruda y purificada no afecta positiva o negativamente la viabilidad de los conidios de Bv062, ni el desarrollo normal de los procesos de emergencia y crecimiento del tubo germinal. Aunque existen quitinasas de *B. bassiana* involucradas en la remodelación celular y el crecimiento (Seidl, 2008), *rChit37* puede tratarse de una enzima implicada en la virulencia, pues previamente, estudios de cepas mutadas para genes quitinasas de hongos entomopatógenos y micoparasitarios, han demostrado que la ausencia de algunos de estos genes altera negativamente la virulencia de la especie, pero no tienen efecto sobre la morfología y crecimiento del hongo en lo que respecta a la formación de esporas, apresorios e hifas (Boldo et al., 2009; Mamarabadi, Jensen, & Lübeck, 2008).

En el presente estudio no se determinó un efecto directo de *rChit37* sobre la estructura y germinación del hongo. Sin embargo, esta enzima podría estimular indirectamente la germinación durante la interacción con el hospedero, ya que su acción catalítica de quitina en la cutícula puede liberar compuestos asimilables como fuente de carbono (Hamid et al., 2013). Este efecto fue observado para una proteasa CDEP-1 recombinante, la cual al ser usada como aditivo de *B. bassiana* en un cultivo con exuvias como única fuente de carbono, aceleró el proceso de germinación; esto fue posteriormente correlacionado con un incremento de la actividad insecticida del hongo sobre áfidos (Y.-J. Zhang et al., 2008).

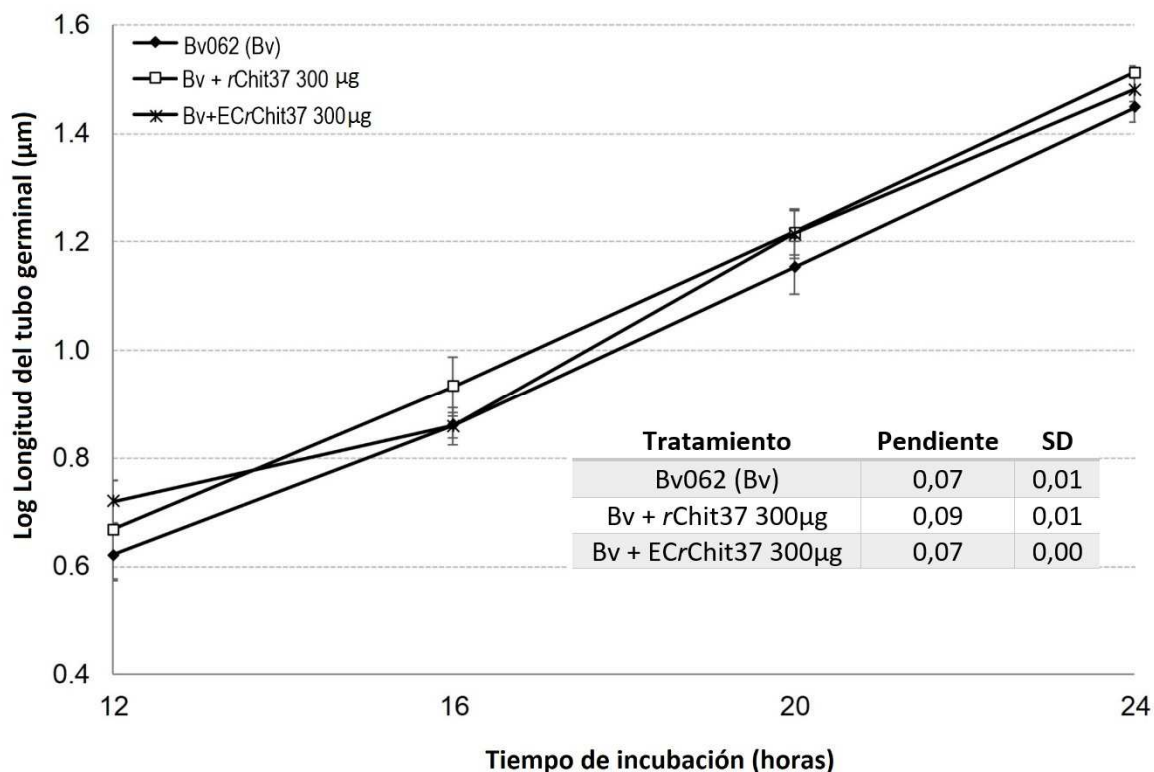


Figura 25. Efecto de la rChit37 en la elongación del tubo germinal. Para calcular la velocidad de elongación, los datos transformados logarítmicamente, se sometieron a un análisis de regresión lineal resultando para los tres tratamientos un $R^2 > 0,99$, se confirmó su normalidad con la prueba Shapiro-Wilk. El ANOVA ($p < 0,05$), no mostró diferencias significativas entre las pendientes $F(2,6) = 0,26$, $p = 0,7791$.

4.6.3 Efecto de rChit37 sobre la actividad insecticida de BV062

La eficacia de conidios de BV062 sobre larvas de *D. saccharalis* se calculó con la media de la mortalidad de tres replicas por tratamiento y se corrigió con la mortalidad del testigo mediante la fórmula de Schneider – Orelli (Zar, 1999). Los resultados de eficacia, evaluada 14 días después de la inoculación de los tratamientos, permitieron establecer claramente tres grupos con diferencias significativas ($F_{8,18} = 22,4$, $p = 0,0$) entre sí (Figura 26).

Las inoculaciones tópicas tanto de la rChit37 cruda (obtenida de la fracción soluble de *E. coli*) como purificada, no generaron un efecto insecticida importante sobre larvas de *D. saccharalis* (eficacia inferior al 10%) cuando las enzimas fueron aplicadas en ausencia del hongo, en comparación con tratamientos en los que se aplicaron conidios solos y suplementados con quitinasa. En la literatura se encuentran resultados contrastantes

respecto al efecto que tiene el uso de enzimas purificadas y extractos enzimáticos crudos sobre los insectos. Por ejemplo, la aplicación tópica de diferentes enzimas como N-acetilglucosaminidasa (NAGasa) parcialmente purificada de *T. konigiopsis* en larvas de *D. saccharalis* (Mejia, 2018), la proteasa recombinante CDEP-1 y la CDEP:BmChBD (proteasa híbrida que tiene un dominio de unión a quitina) en adultos de *Mysus persicae* y ninfas (Fan et al., 2010; Zhang et al., 2008), así como el suministro oral del extracto crudo de la quitinasa de *Streptomyces* spp. en áfidos, *D. saccharalis*, *Pieris brassicae*, *Mamestra brassicae* y *Plutella xylostella* no condujeron a la mortalidad de insectos (Shternshis, Ovchinnikova, Duzhak, & Tomilova, 2002). Por el contrario, la administración oral de quitinasas bacterianas y fúngicas parcialmente purificadas, pueden ocasionar retrasos en diferentes etapas del desarrollo de insectos, afectar procesos digestivos debido a alteraciones ocasionadas en la conformación de la membrana peritrófica e incluso inducir la muerte (Berini et al., 2016; Okongo, Puri, Wang, Singh, & Permaul, 2018; Regev et al., 1996). Lo anterior indica que el efecto de las enzimas hidrolíticas en la mortalidad de los insectos puede variar dependiendo su procedencia, vía de administración, estructura o especie blanco. En el caso específico de las quitinasas fúngicas, podría explicarse debido a la existencia de una amplia diversidad y especialización de funciones, de acuerdo con el papel que desempeñan en los sistemas vivos (Seidl, 2008; Seidl et al., 2005).

Por su parte, los tratamientos que incluyeron tanto conidios solos como suplementados con *rChit37* cruda y purificada, demostraron tener un efecto insecticida en todos los casos superior al 50%. La mortalidad de las larvas inoculadas con la mezcla de conidios de Bv062 y 200 µg/mL de enzima purificada, así como con 200 y 300 µg/mL de extracto crudo, fue similar a la obtenida con la aplicación individual de conidios en todos los tiempos de evaluación (Figura 26), con valores de eficacia final entre el 50 y el 60%, que no fueron estadísticamente diferentes. Sin embargo, la actividad insecticida de la combinación de conidios y 300 µg/mL de *rChit37* purificada fue significativamente mayor ($F_{8,18} = 5,49$, $p = 0,0013$) a partir del cuarto día del ensayo (Figura 27). Esto demostró un efecto sinérgico progresivo en la mortalidad de *D. saccharalis*, que resultó en una eficacia final del 96,6 % después de 14 días (Figuras 26 y 27) y en un incremento del 61% en comparación con el control (hongo sin enzima).

El efecto sinérgico, puede atribuirse a un incremento en la velocidad de penetración de la procutícula de los insectos, mediada por la *rChit37*. La digestión del integumento sigue una

secuencia lipasa-proteasa-quitinasa debido a la estructura de la cutícula que tiene tres secciones: la envoltura (capa más externa) rica en lípidos, la epicutícula compuesta principalmente por proteínas y la procutícula, única capa cuticular que contiene quitina en forma de fibras integradas a una matriz de proteínas (Andersen, 2009; Prakash, 2008; Tanada & Kaya, 1993); en este contexto, la *rChit37* agregada a la suspensión de conidios podría haber penetrado en la epicutícula junto con el apresorio y tubo germinal, y al alcanzar las fibras de quitina en la procutícula, desarrollar su actividad catalítica sinérgicamente con las enzimas expresadas y secretadas naturalmente por el hongo.

Existen reportes previos que muestran un efecto sinérgico de otras enzimas hidrolíticas usadas como aditivo de conidios de *B. bassiana* (Mejia, 2018; Y.-J. Zhang et al., 2008). El uso de 100 µg/mL de CDEP1 mejoró la mortalidad del hongo tan solo entre un 20 y 25% al ser usadas como aditivo de 1×10^6 y 5×10^7 con/mL, respectivamente (Y.-J. Zhang et al., 2008). Las variaciones encontradas respecto a la *rChit37*, pueden deberse a que la actividad quitinasa presenta mayor efecto sobre la mortalidad de los insectos, que la acción proteasa, como se demostró experimentalmente en pruebas de inhibición de enzimas en extractos de *B. bassiana* (Kim et al., 2010). Por su parte, aunque el uso combinado de tres estrategias de potenciación de conidios de Bv062 (sustrato avena, inductor salvado de trigo y quitinasa parcialmente purificada) permitió obtener una eficacia superior a la reportada en este trabajo (98,8%) para el mismo aislamiento fúngico (Mejia, 2018), solo puede atribuirse un 6,2% de incremento al uso de 0,6 U/mL de la NAGasa de *T. konigiopsis*. Previamente, Ihrmark y colaboradores (2010) propusieron que las quitinasas de *Trichoderma*, involucradas en el micoparasitismo, están adaptadas a las características específicas de la quitina de la pared celular de hongos, lo que podría explicar las diferencias encontradas entre el efecto potenciador de la quitinasa exógena (NAGasa) y la endógena, producida en este trabajo.

Lo anterior permite sugerir que la proteína recombinante, en conjunto con las estrategias de potenciación de conidios desarrolladas por Mejia (2018), pueden favorecer la eficacia de un futuro bioplaguicida desarrollado a base de Bv062 e incluso *rChit37* puede contribuir en la reducción de las dosis mínimas efectivas de conidios viables. Es importante considerar que, en el trabajo desarrollado por García y colaboradores (2018) con este mismo aislamiento, se alcanzó tan solo un 73,3% de eficacia utilizando una concentración 10 veces mayor que la evaluada en el presente estudio. Los resultados obtenidos sugieren un

potencial interesante para utilizar la quitinasa recombinante desarrollada en este trabajo (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como aditivo en el desarrollo y aplicación de hongos entomopatógenos para el control de plagas.

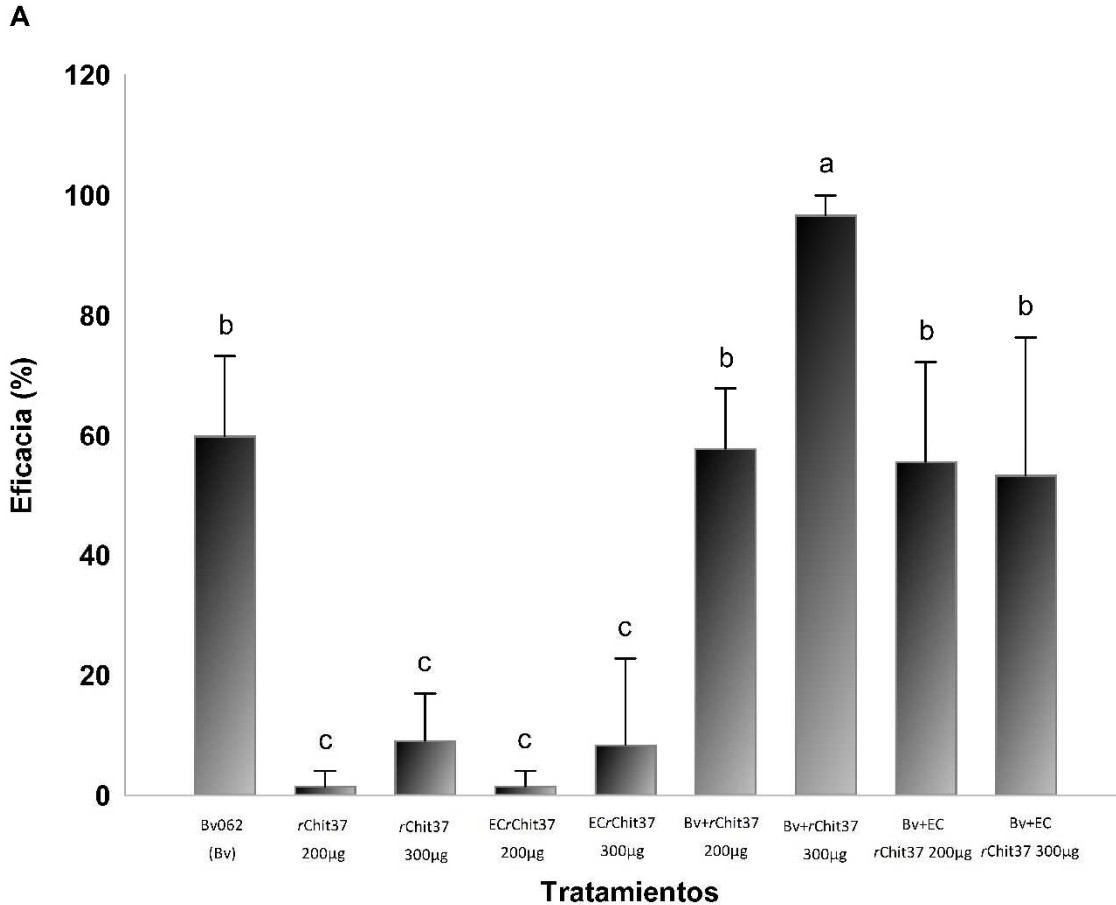


Figura 26. Efecto de *rChit37* en la eficacia de Bv062 sobre *D. saccharalis*. Se observa la mortalidad corregida de larvas de segundo instar de *D. saccharalis* inoculados tópicamente con tratamientos consistentes en una suspensión de conidios de Bv062, con y sin aditivo de *rChit37* cruda y purificada, y tratamientos en los que se usó *rChit37* cruda y purificada. Los datos son los promedios de tres replicas por tratamiento, las barras indican la desviación estandar calculada sobre las replicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos con la prueba de comparaciones multiples Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

La tendencia de la mortalidad en el tiempo de *D. saccharalis* para cada tratamiento se muestra en la Figura 27. La mortalidad acumulada en función del tiempo, es mayor para la suspensión de conidios suplementado con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *rChit37*.

La tendencia de la mortalidad en el tiempo encontrada en este trabajo, en comparación con el perfil de expresión génica *in vivo* durante la infección de *B. bassiana* sobre mosquitos

(Lai et al., 2017), presenta algunas coincidencias: la formación de cuerpos hifales en el hemocele del insecto, reportadas a las 84 horas posinfección (hpi) y considerada como un aspecto fatal de la infección, coincide con el hecho de que las primeras muertes se empiezan a observar a partir de las 48 horas e incrementan a partir de este tiempo, y que específicamente para el tratamiento suplementado con la concentración más alta de quitinasa, el 43,3% de la mortalidad se registró a las 96 hpi. Por otro lado, teniendo en cuenta que estos mismos autores reportan un incremento en la expresión de quitinasas durante las 36 y 60 hpi, tiempo durante el cual se da la penetración de la cutícula y la invasión del hemocele, se puede inferir que las diferencias observadas en la mortalidad durante los primeros 5 días posinfección, pueden responder a un efecto sobre la velocidad inicial del proceso infeccioso causado por la adición de 300 μ g de *rChit37* a la suspensión conidial.

