

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



OBTENCION DE MUTANTES DE *Beauveria Bassiana*  
SOBREPRODUCTORAS DE PROTEASAS

POR:

ANDREA GUADALUPE ALCAZAR PIZANA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.  
SEPTIEMBRE DE 2007

TD

25 320

FCB

2007

.A462

AMDERBA GUADALUPIE ALCANZAR PIZZANIA



1020160690



# UANL

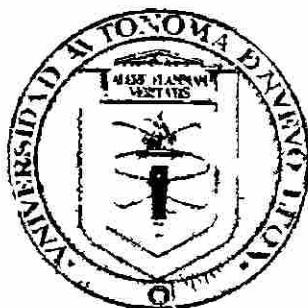
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**OBTENCION DE MUTANTES DE *Beauveria Bassiana*  
SOBREPRODUCTORAS DE PROTEASAS**

POR

**ANDREA GUADALUPE ALCAZAR PIZANA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**



**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA. N. L.**

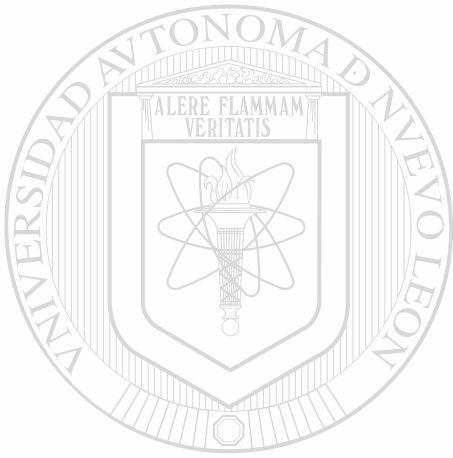
**SEPTIEMBRE DE 2007**

1046016



FONDO  
TESIS  
2008

TD  
Z5320  
FCB  
2007  
.A4G2



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. sep 20 15/08 0

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *Beauveria Bassiana*  
SOBREPRODUCTORAS DE PROTEASAS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

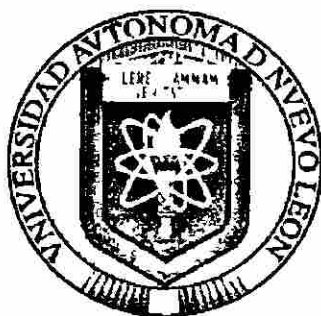
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**ANDREA GUADALUPE ALCÁZAR PIZANA**

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.**

**Septiembre de 2007**



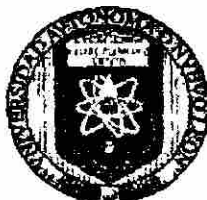
ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DEL  
DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ, EN EL LABORATORIO 4 DEL  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS, PERTENECIENTE A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
NUEVO LEÓN.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *Beauveria bassiana* SOBREPDUCTORAS DE  
PROTEASAS

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con  
especialidad en Biotecnología

Presenta  
Andrea G. Alcázar Pizaña

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Benito Pereyra Alférez  
Director de Tesis

Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas  
Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong  
Vocal

Dra. Lilia H. Morales Ramos  
Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera  
Vocal

Dr. Hiram Medrano Roldán  
Asesor Externo

San Nicolás de los Garza, N. L.

Septiembre de 2007



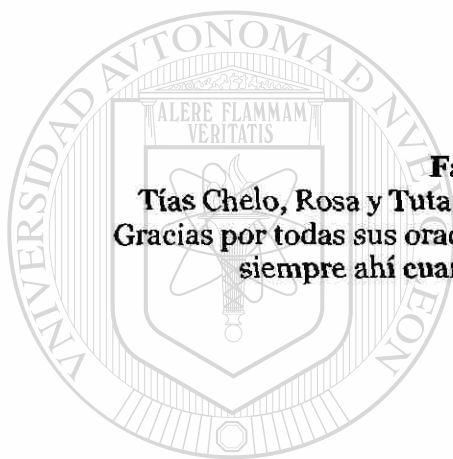
## DEDICATORIA

### **A mis padres:**

**A Geno y Francisco**, porque gracias a ellos he logrado realizar muchos de mis sueños. Por su apoyo, confianza y cariño incondicional. Gracias por ser mis papás. Los quiero mucho.

### **A mis hermanos:**

**Karina, Francisco, Violeta, Brenda y Mariazell**. Por todo su apoyo, por todas sus palabras de aliento que me hacían seguir adelante. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y por estar siempre ahí cuando los he necesitado



### **Familia. Alcázar Sánchez**

**Tías Chelo, Rosa y Tuta, Tíos Nacho, Isidro y Luis (†)**. Por todo su apoyo, Gracias por todas sus oraciones y por todas sus palabras de aliento. Por estar siempre ahí cuando los he necesitado, Los quiero Mucho.

---

### **Familia Pizaña Vázquez**

**Tías Trini, Lala, Rosa Ma., Ma. Del Refugio, Tíos Nano y Chuy**. Gracias por su apoyo e interés, por todos los buenos deseos, por ser la parte alegre de mi gran familia, con ustedes la vida es toda alegría. Los quiero!

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **Biol. Jesús Rodolfo Ambriz Zavaleta**

Que llegó de manera inesperada y que se convirtió en alguien muy importante en mi vida, gracias por todo tu apoyo y por siempre alentarme a que crea más en mí. Te quiero mucho.

Este trabajo se lo dedico de manera muy especial a mi abuelita **Sra. Severita Vázquez V.** y a mi tío **Ing. José Luis Alcázar Sánchez**, hasta que nos volvamos a encontrar. Los quiero.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Gracias por permitirme el logro de una meta más en mi vida. Gracias por ayudarme a realizar mis sueños y por cuidarme siempre en todas las cosas que emprendo.

### **Dr. Benito Pereyra Alférez**

Doctor, muchas gracias por recibirme en su laboratorio. Muchas gracias por todas las enseñanzas, tanto académicas como de vida, gracias su amistad y por la confianza que depositó en mí, espero no haberlo defraudado. Con mucho respeto y admiración.

### **Dra. Ma. Magdalena Iracheta Cárdenas**

Magda, muchas gracias por todas tus enseñanzas, gracias por compartir conmigo tu experiencia, tu ayuda y tus comentarios durante el desarrollo de mi trabajo fueron parte fundamental para realizarlo, gracias por tu paciencia y gracias por tu amistad. Con mucho cariño y admiración.

### **Dr. Aquiles Solís Soto**

Por ser la persona que me inició en esta aventura que es la investigación, por siempre confiar y creer en mí, por todas sus enseñanzas. Inge, muchas gracias por ser mi amigo.

Este trabajo fue desarrollado gracias a la beca y los apoyos otorgados por  
**CONACYT**

---

**PAICYT. Proyecto CN 908-04.** Por el financiamiento otorgado para la  
realización de este proyecto

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

### **M.C. Victor E. Aguirre Arzola**

Victor, en este tiempo que te conozco, has llegado a ser uno de mis mejores amigos. Muchas gracias por todo, no hubiera podido hacer muchas cosas sin tu ayuda, pero sobre todo muchas gracias por tu amistad, te quiero hermano!

### **M.C.. Guadalupe Rojas Verde**

Lupita muchas gracias por tanta aventura que compartimos en los viajes a los congresos, gracias por todo tu apoyo y por tu comprensión, pero sobre todo