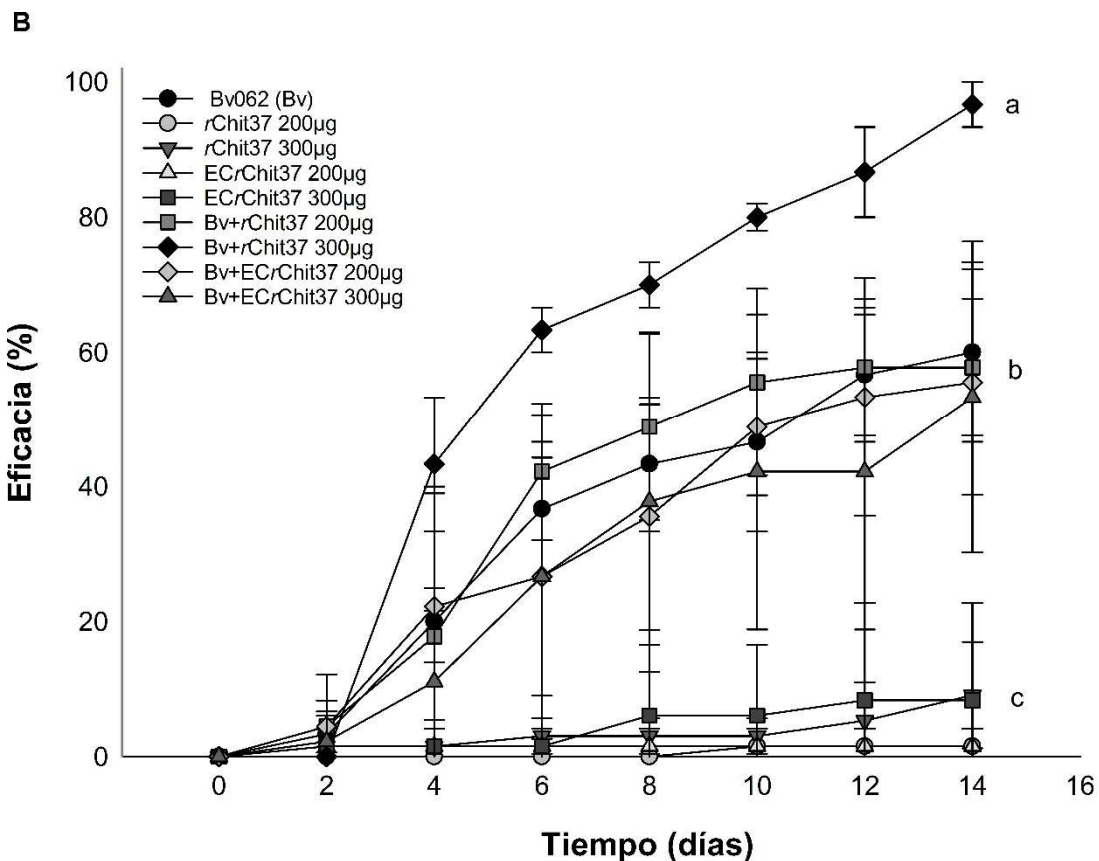


Figura 27. Efecto de *rChit37* en la mortalidad en el tiempo. La grafica muestra el comportamiento de la mortalidad de *D. saccharalis*, evaluada cada 2 días. Las barras muestran la desviación estándar calculada sobre tres replicas por tratamiento. Letras

diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos con la prueba de comparaciones múltiples Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

4.6.4 Efecto de *rChit37* sobre el tiempo letal de Bv062

Los tiempos letales medio (TL₅₀) y noventa (TL₉₀) para los tratamientos evaluados variaron entre 5,4 d y 12,6 d y entre 11,8 d y 47,2 d, respectivamente, encontrándose diferencias estadísticas (sin solapamiento de límites de confianza) únicamente para el tratamiento suplementado con 300 µg de *rChit37* (Tabla 5).

Los tiempos letales medios, reportados en este trabajo para conidios suplementados con *rChit37* (300 µg/mL) fueron menores a los establecidos previamente para suspensiones conidiales de diferentes especies de hongos entomopatógenos, evaluadas sobre larvas de *D. saccharalis*. Por ejemplo, en el caso de cepas de *B. bassiana* a concentraciones de 2×10^8 con/mL y 1×10^8 con/mL, se reportaron TL₅₀ entre 7,31 d y 15,14 d sobre larvas de primer y tercer instar (Díaz & Lecuona, 1995; Leucona & Alves, 1988; Zúñiga-oviedo, Soto-Giraldo, & Cruz-Ceron, 2016), así como para *Beauveria brongniartii* (7,75 d – 13,06 d) y nueve cepas brasileras del hongo *M. anisopliae* (6,47 d – 10,25 d) (Leucona & Alves, 1988; Zappellini, Almeida, Batista Filho, & Giometti, 2010). No obstante, también se encontraron tiempos letales medios por debajo de los encontrados en el presente estudio para otras cepas de *B. bassiana*, fluctuando entre 2,09 y 4,3 días (Arcas, Díaz, & Lecuona, 1999; Díaz & Lecuona, 1995; Svedese et al., 2013) y de 4,0 días para el aislamiento LPP45 de *M. anisopliae* (Acevedo, Samuels, Machado, & Dolinski, 2007); sin embargo, es importante destacar que, aunque en dichos estudios los TL₅₀ fueron inferiores, se evaluaron con concentraciones 100 veces más altas a las usadas en este trabajo.

Por otro lado, cuando la suspensión de conidios (1×10^6) se suplementó con 300 µg/mL de quitinasa recombinante, se observó una reducción de 46% en el TL₅₀ (5,4 d) y de 68% para el TL₉₀ (11,8 d), en comparación con el uso de conidios solos. Dichos tiempos letales, fueron también inferiores a los reportados previamente para conidios de esta misma cepa (TL₅₀: 6,0 d TL₉₀: 12,2 d) a una concentración 100 veces más alta que la evaluada en este trabajo (García et al., 2018), lo que sugiere que *rChit37* mejoró la virulencia de Bv062 en términos de reducción de dosis y tiempos letales frente a larvas de *D. saccharalis*. Tal reducción puede ser atribuida a la actividad quitobiosidasa y endoquitinasa de la *rChit37*, ya que en estudios previos se demostró que al incrementar la actividad quitinolítica, sobreexpresando

genes quitinasa, se redujo el tiempo de mortalidad e incrementó la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Boldo et al., 2009; Fan, Fang, et al., 2007; Fang et al., 2005).

La importancia de la actividad hidrolítica de enzimas usadas como aditivos de hongos entomopatógenos, ha sido demostrada mediante la disminución del tiempo letal. Ali y colaboradores (2014), disminuyeron el tiempo medio de supervivencia de ninfas de *Dysmicoccus neobrevipes*, al adicionar una lipasa extracelular a una suspensión fúngica de *Isaria fumosorosa*, cuyo efecto fue atribuido a la hidrólisis de grasas y lipoproteínas presentes en la capa cerosa del integumento del insecto.

Mejía (2018) por su parte, atribuyó la reducción de 25% en los TL₅₀ y TL₉₀ de Bv062 sobre larvas de *D. saccharalis*, a la adición de una N-acetilglucosaminidasa (NAGasa), parcialmente purificada de *Trichoderma koningiopsis*, no obstante, tal reducción fue menor a la alcanzada por la actividad endoquitinasa y quitobiosidasa de la rChit37 usada como aditivo a la más alta concentración en este estudio. Lo anterior, puede deberse a la existencia de una posible diferenciación funcional entre las quitinasas fúngicas, que confiere unas propiedades enzimáticas adaptadas al contexto ecológico de cada especie (Ihrmark et al., 2010). Así, aquellas involucradas en la interacción hongo-hongo, como las encontradas en diferentes especies del micoparásito *Trichoderma*, presentan modificaciones adaptativas en regiones implicadas en la especificidad del sustrato, en función de la composición de la pared celular de hongos que le sirven como hospederos (Ihrmark et al., 2010); según esto, la quitinasa de *T. koningiopsis* posiblemente no sea la mejor adaptada a las características propias de la quitina que compone la cutícula de insectos.

Tabla 5. Efecto de rChit37 en el tiempo letal de *B. bassiana*. Tiempos letales (TL₅₀ TL₉₀) de conidios de *B. bassiana* Bv062, utilizados solos y en conjunto con rChit37 cruda y purificada, sobre larvas de *D. saccharalis*.

Tratamiento	TL ₅₀	Límites de confianza (95%)		TL ₉₀	Límites de confianza (95%)		X ²	Pendiente
		Inferior	superior		Inferior	Superior		
Bv062 (Bv)	10,0	9,0	11,4	37,3	28,4	55,5	4	2,245 ± 0,225
Bv + rChit37 200µg	9,3	7,8	11,6	34,5	23,0	75,3	9	2,245 ± 0,220
Bv + rChit37 300 µg	5,4	4,2	6,4	11,8	9,6	16,4	18	3,731 ± 0,257
Bv + EC rChit37 200 µg	11,4	10,0	13,3	47,2	34,0	77,6	2	2,073 ± 0,223
Bv + EC rChit37 300 µg	12,6	11,2	14,8	45,8	33,4	73,5	5	2,290 ± 0,247

Los resultados obtenidos hasta aquí refuerzan la hipótesis de que *rChit37* es una quitinasa relevante en la virulencia de la cepa Bv062 de *B. bassiana*, como fue demostrado por el incremento de su eficacia (20%) y disminución del TL_{50} (31%) sobre *D. saccharalis*; sin embargo, bajo las condiciones evaluadas, se encontró que no está relacionada con procesos morfogénicos en lo que respecta a la velocidad de germinación y de elongación del tubo germinal, aspectos que previamente han permitido discriminar la virulencia de las cepas (Cotes & Villamizar, 2003). Lo anterior permite sugerir que el papel de la *rChit37* en el mecanismo de degradación de quitina de *B. bassiana*, se relaciona exclusivamente a la degradación de quitina exógena y que su efecto sobre la virulencia de Bv062, puede estar relacionado con dos características de esta enzima. La primera se refiere a que es una enzima secretada, lo que refuerza la hipótesis de su importancia en la degradación de quitina exógena (Duo-Chuan, 2006). La segunda es la actividad dual endo/exo quitinasa, la cual le permite una degradación eficiente de la cutícula en dos etapas: primero gracias a su actividad endoquitinasa, inicia la solubilización de quitina en la cutícula del hospedero. Lo anterior, debido a su acción no procesiva, la cual le permite degradar quitina del tipo α (con estructura altamente estable y rígida) en quitooligosacaridos de diferentes tamaños (Boldo et al., 2009). En una segunda etapa, los quitooligosacaridos son procesados, bien sea por esta misma enzima al activar su actividad exoquitinasa, o por otras enzimas del hongo con este modo procesivo de hidrólisis. Teniendo en cuenta lo anterior, se infiere que la actividad dual posiblemente acelera el proceso de penetración de la cutícula, lo que según Valero y colaboradores puede incrementar el éxito de infección y contribuir a la virulencia del hongo (Valero et al., 2016).

5 Conclusiones

- La proteína de origen viral *rChit2A* no posee actividad catalítica, sin embargo, posee un dominio de unión a quitina tipo II, el cual podría contribuir en la hidrólisis de quitina por otras enzimas en la membrana peritrófica del insecto.
- La quitinasa de origen fúngico *rChit37* se expresa de manera soluble e insoluble en el sistema de expresión *E. coli* como una enzima funcionalmente activa.
- La temperatura determina la expresión de *rChit37* de forma soluble e insoluble, siendo la forma soluble favorecida en cultivos a 30°C.
- La actividad endoquitinasa y quitobiosidasa de la enzima recombinante *rChit37* es dos veces mayor a la producida por conidios producidos en medios de cultivo con salvado de trigo como inductor de actividad quitinasa.
- El uso de *rChit37* como aditivo de una suspensión de conidios de *Beauveria bassiana*, mejora la virulencia de la cepa Bv062 sobre larvas de segundo instar de *Diatraea saccharalis*, incrementando en un 61% la eficacia y disminuyendo en un 46% el tiempo medio de mortalidad.
- La *rChit37* no presenta efectos inhibitorios o estimulantes sobre el desarrollo y viabilidad de los conidios en términos de germinación y elongación del tubo germinal.

6 Recomendaciones

Con el fin de avanzar en la exploración de alternativas de mejoramiento de bioinsecticidas, y estrategias de potenciación para la formulación de futuros bioproductos, se sugiere realizar los siguientes ensayos:

- Determinar el efecto de la *rChit37* sobre la virulencia, en términos de concentración y tiempo letal, sobre larvas y huevos de diferentes especies de complejo barrenador de la caña de azúcar, al ser usada como aditivo de *Beauveria bassiana*.
- Estandarizar la producción de la enzima recombinante *rChit37* a gran escala y evaluar la viabilidad económica de su producción dentro de una futura formulación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* o como aditivo de ésta.
- La clonación, expresión recombinante y caracterización de las otras dos quitinasas Chit66 y Chit44 de la cepa Bv062, permitirá ampliar los conocimientos alrededor del complejo sistema de degradación de la quitina en *Beauveria bassiana* y dilucidar sus papeles específicos en la morfogénesis y virulencia de este hongo entomopatógeno.
- Teniendo en cuenta que la aquí denominada *rChit2A*, posiblemente se trate de una proteína de unión a quitina sin actividad catalítica, pero con un efecto en la accesibilidad a sustratos cristalinos, que pueden promover la degradación de quitina por parte de enzimas hidrolíticas, se sugiere evaluar la *rChit2A* en conjunto con *rChit37* con el fin de determinar el efecto en la capacidad de unión de las enzimas al sustrato y en la actividad quitinasa sobre sustratos insolubles.

7 Productos de investigación

7.1 Artículo publicado en revista especializada

Los resultados de esta investigación se publicaron en la revista **Biological control**, Volumen 144, May 2020, 104211. El artículo “Enhanced virulence of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* using a soluble recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity” se encuentra anexo al final del documento (Anexo 3).

Biological Control 144 (2020) 104211



Contents lists available at ScienceDirect

Biological Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcon



Enhanced virulence of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* using a soluble recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity



Andrea Lovera^{a,b}, Mariano Belaich^c, Laura Villamizar^d, Manuel A. Patarroyo^{e,f}, Gloria Barrera^{a,*}

^a Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia

^b Master's Programme in Sciences – Microbiology, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

^c Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Área Virosis de Insectos, Universidad Nacional de Quilmes, Provincia de Buenos Aires, Argentina

^d AgResearch Ltd, Lincoln Research Centre, Christchurch 8140, New Zealand

^e Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia

^f Basic Sciences Department, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

8 Referencias bibliográficas

- Acevedo, J. P. M., Samuels, R. I., Machado, I. R., & Dolinski, C. (2007). Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, *96*(2), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.003>
- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, *150*(7), 2029–2035. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26980-0>
- Aday, O. de la C., Barroso, F., & Izquierdo, L. N. (2003). Estimación de pérdidas causadas por *Diatraea saccharalis* (Fab.), en la provincia de Villa Clara, Cuba. *Centro Agrícola*, *30*(1), 37–40.
- Ali, S., Ren, S., & Huang, Z. (2014). Extracellular lipase of an entomopathogenic fungus effecting larvae of a scale insect. *Journal of Basic Microbiology*, *54*, 1148–1159. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300813>
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.
- Alves, S. B., Rossi, L. S., Lopes, R. B., Tamai, M. A., & Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, *81*(2), 70–77. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00147-7)
- Andersen, S. O. (2009). Cuticle. In R. Vincent. H & C. Ring. T (Eds.), *Encyclopedia of insects* (Second edi, pp. 245–246). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00073-4>
- Arcas, J., Diaz, B., & Lecuona, R. (1999). Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *Journal of Biotechnology*, *67*, 151–158.
- Ardila, J. (2015). AMTEC liderando el control biologico del barrenador del tallo. *Arroz*, *63*(515), 18–25.
- Aronson, N. N., Halloran, B. A., Alexyev, M. F., Amable, L., Madura, J. D., Pasupulati, L., ... Van Roey, P. (2003). Family 18 chitinase–oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. *Biochemical Journal*, *376*(1), 87–95. <https://doi.org/10.1042/bj20030273>

- Berini, F., Caccia, S., Franzetti, E., Congiu, T., Marinelli, F., & Tettamanti, G. (2016). Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. *Pest Management Science*, *72*, 980–989. <https://doi.org/10.1002/ps.4078>
- Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., & Marinelli, F. (2018). Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.002>
- Berini, F., Presti, I., Beltrametti, F., Pedroli, M., Vårum, K. M., Pollegioni, L., ... Marinelli, F. (2017). Production and characterization of a novel antifungal chitinase identified by functional screening of a suppressive-soil metagenome. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0634-8>
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, *82*(1), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.10.009>
- Bidochka, M. J., Tong, K. I., & Khachatourians, G. G. (1993). Partial purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Canadian Journal of Microbiology*, *39*(1), 40–45. <https://doi.org/10.1139/m93-006>
- Bidochka, Michael J., & Khachatourians, G. G. (1991). The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *58*(1), 106–117. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90168-P](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90168-P)
- Boer, H., Simolin, H., Cottaz, S., Söderlund, H., & Koivula, A. (2007). Heterologous expression and site-directed mutagenesis studies of two *Trichoderma harzianum* chitinases, Chit33 and Chit42, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, *51*(2), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.07.020>
- Boldo, J. T., Junges, A., do Amaral, K. B., Staats, C. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2009). Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics*, *55*(5), 551–560. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0267-5>
- Boomsma, J. J., Jensen, A. B., Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2014). Evolutionary Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi. *Annual Review of Entomology*, *59*(1), 467–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162054>
- Busby, J. N., Landsberg, M. J., Simpson, R. M., Jones, S. A., Hankamer, B., Hurst, M. R. H., & Lott, J. S. (2012). Structural analysis of Chi1 chitinase from Yen-Tc: The multisubunit insecticidal ABC toxin complex of *Yersinia entomophaga*. *Journal of Molecular Biology*, *415*(2), 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.018>
- Bustillo, A. (2013). *Insectos Plaga y Organismos Benéficos del Cultivo de la Caña de Azúcar en Colombia*. Cali, Colombia: Cenicaña. Retrieved from www.cenicana.org
- Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M., & Ratcliffe, N. A. (2016). Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Advances in Genetics*, *94*, 307–364. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos*

- entomopatogenos*. Lima, Perú: Centro internacional de la papa.
- Capinera, J. L. (2001). *Sugarcane Borer*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) (No. EENY217). Florida.
- Cardona, L.F & Soto, A. (2015). Susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* (f) (Lepidoptera: Crambidae) a diferentes hongos entomopatógenos en Caña Panelera. *Boletín Científico Centro De Museos. Museo De Historia Natural. Universidad De Caldas*, 19(2), 95–103. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v19n2/v19n2a06.pdf>
- Castro, B., Riley, T., Leonard, R., & Baldwin, J. (2004). Borers Galore: Emerging Pests in Louisiana Corn, Grain Sorghum and Rice. *Louisiana Agriculture*, 47(1), 4–7.
- Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gomez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 77, 101–108. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000200002&nrm=iso
- Correa, F., Silva, C. L. T., Pelosi, A. P., Almeida, A. C. S., Heinrichs, E. A., Barrigossi, J. A. F., & Jesus, F. G. (2017). Resistance in 27 rice cultivars to sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology*, 111(1), 422–427. <https://doi.org/10.1093/jee/tox291>
- Cotes, A. M., & Villamizar, L. (2003). Efecto de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*. *Revista Colombiana de Entomología*, 29(2), 121–126.
- Cuartas, P., Barrera, G., Belaich, M., Barreto, E., Ghiringhelli, P., & Villamizar, L. (2015). The Complete Sequence of the First Spodoptera frugiperda Betabaculovirus Genome: A Natural Multiple Recombinant Virus. *Viruses*, 7, 394–421. <https://doi.org/10.3390/v7010394>
- Cuartas, P., Barrera, G., Gómez, J., Barreto, E., & Villamizar, L. (n.d.). Synergistic effect of nucleopolyhedrovirus and granulovirus mixtures for controlling *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest Management Science*.
- Cuevas, A. (2010). *El barrenador del tallo: otro insecto favorecido por factores climáticos*. *Boletín informativo de la federación nacional de arroz FEDEARROZ* (Vol. N° 239). Bogotá.
- Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W. K., & Shimada, T. (2007). Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Archives of Virology*, 152(9), 1655–1664. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1000-7>
- Daimon, Takaaki, Katsuma, S., Kang, W. K., & Shimada, T. (2006). Comparative studies of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus chitinase and its host ortholog, BmChi-h. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 825–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.112>
- Danişmazoğlu, M., Demir, İ., Sezen, K., Muratoğlu, H., & Nalçacioğlu, R. (2015). Cloning and expression of chitinase A, B, and C (chiA, chiB, chiC) genes from *Serratia*

- marcescens originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 78–87. <https://doi.org/10.3906/biy-1404-31>
- de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., ... Hulo, N. (2006). ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), 362–365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- Díaz, B., & Lecuona, R. (1995). Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromicotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). *Agriscientia*, XII, 33–38.
- Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M. A., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., Kryukov, V. Y., Grizanova, E. V., ... Butt, T. M. (2013). Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060248>
- Duo-Chuan, L. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161(6), 345–360. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0024-y>
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Research*, 32(5).
- Espinel-correal, C., Le, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddám, J. L., Cotes, A. M., & Lopez, M. (2010). Genetic and Biological Analysis of Colombian Phthorimaea operculella Granulovirus Isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 76(22), 7617–7625. <https://doi.org/10.1128/AEM.00999-10>
- Estrada, M. E., Romero, M., & Rivero, M. J. (2004). Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba (Balsamo) Vuillemin in the sugar cane. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 42–43.
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., ... Pei, Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 295–302. <https://doi.org/10.1128/AEM.01974-06>
- Fan, Y., Zhang, Y., Yang, X., Pei, X., Guo, S., & Pei, Y. (2007). Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 56, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.06.012>
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., M, Fan, Y., ... Pei, Y. (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene Bbchit1 and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 363–370. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.363>
- Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>
- Federici, B. A. (1999). A Perspective on Pathogens as Biological Control Agents for Insect Pests. In T. Bellows & T. Fisher (Eds.), *Handbook of Biological Control Principles and*

- applications of Biological control* (pp. 517–548). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012257305-7/50065-5>
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1), 3–34. <https://doi.org/10.1080/09583159409355309>
- Feng, P., Shang, Y., Cen, K., & Wang, C. (2015). Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11365–11370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503200112>
- Ferrer-Millares, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. In E. García-fruitós (Ed.), *Insoluble proteins. Methods and protocols* (pp. 1–26). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5>
- Francischini, F. J. B., De Campos, J. B., Alves-Pereira, A., Gomes Viana, J. P., Grinter, C. C., Clough, S. J., & Zucchi, M. I. (2017). Morphological and molecular characterization of Brazilian populations of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) and the evolutionary relationship among species of *Diatraea* Guilding. *PLoS ONE*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186266>
- Frederiksen, R. F., Paspaliari, D. K., Larsen, T., Storgaard, B. G., Larsen, M. H., Ingmer, H., ... Leisner, J. J. (2013). Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART 5), 833–847. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051839-0>
- García-fruitós, E., González-montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Arís, A., ... Villaverde, A. (2005). Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microbial Cell Factories*, 4(27), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-27>
- García, J., Sotelo, P., Monroy, D., Barrera, G., Gómez-Valderrama, J., Espinel, C., ... Villamizar, L. F. (2018). Identification and characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate having a high potential for the control of the *Diatraea* sp. sugarcane stem borer. *BiotechnolAppl*, 35(1), 1201–1207.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. ., Appel, R. ., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The proteomics protocols handbook* (pp. 571–607). Humana Press.
- Gómez, L. A., & Vargas, G. A. (2014). *Los barrenadores de la caña de azúcar Diatraea spp., en el valle del rio Cauca: investigación con énfasis en control biológico*. (No. 734). Santiago de Cali.
- Goñi, O. (2011). *Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3-β-glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de "Annona cherimola" Mill. Por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO2*. Universidad Complutense de Madrid.
- Guevara, E., López, A., Jimenez, L., & Sotelo, R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial.

Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud, 15(3), 8–17.

- Gutternigg, M., Kretschmer-Lubich, D., Paschinger, K., Rendić, D., Hader, J., Geier, P., ... Wilson, I. B. H. (2007). Biosynthesis of truncated N-linked oligosaccharides results from non-orthologous hexosaminidase-mediated mechanisms in nematodes, plants, and insects. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27825–27840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704235200>
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., & Javed, S. (2013). Chitinases : An update. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 5(1), 21–29. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>
- Han, B., Zhou, K., Li, Z., Sun, B., Ni, Q., Meng, X., ... Zhou, Z. (2016). Characterization of the First Fungal Glycosyl Hydrolase Family 19 Chitinase (NbchiA) from *Nosema bombycis* (Nb). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 37–45. <https://doi.org/10.1111/jeu.12246>
- Hartl, L., Zach, S., & Seidl-seiboth, V. (2012). Fungal chitinases : diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 533–543. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3723-3>
- Haseeb, M., & Srivastava, R. (2014). Potencial of Entomopathogenic fungi in Bio-Management insect pest. In N. Sharma (Ed.), *Biological Controls for Preventing Food Deterioration: Estrategies for Pre - and postharvest manangement*. (pp. 163–182). John Wiley y Sons, Ltd.
- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., ... Possee, R. D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, 238(2), 243–253. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8816>
- Henrissat, B., Vegetales, M., & Grenoble, F. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochemical Journal*, 280, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s007920050009>
- Hernández-Velázquez, V. M., Lina-García, L. P., Obregón-Barboza, V., Trejo-Loyo, A. G., & Peña-Chora, G. (2012). Pathogens associated with sugarcane borers, diatraea spp. (Lepidoptera: Crambidae): A review. *International Journal of Zoology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/303589>
- Herrera-Estrella, A., & Chet, I. (1999). Chitinases in biological control. In P. Jolles & R. Muzarelli (Eds.), *Chitin and chitinases* (pp. 171–184). Boston: Birkhauser. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8757-1_12
- Hodgson, J. J. (2011). *Functions of the viral chitinase (CHIA) in the processing , subcellular trafficking and cellular retention of proV-CATH from Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus by. university of Guelph.*
- Holder, D.J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260–5266. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260>
- Holder, Diane J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2007). Surface

- characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology*, *153*(10), 3448–3457. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008524-0>
- Hong-Bing, S., & Kuo-Chen, C. (2010). Virus-mPLoc: a fusion classifier for viral protein subcellular location prediction by incorporating multiple sites. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, *28*, 175–186.
- Hoog, G. . (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Micology*, *1*, 1–41.
- ICA. Resolución 00698 de 2011, Pub. L. No. 000698 (2011). Colombia: ICA.
- ICA. (2011b). Silenciosa batalla contra el barrenador de la caña *Diatraea saccharalis*. Retrieved September 14, 2016, from <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2011/Silenciosa-batalla-contra-el-barrenador-de-la-cana.aspx>
- Ihrmark, K., Asmail, N., Ubhayasekera, W., Melin, P., & Stenlid, J. (2010). Comparative Molecular Evolution of *Trichoderma* Chitinases in Response to Mycoparasitic Interactions. *Evolutionary Bioinformatics*, *6*, 1–26.
- Ike, M., Nagamatsu, K., Shioya, A., Nogawa, M., Ogasawara, W., Okada, H., & Morikawa, Y. (2006). Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(3), 294–303. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0171-y>
- Invitrogen. User Manual pEXP-5-NT/TOPO and pEXP-5-CT/TOPO (2006).
- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. Il, Lee, C. H., & Nah, J. W. (2004). Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, *42*(14), 3423–3432. <https://doi.org/10.1002/pola.20176>
- Jaques, A. K., Fukamizo, T., Hall, D., Barton, R. C., Escott, G. M., Parkinson, T., ... Adams, D. J. (2003). Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiology*, *149*(10), 2931–2939. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26476-0>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., ... Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. <https://doi.org/doi:10.1093/bioinformatics/btu031>
- Joyce, A. L., White, W. H., Nuessly, G. S., Solis, M. A., Scheffer, S. J., Lewis, M. L., & Medina, R. F. (2014). Geographic Population Structure of the Sugarcane Borer , *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), in the Southern United States. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110036>
- Kall, L., Krogh, A., & EL, S. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, *Jul*(35), W429-32.
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E., & O'Reilly, D. R. (1998). Identification and characterization of the *Cydia Pamonella* granulovirus cathepsin and chitanase genes.

- Journal of General Virology*, 79(1998), 2283–2292.
- Kim, J., Roh, J., Choi, J., Wang, Y., Shim, H., & Je, Y. (2010). Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biology*, 114(1), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.011>
- Krogh, A., Larsson, È., Heijne, G. Von, & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kuttiyawong, K., Nakapong, S., & Pichyangkura, R. (2008). The dual exo/endo-type mode and the effect of ionic strength on the mode of catalysis of chitinase 60 (CHI60) from *Serratia* sp. TU09 and its mutants. *Carbohydrate Research*, 343(16), 2754–2762. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.05.020>
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control*, 21, 230–248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>
- Lacey, L., & Solter, L. (2012). Initial handling and diagnosis of diseased invertebrates. In L. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (Second, pp. 1–14). Washington: Academic press.
- Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lai, Y., Chen, H., Wei, G., Wang, G., Li, F., & Wang, S. (2017). In vivo gene expression profiling of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* elucidates its infection stratagems in *Anopheles* mosquito. *Science China Life Sciences*, 60(8), 839–851. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9101-3>
- Lara, A. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 209–223.
- Laribi-habchi, H., Biche, M., Drouiche, N., & Boudjemaa, N. (2014). Efficacy of crude and purified chitinases (Sschi50) extracted from offal Red scorpion fish in biological control of chickpea weevil (*Callosobruchus maculatus* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 1745–4549. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12354>
- Laribi-habchi, H., Bouanane-darenfed, A., & Drouiche, N. (2015). Purification , characterization , and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* stain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1117–1128. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.035>
- Leucona, R., & Alves, S. (1988). Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc) Petch. and granulose virus on *Diatraea saccharalis* (F.,1794) at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, 105, 223–228.
- Li, H., & Greene, L. H. (2010). Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding. *Plos One*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008654>

- Liceras, L., Valladares, L., Reyna, R., & Escuadra, H. (2007). Biología de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera:Pyralidae) alimentado con dos tipos de *Zea mays* (L .). *Pueblo Continente*, 18(1), 85–93.
- Liu, D., Cai, J., Xie, C. chu, Liu, C., & Chen, Y. hua. (2010). Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. colmeri, and its biocontrol potential. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3–4), 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.007>
- Liu, H., Zhao, X., Guo, M., Liu, H., & Zheng, Z. (2015). Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia. *BioMedCentral Microbiology*, 15, 267. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0592-4>
- Liu, S., Shao, S., Li, L., Cheng, Z., Tian, L., Gao, P., & Wang, L. (2015). Substrate-binding specificity of chitinase and chitosanase as revealed by active-site architecture analysis. *Carbohydrate Research*, 418, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.10.002>
- Liu, X., Ma, X., Lei, C., Xiao, Y., Zhang, Z., & Sun, X. (2011). Synergistic effects of *Cydia pomonella* granulovirus GP37 on the infectivity of nucleopolyhedroviruses and the lethality of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Virol*, 156, 1707–1715. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1039-3>
- Lovera, A., Belaich, M., Mejía, C., Villamizar, L., Patarroyo, M., & Barrera, G. (2018). Characterization of chitinases of *Beauveria bassiana* (Bv) induced in semisolid-state fermentation. In *International Congress of Invertebrate Pathology and Microbial Control and the 51st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology* (p. Agosto). Gold Coast.
- Lv, J., Wilson, L. T., Beuzelin, J. M., & Reagan, T. E. (2010). Rice tillering and yield as affected by artificial and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) culm injury. *Environ Entomol*, 39(2), 528–534. <https://doi.org/10.1603/EN09275>
- Maina, U. M., Galadima, I. B., Gambo, F. M., & Zakaria, D. (2018). A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 27–32.
- Mamarabadi, M., Jensen, B., & Lübeck, M. (2008). Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. *Current Genetics*, 54(2), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00294-008-0199-5>
- Manjeet, K., Purushotham, P., Neeraja, C., & Podile, A. R. (2013). Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases. *Microbiological Research*, 168(7), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.01.006>
- Marín, P., Posada, F., Gonzalez, M. teresa, & Bustillo, A. E. (2000). Calidad biológica de formulaciones de *Beauveria bassiana* usadas en el control de la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología*, 26(1–2), 17–23.
- Martinez, E. A., Boer, H., Koivula, A., Samain, E., Driguez, H., Armand, S., & Cottaz, S. (2012). Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: Catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1–2), 89–96.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.09.003>

- Mejia, C. (2018). *Potenciación de conidios de Beauveria bassiana como principio activo de un bioplaguicida para el control de larvas de Diataraea spp.* Universidad Nacional de Colombia.
- Meng, H., Wang, Z., Meng, X., Xie, L., & Huang, B. (2015a). Cloning and expression analysis of the chitinase gene Ifu-chit2 from *Isaria fumosorosea*. *Genetics and Molecular Biology*, 38(3), 381–389.
- Meng, H., Wang, Z., Meng, X., Xie, L., & Huang, B. (2015b). Cloning and expression analysis of the chitinase gene Ifu-chit2 from *Isaria fumosorosea*, 389, 381–389.
- Merzendorfer, H. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4393–4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>
- Molecular European Biology Laboratory. (2016). Protein expression and purification core facility. Retrieved from https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/choice_expression_systems/comparison_expression_systems/
- Mondal, S., Baksi, S., Koris, A., & Vatai, G. (2016). Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(2), 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.pusra.2016.10.001>
- Nava, I. (2009). *Demostracion de la actividad de quitina desacetilasa en Bacillus thuringiensis.* Instituto Politecnico Nacional.
- Ni, H., Zeng, S., Qin, X., Sun, X., Zhang, S., Zhao, X., ... Li, L. (2015). Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to improve chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematocidal activities. *International Journal of Biological Sciences*, 11(3), 304–315. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10632>
- Okongo, R. N., Puri, A. K., Wang, Z., Singh, S., & Permaul, K. (2018). Comparative biocontrol ability of chitinases from bacteria and recombinant chitinases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.11.007>
- Ortiz, A., & Keyhani, N. O. (2016). Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. *Advances in Genetics*, 94, 165–249. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>
- Osorio, G. (2007). *Buenas prácticas agrícolas -BPA- y buenas prácticas de manufactura -BPM- en la producción de caña y panela.* Medellín: CTP Print Ltda. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7), 473–483. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00134-4)
- Paul Vuillemin, M. (1912). *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées. *Bulletin de La Societe Botanique de France*, 59(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/00378941.1912.10832379>

- Pedrini, N., Ortiz-urquiza, A., Huarte-bonnet, C., Zhang, S., Dispirito, A. A., & State, O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00024>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pierleoni, A., Martelli, P. L., Fariselli, P., & Casadio, R. (2007). BaCellLo: a Balanced subCellular Localization predictor. *Protocol Exchange*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.165>
- Prakash, M. (2008). Insect biochemistry. In *Encyclopedia of entomology Vol 1*. (pp. 36–37). New Delhi: Discovery publishing house PVT. Ltd.
- Raikhel, N. ., & Lee, H.-I. (1993). Structure and function of Chitin-Binding Proteins. *Annual Reviews Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol*, 44, 591–615.
- Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., De Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., ... Pennacchio, F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(11), 1205–1213. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.08.002>
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., ... Planck, M. (1996). Synergistic Activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin and a Bacterial Endochitinase against *Spodoptera littoralis* Larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3581–3586.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84–98. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>
- Reichard, U., Hung, C. Y., Thomas, P. W., & Cole, G. T. (2000). Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity*, 68(10), 5830–5838. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5830-5838.2000>
- Rice, M. (2012). *Southwestern corn borer*. (CROP FOCUS). <https://doi.org/10.4039/Ent122935-9>
- Rocha, Z. (2009). *Estudio de la producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecaniien* cultivos líquido y sólido utilizando diversas fuentes de carbono*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rohrmann, G. (2013). *Baculovirus Molecular Biology* (3rd ed.). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). <https://doi.org/NBK114593>
- Salvador, R., & Ferrelli, M. L. (2014). Analysis of a chitinase from EpapGV , a fast killing betabaculovirus. *Virus Genes*, 48, 406–409. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-1019-7>
- Santos, A. (2014). *Potenciación ecofisiológica de conidios de *Nomuraea rileyi* mediante el*

- uso de factores abióticos de estrés. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.* Universidad Nacional de Colombia.
- Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T., & Fukamizo, T. (2002). Comparative Study of the Reaction Mechanism of Family 18 Chitinases from Plants and Microbes 1. *Comparative and General Pharmacology*, 564, 557–564.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Review*, 22, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>
- Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2005). A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal*, 272(22), 5923–5939. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04994.x>
- Serra, G., & Trumper, E. (2006). Estimación de incidencia de daños provocados por larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) en tallos de maíz mediante evaluación de signos externos de infestación. *Agriscientia*, XXIII(1), 1–7.
- Shternshis, M., Ovchinnikova, L., Duzhak, A., & Tomilova, O. (2002). The Efficiency of Viral and Bacterial Entomopathogens Formulated with Chitinase for Biocontrol of Lepidopteran Cabbage Pests. *Archives of Phytopathology. Plant Protection.*, 35, 161–169. <https://doi.org/10.1080/03235400214209>
- Shternshis, M. V. (2004). Ecologically safe control of insect pest: The past, the present and the future. In R. T. Lartey & A. Caesar (Eds.), *Emerging Concepts in Plant Health Management* (Vol. 661). Kerala, India: Research Signpost. <https://doi.org/10.13140/2.1.3354.4648>
- Singh, A. K., Singh, A., & Joshi, P. (2016). Combined application of chitinolytic bacterium *Paenibacillus* sp. D1 with low doses of chemical pesticides for better control of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Pest Management*, 62(3), 222–227. <https://doi.org/10.1080/09670874.2016.1167267>
- Sirimontree, P., Fukamizo, T., & Suginta, W. (2016). Azide anions inhibit GH-18 endochitinase and GH-20 Exo β -N-acetylglucosaminidase from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Biochemistry*, 159(2), 191–200. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv087>
- Slámová, K., Bojarová, P., Petrásková, L., & Křen, V. (2010). B-N-Acetylhexosaminidase: What's in a name...? *Biotechnology Advances*, 28(6), 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.004>
- Solis, M. A., & Metz, M. A. (2016). An illustrated guide to the identification of the known species of *diatraea* guilding (Lepidoptera, Crambidae, Crambinae) based on genitalia. *ZooKeys*, (565), 73–121. <https://doi.org/10.3897/zookeys.565.6797>
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M., & Charnley, A. K. (1991). Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(3), 415–426. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90188-V](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90188-V)
- St Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W., Roberts, D. W., & York, N. (1996).

- Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 907–912.
- St Leger, R. J., & Screen, S. (2001). Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds. In N. Butt, T. M., Jackson, C., Magan (Ed.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 219–238). New York: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0219>
- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.004>
- Suresh Kumar, T. ., Gopalakrishna, K., & Prasad. (1993). Formación de multiples bandas en SDS-PAGE.
- Svedese, V. M., Lima, E. Á. de L. A., & Porto, A. L. F. (2013). Horizontal transmission and effect of the temperature in pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 413–419. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300009>
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., & Takagi, M. (1998). oligosporus : molecular cloning and characterization. *Mycrobiology*, 144, 2647–2654.
- Tanada, Y., & Kaya, H. K. (1993). *Insect pathology*. San Diego: Academic Press.
- Tarazona, G. A. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de la caña panelera*. Bogotá D.C: Produmedios.
- Terwisscha van Scheltinga, A. C., Kalk, K. H., Beintema, J. J., & Dijkstra, B. W. (1994). Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure*, 2(12), 1181–1189. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00120-0)
- Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., & Possee, R. D. (2000). Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chiA gene. *Journal of General Virology*, 81(5), 1403–1411. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-5-1403>
- Throne, J. E., Weaver, D. K., Chew, V., & Baker, J. E. (1995). Probit Analysis of Correlated Data : Multiple Observations Over Time at One Concentration. *Journal of Economic Entomology*, 88(5), 1510–1512.
- Tjoelker, L. W., Gosting, L., Frey, S., Hunter, C. L., Trong, H. Le, Brammer, H., ... Gray, P. W. (2000). Structural and Functional Definition of the Structural and Functional Definition of the Human Chitinase Chitin-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 514–520. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.514>
- Tronsmo, A., & Harman, G. E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1010>
- Vaaje-kolstad, G., Horn, S. J., Aalten, D. M. F. Van, Synstad, B., & Vincent, G. H. (2005).

- The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 1–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504468200>
- Valero, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J. M., & van Kan, J. A. L. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133(January), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(11), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
- Van den Burg, H. A., Westerink, N., Francoijs, K. J., Roth, R., Woestenenk, E., Boeren, S., ... Vervoort, J. (2003). Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27340–27346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212196200>
- Vargas, G. A., & Gómez, L. (2005). Evaluación del daño causado por *Diatraea* spp. en caña de azúcar y su manejo en el valle del río Cauca. *Serie Divulgativa*, (9), 8.
- Vargas, G. A., & Posada, C. (2013). *Análisis económico del control biológico de Diatraea spp.* (No. 727). Cali, Colombia.
- Vargas, G., Gómez, L., & Michaud, J. (2015). Sugar cane stem borers of the Colombian Cauca River Valley : current pest status , biology , and control. *Florida Entomologist*, 98(2), 728–735.
- Veliz, E. A., Martínez-hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). UCLA Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, 3(3), 689–705. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.689>
- Ventura, S., & Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *TRENDS in Biotechnology*, 24(4). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.007>
- Vilela, M., Nunes dos Santos, A., Ferreira, M., da Costa, R., da Silva, D., Ferreira, D., ... Martins, S. (2017). Influence of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) infestation on sweet sorghum productivity and juice quality. *African Journal of Agricultural Research*, 12(39), 2877–2885. <https://doi.org/10.5897/AJAR2017.12431>
- Wanchoo, A., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2009). Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155(9), 3121–3133. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029157-0>
- Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., Wang, Z.-L., Zhang, S., Xie, X.-Q., ... Feng, M.-G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2, 483. <https://doi.org/10.1038/srep00483>
- Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., & Jiang, Z. (2016). Cloning , expression , purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chemistry*, 192, 1041–1048.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.092>

- Yang, S., Song, S., Yan, Q., Fu, X., Jiang, Z., & Yang, X. (2014). Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3 β -N-acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(22), 5181–5190. <https://doi.org/10.1021/jf500912b>
- Yasem de Romero, M. G., Salvatore, A. R., López, G., & Willink, E. (2008). Presencia natural de hongos hyphomycetes en larvas invernantes de *Diatraea saccharalis* F. en caña de azúcar en Tucumán, Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, *85*(2), 39–42.
- Zappellini, L. O., Almeida, J. E. M., Batista Filho, A., & Giometti, F. H. C. (2010). Seleção de isolados fungo entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. visando o controle da boca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). *Arq. Inst. Biol.*, *77*(1), 75–82.
- Zar, J. (1999). *Biostatistical analysis*. (P. Hall, Ed.) (cuarta Ed.). New Jersey.
- Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., & Keyhani, N. O. (2011). Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology*, *80*(3), 811–826. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07613.x>
- Zhang, Y.-J., Feng, M.-G., Fan, Y.-H., Luo, Z.-B., Yang, X.-Y., Wu, D., & Pei, Y. (2008). A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Science and Technology*, *18*(6), 551–563. <https://doi.org/10.1080/09583150802082239>
- Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, X., Wang, G., Luo, Z., Fan, Y., ... Pei, Y. (2010). Requirement of a mitogen-activated protein kinase for appressorium formation and penetration of insect cuticle by the entomopathogenic fungus *beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(7), 2262–2270. <https://doi.org/10.1128/AEM.02246-09>
- Zhao, H., Lovett, B., Fang, W., Microbiolog, C. D. E., Hubbard, M., Hynes, R. K., ... Federici, B. A. (2016). Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi. *Handbook of Biological Control Principles and Applications of Biological Control*, *94*(October), 137–163. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012257305-7/50065-5>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, *17*(6), 553–596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>
- Zúñiga-oviedo, M. A., Soto-Giraldo, A., & Cruz-Ceron, G. (2016). Actividad biológica de hongos y bacterias entomopatógenas sobre *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: crambidae). *Boletín Científico Museo de Historia Natural*, *20*(2), 82–92.

Anexos

A. Anexo 1: Preparación de reactivos y soluciones

a) Buffer de extracción y lisis* desnaturalizante

Prepare un stock de 1000mL, disolviendo primero todos los reactivos (Tabla I) con excepción de Urea en un volumen máximo de 400 mL y posteriormente agregue la Urea dosificadamente para permitir su completa solubilización. Ajuste el pH a 8,0 con NaOH y afofe con agua desionizada. Filtre antes de usar.

Tabla I. Preparación de buffer de extracción desnaturalizante

Reactivo	Concentración final	Masa molecular	Cantidad en g para 1 L
NaH ₂ PO ₄	100 mM	137,99 g/mol	13,8 g
Tris base	10 mM	121,14 g/mol	1,2 g
Imidazol	25 mM	68,08 g/mol	1,7 g
UREA	6 M	60,06 g/mol	360,36 g

Antes de usar agregue Inhibidores de proteasas según tabla II

Tabla II. Inhibidores de proteasas

Inhibidor de proteasa	[stock]	[final]
-----------------------	---------	---------

Iodoacetemida	100 mM	1 mM
PMSF	100 mM	1 mM
Leupectina	1000 µg/mL	1 µg/mL

*Para buffer de lisis desnaturizante, adicione lisozima a una concentración final de 0,1mg/mL e inhibidores de proteasas según tabla II.

b) Buffer de lisis nativo (bajo condiciones solubles)

Prepare 50 mL. Disuelva los tres primeros componentes (Tabla III), ajuste el pH a 8,0 y almacene a 4°C. Agregue los demás componentes antes de utilizarlo.

Tabla III. Preparación Buffer de lisis nativo

Reactivo	[Stock]	[Final]	Cantidad para 50mL
Tris base	-	50 mM	302 mg
EDTA	-	1 mM	18 mg
NaCl	-	100 mM	292 mg
PMSF	100 mM	1mM	500 µL
Lisozima	0,1mg/mL	10µg/mL	0,5 mg
DNasa I	10µg/mL		10 µL

c) Buffer de lavado

Prepare 50 mL. Disuelva los dos primeros componentes (Tabla IV), ajuste el pH a 8,0 y almacene a 4°C. Agregue el PMSF antes de utilizarlo. Nota: La concentración de EDTA en esta solución no hace apta las fracciones obtenidas en estos pasos para su purificación en la columna de Ni.

Tabla IV. Preparación Buffer de lavado.

Reactivo	[Stock]	[Final]	Cantidad para 50mL
Triton X-100	-	0,5%	250 µL
EDTA	-	10 mM	186 mg
PMSF	100 mM	1mM	500 µL

d) Solución de diálisis: Tris HCl 20mM, pH 8,5

Prepare con agua desionizada un stock 10X de 1000mL y ajuste el pH con HCl 6N. Almacene a temperatura ambiente. Para su uso, diluya a 1X y almacene a 4°C.

Tabla V. Preparación solución de diálisis stock 10X

Reactivo	Peso molecular g/mol	[stock 10X]	Cantidad en g para 1 L
Tris base	121,14	200mM	24,2

e) Buffer de extracción bajo condiciones solubles

Disuelva muy bien cada componente (Tabla VI) en agua desionizada ajuste el pH con NaOH.

Tabla VI. Preparación Buffer de extracción bajo condiciones solubles

Reactivo	Concentración final	Masa molecular	Cantidad en g para 1 L
NaH ₂ PO ₄	50 mM	137,99 g/mol	6,90g
NaCl	300 mM	58,44 g/mol	17,54 g
Imidazol	20 mM	68,08 g/mol	1,36 g

f) Soluciones de elución

Prepare en agua desionizada una solución de Imidazol 500mM y ajuste el pH a 8,0. A partir de este stock, prepare las soluciones de elución descritas en la tabla VII. Verifique y ajuste el pH a 8,0 de ser necesario en cada concentración.

Tabla VII. Preparación soluciones de elución

Fracción	Concentración de imidazol
1	50 mM
2	75 mM
3	100 mM
4	150 mM
5	200 mM
6	250 mM

7	300 mM
8	500 mM

B. Anexo 2: Genomas de granulovirus usados para el análisis bioinformático de quitinasas de SfGV VG008.

Granulovirus	N° de acceso	Abreviatura	Quitinasas reportadas Protein_ID
<i>Adoxophyes orana</i> GV	NC_005038	AdorGV	NR
<i>Agrotis segetum</i> GV	NC_039213	AsGV	YP_009513066.1
<i>Artogeia rapae</i> GV	NC_013797	PrGV	YP_003429334.1
<i>Choristoneura fumiferana</i> GV	NC_008168	CoGV	NR
<i>Clostera anastomosis</i> GV Henan	NC_022646	CaLGV	YP_008719957.1
<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV	NC_005068	CIGV	Quitinasa truncada Gene ID: 1725095
<i>Cydia pomonella</i> GV	NC_002816	CpGV	NP_148794.1
<i>Epinotia aporema</i> GV	NC_018875	EpaGV	YP_006908540.1
<i>Helicoverpa armigera</i> GV	NC_010240	HaGV	YP_001649087.1
<i>Mythimna unipuncta</i> GV	NC_033780.2	MyunGV	NR
<i>Mocis latipes</i> GV	NC_029996	MolaGV	NR
<i>Phthorimaea operculella</i> GV	NC_004062	PhopGV	NR
<i>Pseudaletia unipuncta</i> GV	NC_013772	PsunGV	YP_003422447.1
<i>Plutella xylostella</i> GV	NC_002593	PxGV	NR
<i>Spodoptera litura</i> GV	NC_009503	SIGV	NR
<i>Xestia c-nigrum</i> GV	NC_002331	XecnGV	NP_059251.1

C. Anexo 3: Artículo publicado en revista especializada.



Enhanced virulence of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* using a soluble recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity

Andrea Lovera^{a,b}, Mariano Belaich^c, Laura Villamizar^d, Manuel A. Patarroyo^{e,f}, Gloria Barrera^{a,*}

^a Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia

^b Master's Programme in Sciences – Microbiology, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

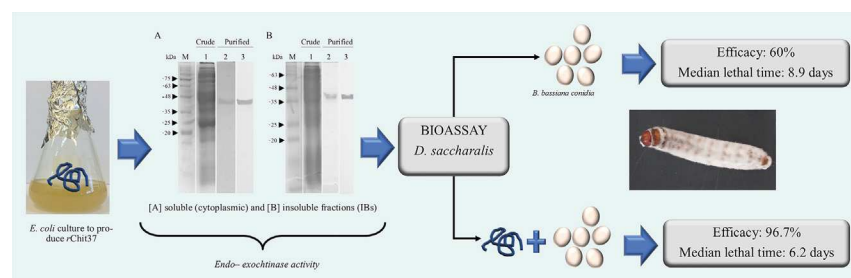
^c Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Área Virosis de Insectos, Universidad Nacional de Quilmes, Provincia de Buenos Aires, Argentina

^d AgResearch Ltd, Lincoln Research Centre, Christchurch 8140, New Zealand

^e Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Immunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia

^f Basic Sciences Department, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Beauveria bassiana
Chitinase
Virulence
Diatraea saccharalis
Recombinant protein

ABSTRACT

Beauveria bassiana chitinases are involved in degrading the chitin in insects' exoskeletons and internal structures, and thus are important virulence factors as they participate in initial to final steps of infection. In this work, the *B. bassiana* (Bv062 isolate) open reading frame (ORF) encoding a chitinase identified as Chit37 (orthologous Bvchit1) was molecularly cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the potential of the recombinant protein (rChit37) to enhance the insecticidal activity of Bv062 conidia against second instar *Diatraea saccharalis* larvae was studied. rChit37 was produced in both soluble and insoluble fractions of an *E. coli* culture. Both fractions expressing endo- (90 mU/μL) and exochitinase (170 mU/μL) enzymatic activity, with optimum conditions for enzyme activity of 45 °C and pH 5.0. His-tag affinity chromatography was used to purify the rChit37 from the soluble fraction. Purified rChit37 was then diluted to 200 and 300 μg/mL for use as Bv062 conidia additive (1x10⁶con/mL) in a laboratory bioassay against *D. saccharalis* larvae. No significant differences were observed between the efficacy of Bv062 conidia applied alone or mixed with 200 μg/mL purified rChit37. However, 300 μg/mL rChit37 increased Bv062 conidia insecticidal activity, achieving 96.7% efficacy (14 days post-infection) and 6.2 days median lethal time (LT₅₀), compared to 60% efficacy and 8.9 days for conidia alone. rChit37 addition did not affect conidial viability in terms of germination (96.6% after 24 h) or vigour estimated as germ-tube elongation rate. This work provides proof of concept about soluble recombinant chitinase as an additive to enhance *B. bassiana* virulence against *D. saccharalis*.

* Corresponding author.

E-mail address: gbarrera@agrosavia.co (G. Barrera).

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104211>

Received 21 October 2019; Received in revised form 6 January 2020; Accepted 27 January 2020

1049-9644/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Entomopathogenic fungi play an important role in nature in maintaining dynamic equilibrium in different groups of insect populations (Maina et al., 2018). Many fungal species are currently used as biological control agents for pests because they are environmentally friendly and provide an effective alternative to using chemical products. *Beauveria bassiana* isolate ingredients are most frequently used in bioinsecticide formulations (Butt et al., 2016; Haseeb and Srivastava, 2014) due to their specificity concerning host range, their mode of action by contact, their ability to evade the insect's immune responses and having important attributes facilitating mass production at an industrial level, such as rapid *in vitro* growth in different culture media (Federici, 1999; Haseeb and Srivastava, 2014; Lacey et al., 2001). However, biological control products based on entomopathogenic fungi have poor market share, due to the need for a large amount of propagule for producing an efficient mortality rate. The initial latency period for establishing infection must also be considered; this time can be lengthy and susceptible insects can stay active and cause serious damage to crops until the fungus compromises affected individuals' welfare (Fan et al., 2007a; Federici, 1999; St Leger and Screen, 2001).

Strategies for improving and expanding the use of biological control agents in agriculture have thus been proposed and evaluated, such as the use of genetically-modified organisms (Zhao et al., 2016), mixtures of entomopathogenic agents having synergistic activity (Cuartas et al., n.d.; Salvador, 2010) and using secondary microbial metabolites and/or virulence factors as additives for biological control agents (Shternshis, 2004; Zhang et al., 2008). The biological stages of infection driven by entomopathogenic agents must thus be analysed for identifying key factors which can be added as enhancers. For example, entomopathogenic fungi require the action of the hydrolytic enzymes known as chitinases. These proteins play a fundamental role in degrading the chitin that makes up insects' cuticle, thereby enabling fungal entry to the haemocoel and enabling the subsequent colonisation of other tissues (Butt et al., 2016; Ortiz and Keyhani, 2016; Valero et al., 2016; Xiao et al., 2012; Zhao et al., 2016).

Fungal strains have therefore been genetically modified to over-express this type of enzyme, achieving increased virulence against a particular host (Boldo et al., 2009; Fan et al., 2007a; Fang et al., 2005); however, their release concerning the field of genetically-modified microorganisms raises controversy over possible environmental risks (Arora and Shera, 2014). Their use in formulating biological control products is restricted in Colombia (ICA, 2011a) and, although genetically-modified microorganisms are not prohibited in European Union countries, in the United States and China, their use is confined and a detailed case-by-case study is carried out at different risk levels before their commercial or environmental release (Ce et al., 2009; Restrictions on Genetically Modified Organisms, 2014). Adding additives acting as enhancers in bioinsecticide formulations to avoid such obstacles seems to be an alternative having a greater future than those based on active ingredients' genomic edition.

Shternshis et al., (Shternshis et al., 2002; Shternshis, 2004) have carried out studies demonstrating that exogenous chitinases can increase entomopathogenic agents' insecticide activity or reduce required application doses when used together with *Bacillus thuringiensis*, the *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus (MabrNPV) and/or *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV). Biocontrol agents' endogenous virulence factors can also be used for enhancing infection when added to formulations.

To the best of our knowledge, endogenous chitinase used as additives for enhancing entomopathogenic fungi has not been reported previously. This work was thus aimed at producing a soluble recombinant chitinase from a gene from the Colombian *B. bassiana* BV062 isolate using an *Escherichia coli* expression system and evaluating its potential for enhancing the insecticidal activity of conidia from the same fungus. The expression and effectiveness of fungal formulations

containing this additive evaluated on *Diatraea saccharalis* larvae are presented and discussed.

2. Materials and methods

2.1. Maintaining *Beauveria bassiana* and rearing *Diatraea saccharalis*

The Colombian isolate of *Beauveria bassiana* Bv062 was provided by the Germplasm Bank of Microorganisms of Interest in Biological Control from the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) (Tibaitatá Research Centre, Mosquera, Colombia). The fungus was reactivated in potato dextrose agar (PDA) supplemented with 0.1% chloramphenicol at 25 °C for 7 days (García et al., 2018). Second instar *D. saccharalis* larvae maintained in Agrosavia's entomology laboratory were used in controlled temperature (25 °C), relative humidity (60%) and photoperiod conditions (16: 8 h of light: dark) and fed with artificial diet (Lastra et al., 2006).

2.2. Bioinformatics analysis

PacBio and Illumina Technologies (Macrogen Services, South Korea; own data, unpublished) obtained and provided the nucleotide and amino acid (aa) sequence of a chitinase encoding gene from the fully sequenced *B. bassiana* BV062 genome. From now on, this protein will be called Chit37 (GenBank ID: MN871410), according to the activity it would have (chitinase; "Chit") and its theoretical molecular weight (approximately 37 kDa; "37"). Homologous sequences were obtained from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and then compared using the BLAST algorithm (Altschul et al., 1990) and Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) 3.8 for protein sequence alignment (Altschul et al., 1990). SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011), the TMHMM server V 2.0 (Krogh et al., 2001) and Phobius (Kall et al., 2007) were used for identifying and discriminating signal peptides and transmembrane regions; the BaCello prediction server (Pierleoni et al., 2007) was used for predicting subcellular location and the ProtParam tool (Gasteiger et al., 2005) for predicting physico-chemical characteristics. InterProScan 5 (Jones et al., 2014) and PrositeScan (De Castro et al., 2006) tools were used for functional annotation.

2.3. Chitinase gene molecular cloning

A ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) was used for isolating genomic DNA (gDNA) from the fungus, according to the manufacturer's recommendations. The Bb062_Chit37 open reading frame (ORF) was amplified by PCR, using specific primers (forward: 5'-ATGGCTCCTTTCTTCAAACCA-3'; reverse: 5'-GCAGTCCC CAAAGTCCCCTTG-3') and Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The following profile was used: 5 min at 94 °C (1 cycle), 10 sec at 92 °C, 15 sec at 55 °C, 1 min at 72 °C (35 cycles) and 10 min at 72 °C (1 cycle). Amplified fragments were resolved by agarose gel electrophoresis, recovered using Wizard SV gel and a PCR Clean-up system kit (Promega, Madison, WI, USA) and then molecularly cloned in pEXP5-CT/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and *E. coli* Top 10 (chemocompetent cells; Invitrogen, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The resulting construct (pEXP5-Bb062_Chit37) was isolated using an UltraClean 6-Minute Mini Plasmid Prep kit (Mo Bio, laboratories, Inc.; Qiagen, Hilden, Germany) with Luria-Bertani cultures from selected *E. coli* clones. The Sanger sequencing method (MACROGEN, Seoul, South Korea) was used for verifying their identity.

2.4. Protein expression and purification

pEXP5-Bb062_Chit37 was transformed in *E. coli* BL21-DE3 cells (Invitrogen, CA, USA), following the manufacturer's recommendations.

Protein expression tests were carried out in 5 mL LB broth cultures supplemented with 0.1 mg/mL ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C with shaking at ~200 × rpm. 1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added when the cultures reached 0.5 optical density (OD600). After 4 h incubation in induced conditions, cells were recovered by spinning at 4000 × g for 10 min at 4 °C and stored at -20 °C until use. Protein expression was scaled-up to 200 mL using an inoculum grown as mentioned above. 0.5 mM IPTG was used to induce expression by incubation for 4 h at 30 °C with shaking at ~250 rpm. The culture was then spun at 4000 × g for 150 min and the pellet was collected for recombinant protein extraction.

Chitinase recombinant protein (rChit37) was extracted from soluble (S) and insoluble (I) fractions by adapting reported methods (Fan et al., 2007b). Briefly, cell pellets were suspended in lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 μg/mL lysozyme -Sigma-Aldrich- and 10 μg/mL DNase I -Invitrogen-) with three freezing cycles at -80 °C/15 min, followed by 30 min in an ice bath. The mixture was spun for 30 min at 4 °C at 4000xg and the supernatant was used for purification as soluble fraction and the pellet as insoluble fraction. Part of the supernatant was reserved and used as crude extract in bioassays; the remainder was used to purify the recombinant protein. The insoluble fractions were washed 2x with washing buffer (0.5% v/v Triton X-100, 10 mM EDTA and 1 mM PMSF) followed by overnight incubation at 4 °C with shaking at 10 rpm with denaturing extraction buffer (8 M Urea, 1 mM EDTA, 1 mM iodoacetamide, 1 mM PMSF and 1 μg/mL leupeptin) to solubilise inclusion bodies (IB). The supernatant was recovered by ultracentrifugation for 2 h at 40,000 × g at 4 °C and dialysed in 20 mM Tris HCl buffer (pH 8.5) to eliminate urea and refold the protein. Affinity chromatography was used for protein purification of soluble (S) and insoluble (I) fractions.

Ni + 2-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany) was incubated with each fraction overnight at 4 °C. The protein resin mixture was placed on a column and weakly bound proteins were eluted by washing with 100 mL buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole (three times), including 0.1% Triton 114 in the second wash. The resin was washed five times with PBS-urea solution in descending concentrations (3 M, 1.5 M 0.75 M, 0.3 M, 0 M) just for insoluble fractions. Bound proteins were eluted with 1X native purification buffer containing ascending concentrations of imidazole (50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM and 500 mM) in 2 mL fractions. The fractions containing the recombinant protein were pooled and dialysed in Tris-HCl buffer, pH 8.5. The protein was concentrated on an Amicon Ultra-4 centrifugal filter device (Merck, Darmstadt, Germany) and the resulting concentration was quantified by Micro BCA Protein Assay (Thermo scientific, Waltham MA, USA), using the bovine serum albumin (BSA) curve as reference.

SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis was used for analysing expression and purification (Laemmli, 1970), using a commercial molecular weight marker (XL-OptiProtein, New England-Biolabs, Ipswich, MA, USA) as reference. Western blot assays involved using an anti-histidine monoclonal antibody (A7058, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), nitrocellulose membrane (Trans-Blot SD-semi-dry electrophoretic transfer cell) and revealed using a peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, Canada), following the manufacturer's recommendations.

2.5. Enzyme activity assays

A Chitinase Assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) was used for evaluating rChit37 activity; it included three soluble substrates: 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosamine and 4-Nitrophenyl N, N'-diacetyl-β-D-chitobioside to detect exo-chitinase activity and 4-Nitrophenyl β-DN, N', N - triacetylchitotriose to detect endo-chitinase activity; *Trichoderma viride* chitinase was used as positive control. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme capable

of releasing 1 μmol of p-nitrophenol from the appropriate substrate per minute, in test conditions. All quantifications were made in triplicate. Optimum pH and temperature for recombinant chitinase activity were ascertained using 4-Nitrophenyl N, N'-diacetyl-β-D-chitobioside, different buffer solutions (0.1 M acetate buffer (pH 4.0); 0.1 M trisodium citrate buffer (pH 5.0); 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0–7.0) and different incubation conditions (25, 35, 45, 55 and 65 °C). rChit37 purification performance obtained from the soluble fraction was calculated from chitobiosidase activity and the concentration of crude and purified protein. The purification factor was determined as the ratio of specific purified and crude protein activities, and percentage yield was calculated from the ratio of total purified and crude protein activities.

2.6. Conidial vigour and viability

Germination and germ-tube growth percentages were determined to test Bv062 conidial viability. A suspension of conidia (con) in 0.1% Tween 80 was prepared from an 8-day-old solid culture and adjusted to 1 × 10⁸ con/mL concentration as stock suspension which was used for preparing 3 treatments using a mixture of an equal volume of Tween 80 (0.1%), purified chitinase (rChit37) and crude rChit37 extract (CErChit37). The final protein concentrations for rChit37 and CErChit37 were 300 μg/mL. The treatments were incubated for 1 h at room temperature. Conidial viability was determined as germination percentage by adapting the method reported by Santos [28]; 100 μL samples of the 10⁻¹ dilution of each treatment were inoculated on plates with malt extract agar (0.1%) supplemented with chloramphenicol (0.1%) and benomyl (0.00015%). The percentage of germinated conidia was evaluated under a light microscopy after 24 h' incubation at 25 °C. Elongation speed of germ-tubes was assessed to determine conidia vigour. This involved inoculating all treatments into plates containing the same agar, but without benomyl. Around 1 cm² agar samples were taken after 4, 8- and 12-hours incubation, stained with lactophenol blue solution and observed under a Vision DX41 microscope, adapted with a UCOS14000KPA camera. The germ-tubes' net length without spore diameter (Nguyen et al., 2010) was estimated by ImageJ 1.52a image processing program (Schneider et al., 2012).

2.7. *Diatraea saccharalis* bioassays

The methodology described by Garcia was used for the bioassays (García et al., 2018); Table 1 describes the nine treatments evaluated here. Briefly, 2 μL of each treatment was inoculated topically on the back of second instar larvae of *D. saccharalis*. The larvae were individually arranged in a half-ounce container and fed on a natural diet of sweet corn grains. They were placed in 1774.41 mL SelloPlus boxes, in groups of 15 units, in triplicate, and kept at 25 °C. An absolute control involved larvae which did not receive any treatment. Mortality was evaluated daily from the second day onwards, until day 14 post-

Table 1

Treatments used for evaluating the effect of rChit37 regarding *B. bassiana* conidia insecticidal activity against *D. saccharalis* larva.

Treatment	Conidia concentration (con/mL)	Protein concentration (μg/mL)	
1	Bv062 (Bv)	1x10 ⁶	0
2	rChit37*	0	200
3	rChit37*	0	300
4	CErChit37**	0	200
5	CErChit37**	0	300
6	Bv + rChit37*	1x10 ⁶	200
7	Bv + rChit37*	1x10 ⁶	300
8	Bv + CErChit37**	1x10 ⁶	200
9	Bv + CErChit37**	1x10 ⁶	300

*Purified recombinant chitinase recovered from soluble fractions.

**Crude extract (CE) recombinant chitinase recovered from soluble fractions.

infection. The Schneider-Orelli formula was used for calculating efficacy (Zar, 1999).

$$\text{Efficacy (\%)} = \frac{(100 - A)}{(100 - C)} \times 100$$

where

A = Mortality in the treatment

C = Mortality in the control treatment

2.8. Statistical analysis

The Shapiro Wilk test was used for determining data normality and the Barlett test for homoscedasticity (95% confidence level). Once such assumptions had been confirmed, analysis of variance (ANOVA) was used for determining the differences between treatments and means were compared by Tukey test (95%) and the Statistix statistical analysis program (8.0) (Analytical Software, FL, USA). Probit analysis with BioStat software (version 5.8.1) was used to analyse daily mortality and estimate lethal times (LT₅₀ and LT₉₀).

3. Results and discussion

3.1. rChit37 production

The chitinase Chit37 of *Beauveria bassiana* (strain Bv062) was highly similar (99% identity) to previously reported Bbchit1 (Fan et al., 2007b), being 348 aa-long, encoded by an ORF without introns, having a 36.7 kDa theoretical molecular weight (MW) and 5.94 isoelectric point (PI). This protein was predicted to have a signal peptide (PS) located in positions 1–22, with a predicted cleavage site between residues 22 and 23, suggesting that it may be a secreted protein. Functional prediction showed that the protein would have a glycoside hydrolase catalytic domain belonging to chitinase family 18 (GH18), having SxGG and DxxDxDxE motifs characteristic of the active site (Terwisscha van Scheltinga et al., 1994); however, a chitin binding domain (CBD) could not be predicted. The chit37 ORF was molecularly cloned into an *E. coli* BL21 DE3 cell expression vector, not including the previously predicted putative signal peptide sequence. The expression assays tested the effect of inducer concentration (0.2, 0.5 and 1 mM IPTG) and exposure time in standard conditions, the best results occurring with 1 mM IPTG and 4 h induction (Fig. 1A).

Western blot revealed notorious differences regarding recovered soluble and insoluble fractions; thus, most rChit37 was found as IBs (Inclusion bodies) in the insoluble fraction (Fig. 1B), being similar to that previously reported in recombinant chitinases (Boer et al., 2007; Fan et al., 2007b; Rao et al., 2004). Given this evidence, an expression assay was conducted at 30 °C, using 0.2 mM IPTG; these conditions promoted a greater amount of rChit37 in the soluble fraction (Fig. 1B).

Soluble fractions obtained from bacterial cell lysates in recombinant protein production can be used as crude extracts or purified proteins, whilst IB proteins require additional steps to solubilise and promote refolding (Vallejo and Rinas, 2004). Fermentation temperature and inducer concentration were reduced in this study to increase the amount of protein in the soluble fraction. It has been reported that changing growth conditions, such as growth temperature, inducer concentration and induction time, can often help decrease IB formation (Yamaguchi and Miyazaki, 2014), minimising physicochemical conditions favouring conformational stress and aggregation (Ventura and Villaverde, 2006).

rChit37 was purified to homogeneity (SDS-PAGE criteria), in a single step (affinity chromatography), from soluble (cytoplasmic) and insoluble fractions (rChit37 IBs denatured and later renatured by dialysis) (Fig. 2).

3.2. Enzyme activity

Purified rChit37 from the soluble and insoluble fractions showed endo- and exo-mode of chitin hydrolysis by using different substrates. The rChit37 presented 170 mU/mL and 220 mU/mL exo-chitinase activity (chitobiosidase) for soluble and insoluble fractions, respectively. β-N-acetylglucosaminidase activity was not detected in neither fraction. This contrasted with that shown by Fan et al., (Fan et al., 2007b) who failed to obtain functionally active Bbchit1 for endo-mode chitin hydrolysis from a bacterial cytoplasmic fraction, suggesting incorrect folding or modification of the protein in the *E. coli* cytoplasmic space.

Total chitobiosidase activities were 1.584 U for crude extract and 0.85 U for purified protein, i.e. 17.86 purification (fold) and 53.6% recovery yield. Purified rChit37 yield was 2.53 mg/L, which was similar to that reported for Chit42 and ChiA (Boer et al., 2007; Rao et al., 2004), but lower than the yield obtained for Chit33 and Bbchit1 (Boer et al., 2007; Fan et al., 2007b). Related with the endo-chitinase activity, the soluble fraction presented 90 mU/mL, being lower than reported by Fan et al., (Fan et al., 2007b) for the protein purified from IBs.

rChit37 from IB and purified in denaturing conditions was an inactive protein. Simple dialysis was thus carried out for increasing the amount of active protein, after solubilisation and prior to purification in soluble conditions. This was enough to convert rChit37 from IB inactive state to a functionally active polypeptide having chitobiosidase activity (0.22 U/mL), as also achieved for *Trichoderma harzianum* Chit33 and Chit42 chitinases (Boer et al., 2007) and *B. bassiana* Bbchit1 (Fan et al., 2007b). The successful recovery of functional protein from IB could have been due to insoluble protein aggregate formation which might have been a reservoir for alternative conformational states of the protein conserving correctly-folded functional domains (Ventura and Villaverde, 2006). Purified proteins from IB could thus have had enzymatic activity similar or higher than that from soluble fractions, highlighting no relationship between solubility and correct folding (García-fruítos et al., 2005).

Dual activity has also been reported for other chitinases related to biological control agents, such as ChiA from *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) (Rao et al., 2004; Thomas et al., 2000), VChiA from *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) (Daimon et al., 2006; Salvador and Ferrelli, 2014), Bbchit1 from *B. bassiana* and CHI60 from *Serratia* sp. (Fan et al., 2007b; Kuttiyawong et al., 2008), and could be advantageous regarding the processing of different types of substrate, depending on their molecular organisation. Some researchers have proposed that this group of proteins use their endochitinase function involving non-processive action on substrates having tightly bound chains, such as colloidal chitin, due to the limitation of enzyme movement (Kuttiyawong et al., 2008). Similarly, the α chitin prevalent in insect cuticle has tightly packed microfibrils (Merzendorfer, 2003); initial rChit37 action on insect cuticle could thus be of non-processive endochitinase type and processive exochitinase activity (Kuttiyawong et al., 2008) could therefore act on substrates having less rigidity amongst their microfibrils, possibly triggered by endochitinase action.

Analysing Bv062 conidia chitinases produced in semisolid-state fermentation revealed B-N-acetylglucosaminidase activity, whilst endochitinase activity was very low (own data, unpublished), indicating that such enzymatic activities could not be induced in the fermentation conditions evaluated here. The foregoing suggests that rChit37 could improve endo- and exo-chitinase activity that is not easily inducible in fermentation conditions and whose dual activity has been shown to influence other biological control agents' virulence (Fang et al., 2005; Rao et al., 2004).

3.3. The effect of temperature and pH on rChit37 enzymatic activity

rChit37 enzymatic activity becomes reduced as pH increases, having maximum activity at pH 5.0 (Fig. 3A). Such results agreed with

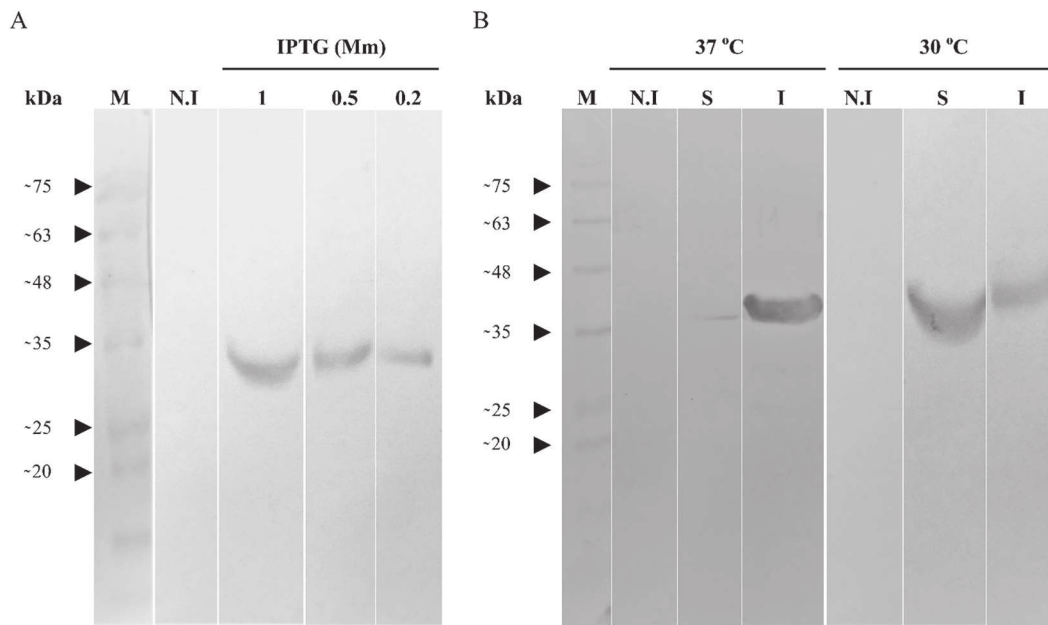


Fig. 1. Western blot using anti-histidine monoclonal antibody for standardising optimal *rChit37* expression conditions [A]. IPTG concentration effect on 4 h post-induction expression level. [B] The effect of temperature on protein expression and solubility. Molecular weight protein standards (M), not induced (N.I.) soluble or cytoplasmic fraction (S), insoluble fraction (I).

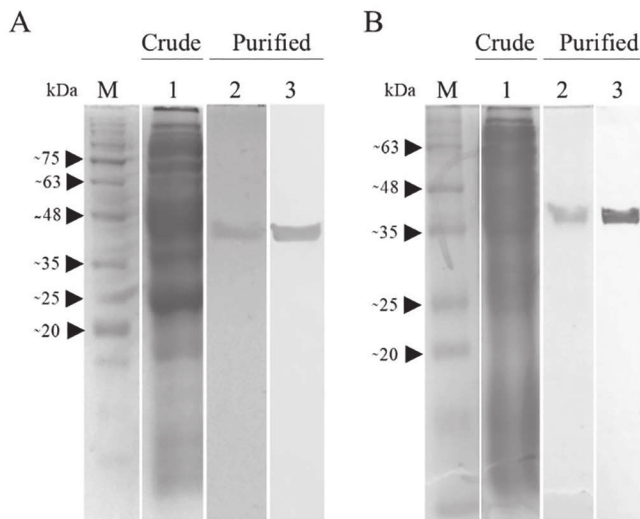


Fig. 2. *rChit37* purification from [A] soluble (cytoplasmic) and [B] insoluble fractions (IBs). Lane 1: Crude extract stained with Coomassie blue; Lane 2: purified protein verification by Coomassie blue staining; Lane 3: Western blot using anti-histidine monoclonal antibody.

optimum pH ranges (4.0–7.0) described for fungal chitinases, particularly having values described for GH18 entomopathogenic fungi, having 5.0 to 6.0 optimum pH (Bidochka et al., 1993; Fan et al., 2007b; Han et al., 2016; Ike et al., 2006; St. Leger et al., 1991; Takaya et al., 1998; Yang et al., 2014). However, they differed from the optimum pH range (5.0–9.0) reported for bacterial and viral chitinases having insecticidal activity (Busby et al., 2012; Daimon et al., 2007, 2006; Danişmazoğlu et al., 2015; Liu et al., 2010; Ni et al., 2015).

Fig. 3B shows that *rChit37* chitinase activity gradually increased with a rise in temperature, reaching maximum activity at 45 °C and starting to become reduced from 55 °C. However, it is worth noting that the enzyme remained functionally active over a wide range of temperatures, since it had higher than 187 mU/mL chitobiosidase activity in all conditions evaluated here. Recombinant enzyme optimum

temperature was higher than that for chitinases from entomopathogenic bacteria (33–37 °C) (Danişmazoğlu et al., 2015; Ni et al., 2015). *rChit37* optimum temperature did not differ considerably from that reported for most chitinolytic enzymes from other entomopathogenic fungi, being equal to that determined for *Metarhizium anisopliae* chitinases (St. Leger et al., 1991) and similar to the temperature for its homologue Bbchit1 (55 °C) (Fan et al., 2007b), but higher than that for *B. bassiana* NAGase2 (37 °C) (Bidochka et al., 1993). It is also worth noting that *rChit37* had activity at 65 °C, the temperature at which native and recombinant Bbchit1 produced in *P. pastoris* and *E. coli* is inactive (Fan et al., 2007b).

3.4. The effect of *rChit37* on *B. bassiana* Bv062 conidial viability and vigour

Whether conidia were treated or not with enzyme they had a development pattern consistent with the transition of spores to hyphae described for *B. bassiana* (Liu et al., 2015). A large amount of germinated conidia were observed after 12 h' incubation and germ-tube elongation became evident after 16 h, hyphae branching was observed 20 to 24 h later (Fig. 4).

Conidial germination was similar for the three treatments at all evaluated times (55 to 63% values after 16 h, 87 to 93% after 20 h and 93 to 100% after 24 h) (Fig. 5A). The germination percentage reached in this study for all treatments after 24 h' incubation was the minimum (85%) recommended as suitable for ensuring the quality of *B. bassiana*-based commercial formulations (Marín et al., 2000). Linear regression was used for analysing germination vs time percentages and correlation coefficients (R^2) higher than 0.91 suggested a suitable fit with a zero-order kinetics model. The equation was used for estimating the slope of the line for conidial germination speed regarding each treatment; values which were not statistically different ($F_{2,6} = 0.80$; $p = 0.4903$), indicated that the enzymes being evaluated did not affect germination rate. Germination speed is a critical parameter determining the efficacy of entomopathogenic fungal conidia from regarding their insecticidal activity, as reported by Faria et al., (Faria et al., 2015) for *B. bassiana*. They demonstrated that conidia could germinate after 16 h incubation (considered vigorous) were more virulent, causing greater *Spodoptera frugiperda* larvae mortality than those having a maximum germination

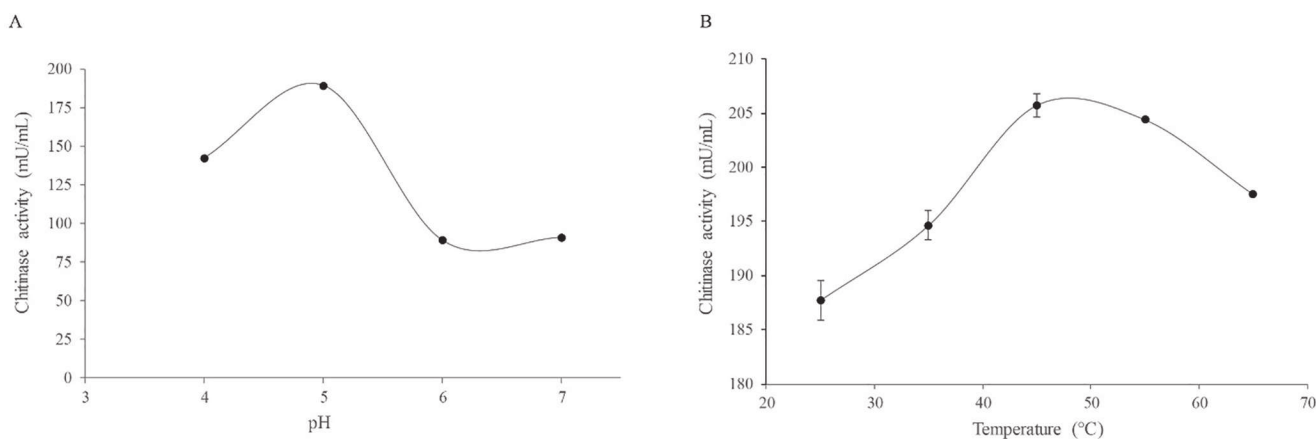


Fig. 3. The effect of pH and temperature on rChit37 chitinase activity. Purified rChit37 endochitinase activity in soluble conditions at different pH [A] and temperatures [B]. The values represent the average of three repeats and the error bars the standard deviation.

rate after 48 h. The conidia in the three treatments in the present study were equally vigorous in the absence and presence of rChit37 and CErChit37, more than 90% of them germinating before 24 h' incubation.

Fig. 5B shows conidial germ-tube development in the absence and presence of rChit37 and CErChit37 between 12- and 24-hours incubation. The data were logarithmically transformed, and lineal regression was used for calculating germ-tube elongation speed, obtaining a suitable fit with the mathematical model ($R^2 > 0.99$ for all treatments) for first order kinetics. The slopes of the lines obtained (Fig. 5B) were assumed as an expression of elongation speed and compared by ANOVA which did not detect significant differences between treatments ($F_{2,6} = 0.26$, $p = 0.7791$), suggesting that the enzymes did not affect conidial germinal tube development.

Germination and germ-tube development of *B. bassiana* conidia occur normally in the first 36 h after binding to insect cuticle (Lai et al., 2017). This time is longer than that required to germinate when conidia are inoculated on agar (*in vitro*), possibly because the fungus requires more time in *in vivo* conditions to become adapted to insect's epicuticle environment and also because certain types of hydrocarbons and lipids can inhibit the germination (Pedrini et al., 2013).

The foregoing results led to conclude that crude and purified recombinant chitinase did not affect Bv062 conidial viability or the normal development of germ-tube emergence and elongation (i.e. positively or negatively). Although *B. bassiana* chitinases are involved in cell remodelling and growth (Seidl, 2008), rChit37 may be playing a more important role in fungal virulence as was demonstrated for some entomopathogenic and mycoparasite fungi when their chitinase genes were mutated, negatively altering the virulence but without effects on fungal morphology and growth, regarding spore, appressoria and hyphae formation (Boldo et al., 2009; Mamarabadi et al., 2008).

rChit37's did not affect *in vitro* germination of conidia in the present study but this enzyme could indirectly stimulate germination during host interaction since its chitin's catalytic action on the cuticle could release assimilable compounds as carbon source (Hamid et al., 2013). This effect has been observed for CDEP-1, a (recombinant) cuticle-degrading protease which, when used as *B. bassiana* additive in a culture with exuviae as sole carbon source, accelerated germination; this was correlated later on with the fungi's increased insecticidal activity against aphids (Zhang et al., 2008).

3.5. The effect of rChit37 on *B. bassiana* Bv062 effectiveness

Efficacy results, evaluated 14 days after inoculating the treatments, led to clearly establish three significantly different groups ($F_{8,18} = 22.4$, $p = 0.0$) (Fig. 6). Topical inoculations of crude (obtained from a *E. coli*

soluble fraction) and purified rChit37 did not induce an important insecticidal effect on *D. saccharalis* larvae (less than 10% efficacy) when the enzymes were used in the absence of the fungi. Previous papers present contrasting results regarding the effect of using purified and crude enzyme extracts in the absence of propagules of entomopathogenic fungi. For example, a topical application of partially-purified N-acetylglucosaminidase (NAGase) from *T. konigiopsis* on *D. saccharalis* larvae (Mejia, 2018), CDEP-1 and CDEP:BmChBD recombinant proteases (a hybrid protease having a chitin binding domain) evaluated on *Mysus persicae* adults and nymphaea (Fan et al., 2010; Zhang et al., 2008), did not lead to insect mortality. By contrast, oral administration of partially-purified bacterial and fungal chitinases could cause delays during insects' different development stages, thereby affecting digestive process due to alterations in peritrophic membrane formation and even induce death (Berini et al., 2016; Okongo et al., 2018; Regev et al., 1996). The foregoing indicates that hydrolytic enzymes' effect on insect mortality could vary, depending on the source, administration route, structure or target species. This could be explained regarding fungal chitinases due to broad diversity and specialisation of functions, according to their role played in living systems (Seidl, 2008; Seidl et al., 2005).

Treatments involving just conidia, or when combined with crude and purified rChit37, had an insecticidal effect in all cases (higher than 50% efficacy values). The mortality of larvae inoculated with the mixture of Bv062 conidia and purified enzyme at 200 µg/mL concentration and crude extract at 200 and 300 µg/mL was similar to that obtained with an individual application of conidia at all times evaluated here (Fig. 6), having 50 to 60% efficacy values (which were not statistically different). However, the insecticidal activity of conidia applied with 300 µg/mL purified rChit37 was significantly greater ($F_{8,18} = 5.49$, $p = 0.0013$) from the fourth day of the assay onwards (Fig. 6). This demonstrated a progressive, synergic effect, resulting in 96.7% efficacy after 14 days (Fig. 6), with 61% increase, compared to the fungal application without enzyme.

This effect could have been attributed to rChit37-mediated, faster and facilitated penetration of insect procuticle. The procuticle is the only insect cuticle layer containing chitin, consisting of a protein matrix with chitin fibres embedded within it (Andersen, 2009); it is located under the epicuticle, a complex lipid-rich structure covering an insect's entire external surface (Prakash, 2008). Integument digestion follows a lipase-protease-chitinase sequence due to the cuticle structure that has three sections: the outermost layer called the envelope (lipids), the epicuticle (proteins) and the procuticle (chitin and proteins) (Tanada and Kaya, 1993). In this context, rChit37 added to the conidia suspension could have penetrated the epicuticle together with the appressoria and the germ tube and developed its catalytic activity upon

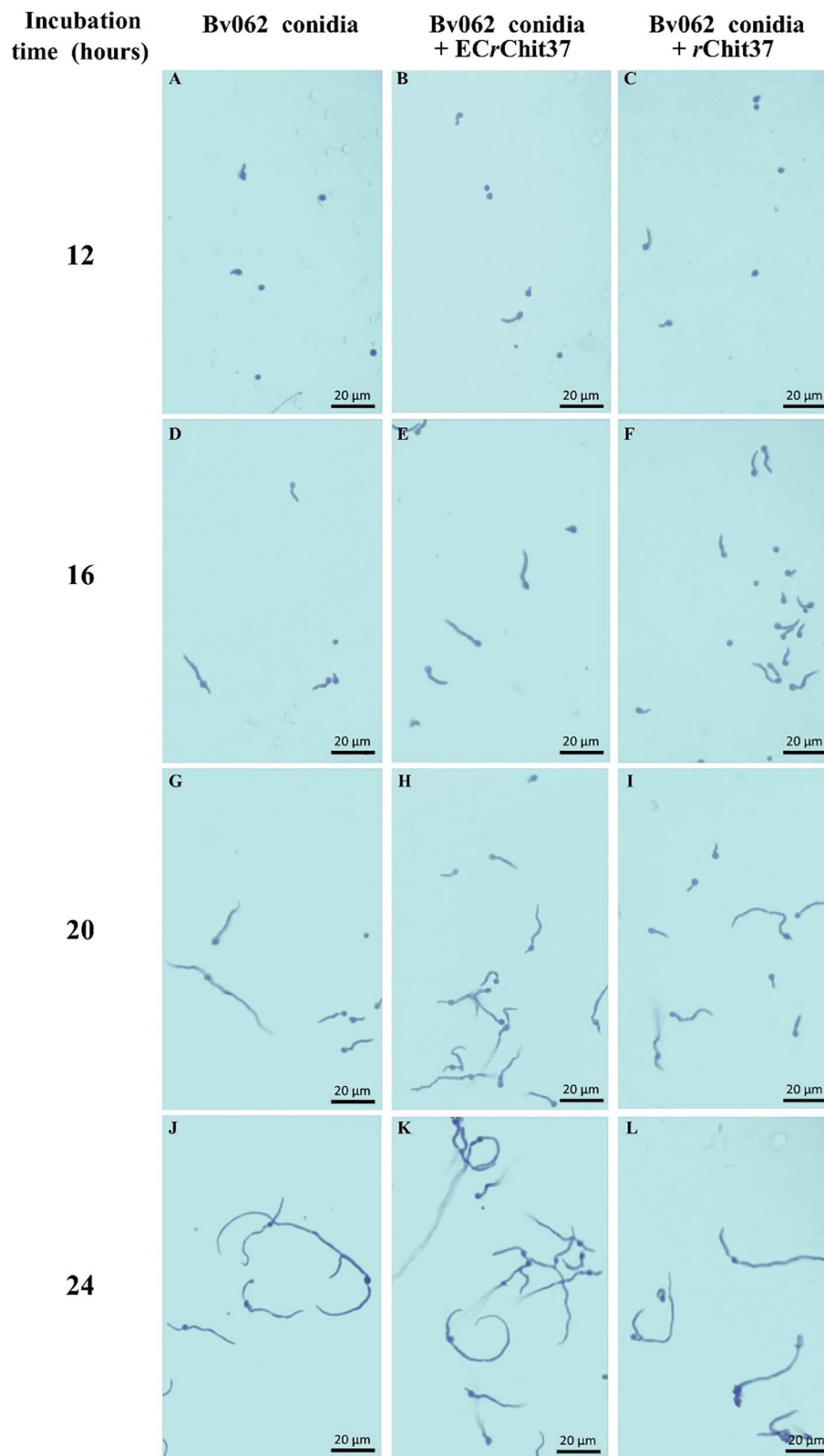


Fig. 4. Development of germinal tube of Bv062 conidia alone and when mixed with *rChit37*. All images were recorded at 40X magnitude.

reaching the chitin fibres in the procuticle, synergistically with the enzymes naturally expressed and excreted by the fungus. An alternative hypothesis is that the *rChit37* added to the conidia suspension produced stress in the germinated conidia and the appressoria, due to an effect on structural chitin resulting in a higher hydrolytic enzyme expression and

production where the fungus reached the insect procuticle, thereby facilitating penetration.

The synergic effect of other hydrolytic enzymes used as *B. bassiana* conidia additive has already been reported (Mejia, 2018; Zhang et al., 2008). For example, using 100 µg/mL CDEP-1 improved the mortality

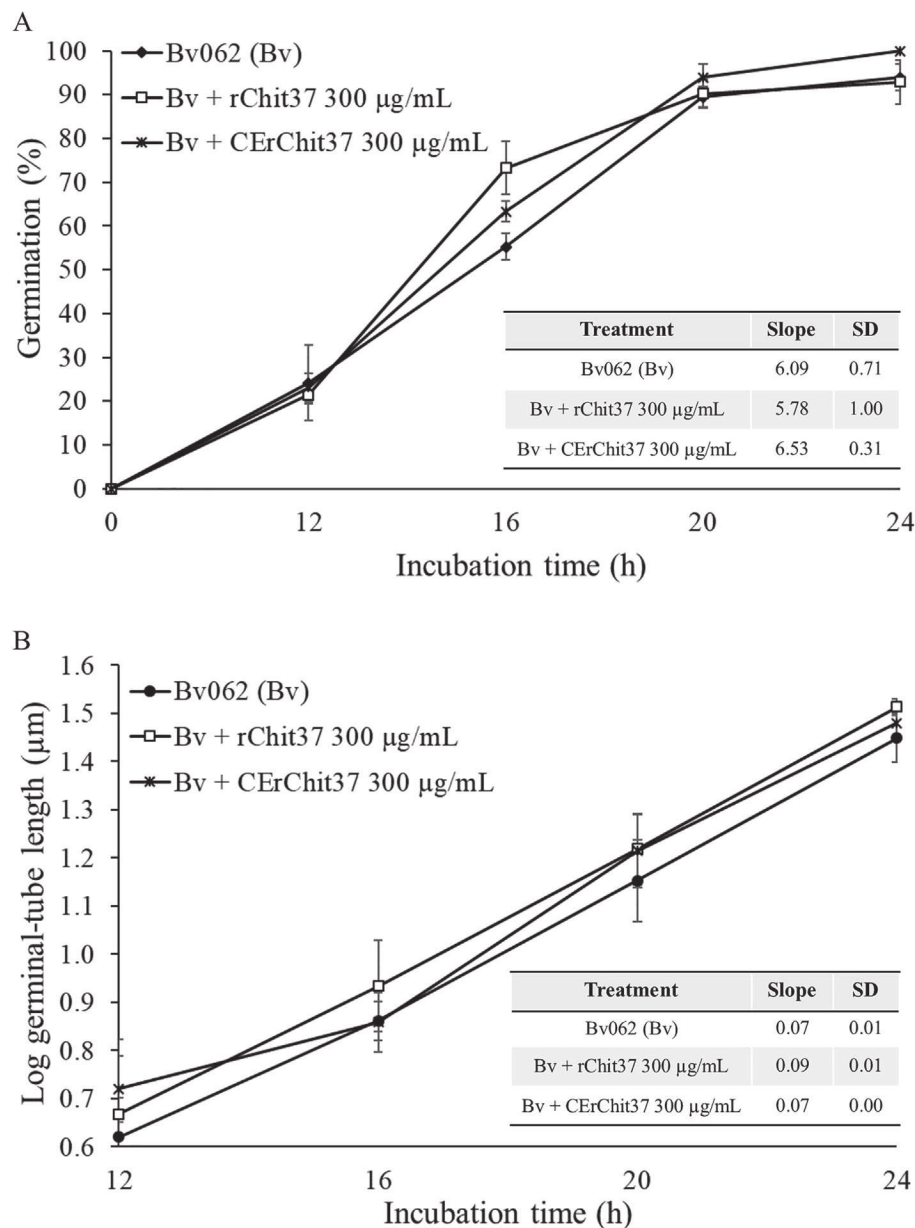


Fig. 5. The effect of *rChit37* on Bv062 conidial viability. A. The effect of *rChit37* on conidial germination. B. The effect of *rChit37* on germinal tube elongation.

caused by the fungi on *Mysus persicae* aphids when being used as additive at 20% at 1×10^6 and 25% at 5×10^7 con/mL (Zhang et al., 2008), this being a lower enhancer effect than that found in the present study with *rChit37*. Such difference could have been due to chitinase activity having a greater effect on insect mortality than protease action, as demonstrated experimentally in enzyme inhibition assays with *B. bassiana* extracts (Kim et al., 2010). It is worth mentioning that García et al., (García et al., 2018) evaluated the same isolation regarding second instar *D. saccharalis* larvae, achieving 73.3% efficacy when using a concentration 10 times greater than that evaluated regarding the mixture with *rChit37* in the present study (i.e. 96.6% efficacy). These results suggested interesting potential for using the recombinant chitinase developed in this work (300 µg/mL) as additive when developing and using entomopathogenic fungi for pest control.

3.6. The effect of *rChit37* on *B. bassiana* Bv062 lethal times

In general, the lethal times varied between 5.4 and 12.6 days (LT_{50}) and 11.8 to 47.2 days (LT_{90}) (Table 2). Fungal conidia combined with

300 µg *rChit37* presented significantly inferior values to those obtained with the other treatments (without overlapping confidence limits).

The lethal times obtained by combining *B. bassiana* conidia with *rChit37* (300 µg/mL) were lower than those determined previously using conidial suspensions from different entomopathogenic fungal species on *D. saccharalis* larvae. For example, LT_{50} was 6.0 days and LT_{90} 12.2 days in a study using the same Bv062 strain at 100-fold higher concentration than that evaluated in this work (García et al., 2018). LT_{50} was 15.14 days for *B. bassiana* Bb-HN1 strain first instar larvae when used at 2×10^8 con/mL concentration (Zúñiga-oviedo et al., 2016) and 7.31 to 12.41 days at 1×10^8 con/mL concentrations evaluated on third instar larvae (Diaz and Lecuona, 1995; Leucona and Alves, 1988). Some studies have reported lower LT_{50} than those determined in this research, i.e. 2.09 to 5.02 days for *B. bassiana* and *M. anisopliae* strains, but using concentrations up to 100-fold higher than those used in this study (Acevedo et al., 2007; Arcas et al., 1999; Diaz and Lecuona, 1995; Svedese et al., 2013).

A 46% reduction in LT_{50} and 68% in LT_{90} was obtained when the Bv062 conidia suspension (1×10^6 con/mL) was supplemented with

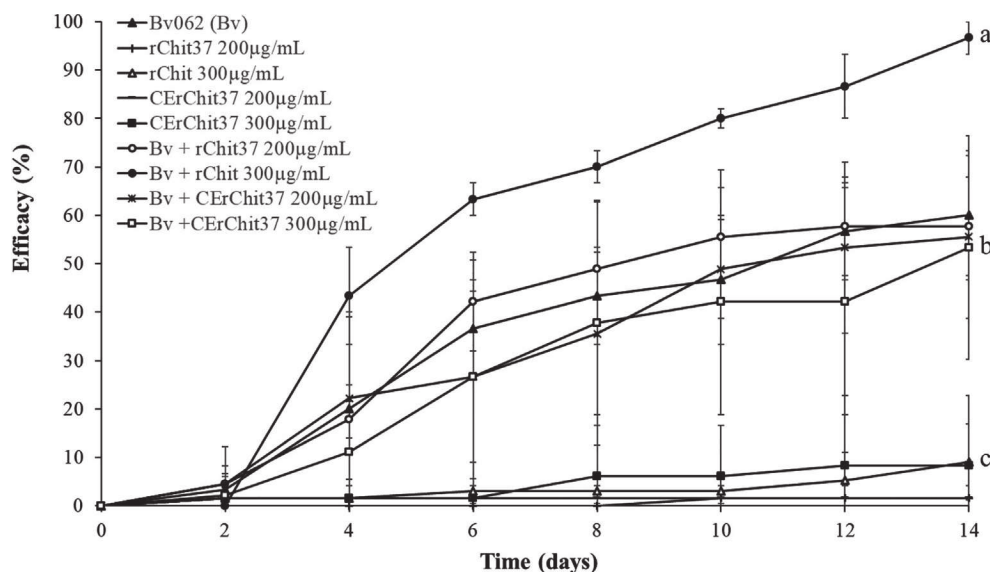


Fig. 6. Effect of *rChit37* on Bv062 insecticidal activity against *D. saccharalis* larvae. Cumulative efficacy. The data represent the average of three repeats, the bars indicate the standard deviation calculated on the repeats. Different letters indicate significant differences between treatments when using Tukey's range (honestly significant difference – HSD) test (95%).

Table 2

LT₅₀ and LT₉₀ for *B. bassiana* Bv062 conidia (1×10^6 con/mL) used by themselves and when mixed with crude and purified *rChit37* on second instar *D. saccharalis* larvae.

Treatment	LT ₅₀	Confidence limits (95%)		LT ₉₀	Confidence limits (95%)		X ²	df	n	Slope
		Lower	Upper		Lower	Upper				
Bv062 (Bv)	10.0	9.0	11.4	37.3	28.4	55.5	4	5	45	2.245 ± 0.225
Bv + <i>rChit37</i> 200 µg/mL	9.3	7.8	11.6	34.5	23.0	75.3	9	5	45	2.245 ± 0.220
Bv + <i>rChit37</i> 300 µg/mL	5.4	4.2	6.4	11.8	9.6	16.4	18	5	45	3.731 ± 0.257
Bv + CErChit37 200 µg/mL	11.4	10.0	13.3	47.2	34.0	77.6	2	5	45	2.073 ± 0.223
Bv + CErChit37 300 µg/mL	12.6	11.2	14.8	45.8	33.4	73.5	5	5	45	2.290 ± 0.247

300 µg/mL recombinant chitinase, compared to using just fungal conidia. This result suggested that *rChit37* improved Bv062 conidia virulence against second instar larvae of *D. saccharalis*, reducing doses and lethal times. Such reduction could have been attributed to *rChit37* chitobiosidase and endochitinase activity considering that it has been demonstrated that the chitinolytic activity of entomopathogenic fungi such as *B. bassiana* and *M. anisopliae* is directly related to their virulence (Boldo et al., 2009; Fan et al., 2007a; Fang et al., 2005).

The recombinant chitinases studied in this work could provide a promising alternative for potentiating bio-controller microorganisms and developing new-generation biopesticides in the light of the above and that using genetically-modified microorganisms as biological control agents is restricted in Colombia (ICA, 2011b) and other countries worldwide.

4. Conclusions

rChit37 chitinase was expressed in *E. coli* into soluble and insoluble fractions, being functionally active in both forms. *rChit37* presented the endochitinase activity previously reported for the similar enzyme Bbchit. In addition, exochitinase activity that has not been previously reported for this enzyme, was also found in *rChit37*. The purified, soluble, recombinant protein did not have any inhibitory or stimulating effects on conidial viability in terms of germination and germ-tube elongation when used as additive. However, *rChit37* improved *B. bassiana* Bv062 insecticidal activity on *D. saccharalis* larvae in laboratory conditions, increasing efficacy by 61% and reducing LT₅₀ by 46%. The results of this work constitute an initial proof-of-concept for the development of a biopesticide based on *B. bassiana* enhanced with a recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity to control *D. saccharalis*.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Colombian Ministry of Agriculture and Rural Development (MADR). This work was carried out under the RGE0229-2 contract for access to genetic resources and their derived products in Colombia.

We are grateful to the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) and the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) for providing physical and human resources. The authors thank Luis Alfredo Baquero, Gustavo Araque, Cindy Mejía and Andrea Estefanía Ramos for the technical support in laboratory assays and Jason Garry for English corrections. The current project was funded through the Colombian Royalties System by the Gobernación de Nariño, grant 1865.

References

- Acevedo, J.P.M., Samuels, R.I., Machado, I.R., Dolinski, C., 2007. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* 96, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.003>.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Lipman, D., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Andersen, S.O., 2009. Cuticle. In: Vincent, H.R., Ring, T.C., (Eds.), *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, pp. 245–246. doi: 10.1016/B978-0-12-374144-8.00073-4.
- Arcas, J., Diaz, B., Lecuona, R., 1999. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *J. Biotechnol.* 67, 151–158.
- Arora, R., Shera, P.S., 2014. Genetic Improvement of Biocontrol Agents for Sustainable Pest Management. doi: 10.1007/978-81-322-1877-7.
- Berini, F., Caccia, S., Franzetti, E., Congiu, T., Marinelli, F., Tettamanti, G., 2016. Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. *Pest Manage. Sci.* 72, 980–989. <https://doi.org/10.1002/ps.4078>.
- Bidochka, M.J., Tong, K.I., Khachatourians, G.G., 1993. Partial purification and

- characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* 39, 40–45. <https://doi.org/10.1139/m93-006>.
- Boer, H., Simolin, H., Cottaz, S., Söderlund, H., Koivula, A., 2007. Heterologous expression and site-directed mutagenesis studies of two *Trichoderma harzianum* chitinases, Chit33 and Chit42, in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 51, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.07.020>.
- Boldo, J.T., Junges, A., do Amaral, K.B., Staats, C.C., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2009. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr. Genet.* 55, 551–560. doi: 10.1007/s00294-009-0267-5.
- Busby, J.N., Landsberg, M.J., Simpson, R.M., Jones, S.A., Hankamer, B., Hurst, M.R.H., Lott, J.S., 2012. Structural analysis of Ch11 chitinase from Yen-Tc: the multisubunit insecticidal ABC toxin complex of *Yersinia entomophaga*. *J. Mol. Biol.* 415, 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.018>.
- Butt, T.M., Coates, C.J., Dubovskiy, I.M., Ratcliffe, N.A., 2016. Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. *Adv. Genet.* 94, 307–364. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>.
- Ce, D., Parlamento, D.E.L., Del, E.Y., 2009. DIRECTIVA 2009/41/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO DE 6 de mayo de 2009 relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente. Diario oficial de la Unión europea, Unión europea.
- Cuartas, P., Barrera, G., Gómez, J., Barreto, E., Villamizar, L., n.d. Synergistic effect of nucleopolyhedrovirus and granulovirus mixtures for controlling Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest Manage. Sci.*
- Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W.K., Shimada, T., 2006. Comparative studies of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus chitinase and its host ortholog. *BmChi-h. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 825–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.112>.
- Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W.K., Shimada, T., 2007. Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Arch. Virol.* 152, 1655–1664. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1000-7>.
- Danısmazoğlu, M., Demir, İ., Sezen, K., Muratoğlu, H., Nalçacıoğlu, R., 2015. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (chiA, chiB, chiC) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turkish J. Biol.* 39, 78–87. <https://doi.org/10.3906/biy-1404-31>.
- De Castro, E., Sigrist, C., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucl. Acids Res.* 1, 362–365.
- Díaz, B., Lecuona, R., 1995. Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromycotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). *Agriscientia XII*, 33–38.
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., Bidochka, M.J., Pei, Y., 2007a. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 295–302. <https://doi.org/10.1128/AEM.01974-06>.
- Fan, Y., Zhang, Y., Yang, X., Pei, X., Guo, S., Pei, Y., 2007b. Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 56, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.06.012>.
- Fan, Y., Pei, X., Guo, S., Zhang, Y., Luo, Z., Liao, X., Pei, Y., 2010. Increased virulence using engineered protease-chitin binding domain hybrid expressed in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microb. Pathog.* 49, 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.06.013>.
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K.M., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y., Pei, Y., 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 363–370. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.363>.
- Faria, M., Lopes, R.B., Souza, D.A., Wraight, S.P., 2015. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 125, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>.
- Federici, B.A., 1999. A perspective on pathogens as biological control agents for insect pests. In: Bellows, T., Fisher, T. (Eds.), *Handbook of Biological Control Principles and Applications of Biological Control*. Academic Press, San Diego, pp. 517–548. doi: 10.1016/B978-012257305-7/50065-5.
- García, J., Sotelo, P., Monroy, D., Barrera, G., Gómez-Valderrama, J., Espinel, C., Barreto, E., Villamizar, L.F., 2018. Identification and characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate having a high potential for the control of the *Diatraea* sp. sugarcane stem borer. *BiotechnolAppl* 35, 1201–1207.
- García-fruítos, E., González-montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R.M., Arís, A., Ventura, S., Villaverde, A., 2005. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb. Cell Fact.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-27>.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M. (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, pp. 571–607.
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abidin, M.Z., Musarrat, J., Javed, S., 2013. Chitinases: an update. *J. Pharm. BioAllied Sci.* 5, 21–29. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>.
- Han, B., Zhou, K., Li, Z., Sun, B., Ni, Q., Meng, X., Pan, G., Li, C., Long, M., Li, T., Zhou, C., Li, W., Zhou, Z., 2016. Characterization of the first fungal glycosyl hydrolase family 19 chitinase (NbchiA) from *Nosema bombycis* (Nb). *J. Eukaryot. Microbiol.* 63, 37–45. <https://doi.org/10.1111/jeu.12246>.
- Haseeb, M., Srivastava, R., 2014. Potencial of entomopathogenic fungi in bio-management insect pest. In: Sharma, N. (Ed.), *Biological controls for preventing food deterioration: strategies for pre- and postharvest management*. John Wiley y Sons Ltd, pp. 163–182.
- ICA, 2011a. Silenciosa batalla contra el barrenador de la caña *Diatraea saccharalis* [WWW Document]. URL <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2011/Silenciosa-batalla-contra-el-barrenador-de-la-cana.aspx> (accessed 9.14.16).
- ICA, 2011b. Resolución 00698 de 2011. ICA, Colombia.
- Ike, M., Nagamatsu, K., Shioya, A., Nogawa, M., Ogasawara, W., Okada, H., Morikawa, Y., 2006. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 294–303. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0171-y>.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, Amaia Scheremetjev, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., Hunter, S., 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btu031.
- Kall, L., Krogh, A., EL, S., 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucl. Acids Res.* Jul, W429–32.
- Kim, J., Roh, J., Choi, J., Wang, Y., Shim, H., Je, Y., 2010. Correlation of the aphical activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biol.* 114, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.011>.
- Krogh, A., Larsson, E., Heijne, G. Von, Sonnhammer, E.L.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.
- Kuttiyawong, K., Nakapong, S., Pichyangkura, R., 2008. The dual exo/endo-type mode and the effect of insect strength on the mode of catalysis of chitinase 60 (CHI60) from *Serratia* sp. TU09 and its mutants. *Carbohydr. Res.* 343, 2754–2762. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.05.020>.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol. Control* 21, 230–248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>.
- Laemmli, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai, Y., Chen, H., Wei, G., Wang, G., Li, F., Wang, S., 2017. In vivo gene expression profiling of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* elucidates its infection stratagems in *Anopheles* mosquito. *Sci. China Life Sci.* 60, 839–851. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9101-3>.
- Lastra, B., Gómez, L.A., 2006. La cría de *Diatraea saccharalis* (F.) para la producción masiva de sus enemigos naturales. *Ser. Técnica* 36, 30.
- Liu, D., Cai, J., Xie, C., Liu, C., Chen, Y., Hua, Y., 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.007>.
- Liu, Hongxia, Zhao, X., Guo, M., Liu, Hui, Zheng, Z., 2015. Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia. *BioMedCentral Microbiol.* 15, 267. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0592-4>.
- Maina, U.M., Galadima, I.B., Gambo, F.M., Zakaria, D., 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6, 27–32.
- Mamarabadi, M., Jensen, B., Lübeck, M., 2008. Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. *Curr. Genet.* 54, 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00294-008-0199-5>.
- Marín, P., Posada, F., Gonzalez, M.teresa, Bustillo, A.E., 2000. Calidad biológica de formulaciones de *Beauveria bassiana* usadas en el control de la broca del café. *Rev. Colomb. Entomol.* 26, 17–23.
- Mejía, C., 2018. Potenciación de conidios de *Beauveria bassiana* como principio activo de un bioplaguicida para el control de larvas de *Diatraea* spp. Universidad Nacional de Colombia.
- Merzendorfer, H., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>.
- Nguyen, L., Bodiroga, D., Kelemen, R., Joo, J., Gwinn, K.D., 2010. Modeling the effects of cyrene on the distribution of germination and growth of *Beauveria bassiana*.
- Ni, H., Zeng, S., Qin, X., Sun, X., Zhang, S., Zhao, X., Yu, Z., Li, L., 2015. Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to improve chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematocidal activities. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 304–315. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10632>.
- Okongo, R.N., Puri, A.K., Wang, Z., Singh, S., Permaul, K., 2018. Comparative biocontrol ability of chitinases from bacteria and recombinant chitinases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biosci. Bioeng.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.11.007>.
- Ortiz, A., Keyhani, N.O., 2016. Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects. *Adv. Genet.* 94, 165–249. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>.
- Pedriani, N., Ortiz-urquiza, A., Huarte-bonnet, C., Zhang, S., Dispirito, A.A., State, O., 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, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00024>.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.
- Pierleoni, A., Martelli, P.L., Fariselli, P., Casadio, R., 2007. BaCellLo: a Balanced subCellular Localization predictor. *Protoc. Exch.*
- Prakash, M., 2008. Insect biochemistry, in: *Encyclopedia of Entomology Vol 1*. Discovery publishing house PVT. Ltd., New Delhi, pp. 36–37.
- Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., De Eguleir, M., Congiu, T., Burlini, N., Ariello, S., Corrado, G., Pennacchio, F., 2004. AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1205–1213. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.08.002>.
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Konczkalman, Z., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., Planck, M., 1996. Synergistic activity

- of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3581–3586.
- Restrictions on Genetically Modified Organisms, 2014.
- Salvador, R., Ferrelli, M.L., 2014. Analysis of a chitinase from EpapGV, a fast killing betabaculovirus. *Virus Genes* 48, 406–409. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-1019-7>.
- Salvador, R., 2010. Caracterización biológica y molecular de genes involucrados en la virulencia de baculovirus de importancia agronómica. Universidad Nacional de la Plata.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9 (7), 671–675.
- Seidl, V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol. Rev.* 22, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>.
- Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B., Kubicek, C.P., 2005. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J.* 272, 5923–5939. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04994.x>.
- Shternshis, M., Ovchinnikova, L., Duzhak, A., Tomilova, O., 2002. The efficiency of viral and bacterial entomopathogens formulated with chitinase for biocontrol of lepidopteran cabbage pests. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 35, 161–169. <https://doi.org/10.1080/03235400214209>.
- Shternshis, M.V., 2004. Ecologically safe control of insect pest: The past, the present and the future, in: Lartey, R.T., Caesar, A. (Eds.), *Emerging Concepts in Plant Health Management*. Research Signpost, Kerala, India. doi: 10.13140/2.1.3354.4648.
- St Leger, R.J., Screen, S., 2001. Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds. In: Butt, T. M., Jackson, C., Magan, N. (Ed.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, New York, pp. 219–238. doi: 10.1079/9780851993560.0219.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1991. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 58, 415–426. doi: 10.1016/0022-2011(91)90188-V.
- Svedese, V.M., de Lima, E.Á. de L.A., Porto, A.L.F., 2013. Horizontal transmission and effect of the temperature in pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 56, 413–419. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300009>.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M., 1998. *Oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Mycrobiology* 144, 2647–2654.
- Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Kalk, K.H., Beintema, J.J., Dijkstra, B.W., 1994. Crystal structures of hevimine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* 2, 1181–1189. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00120-0).
- Thomas, C.J., Gooday, G.W., King, L.A., Possee, R.D., 2000. Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *chiA* gene. *J. Gen. Virol.* 81, 1403–1411. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-5-1403>.
- Valero, C.A., Wieggers, H., Zwaan, B.J., Koenraad, C.J.M., van Kan, J.A.L., 2016. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 133, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>.
- Vallejo, L.F., Rinas, U., 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>.
- Ventura, S., Villaverde, A., 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *TRENDS Biotechnol.* 24. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.007>.
- Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., Wang, Z.-L., Zhang, S., Xie, X.-Q., Shang, Y., St Leger, R.J., Zhao, G.-P., Wang, C., Feng, M.-G., 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci. Rep.* 2, 483. <https://doi.org/10.1038/srep00483>.
- Yamaguchi, H., Miyazaki, M., 2014. Refolding Techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies 235–251. <https://doi.org/10.3390/biom4010235>.
- Yang, S., Song, S., Yan, Q., Fu, X., Jiang, Z., Yang, X., 2014. Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3 β -N-acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehei*. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5181–5190. <https://doi.org/10.1021/jf500912b>.
- Zar, J., 1999. *Biostatistical analysis*, cuarta Ed. ed. New Jersey.
- Zhang, Y.-J., Feng, M.-G., Fan, Y.-H., Luo, Z.-B., Yang, X.-Y., Wu, D., Pei, Y., 2008. A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Sci. Technol.* 18, 551–563. <https://doi.org/10.1080/09583150802082239>.
- Zhao, H., Lovett, B., Fang, W., Microbiolog, C.D.E., Hubbard, M., Hynes, R.K., Erlandson, M., Bailey, K.L., Federici, B.A., 2016. Genetically engineering entomopathogenic fungi. *Handb. Biol. Control Princ. Appl. Biol. Control* 94, 137–163. doi: 10.1016/B978-012257305-7/50065-5.
- Zúñiga-oviedo, M.A., Soto-Giraldo, A., Cruz-Ceron, G., 2016. Actividad biológica de hongos y bacterias entomopatógenas sobre *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: crambidae). *Bol. científico Mus. Hist. Nat.* 20, 82–92.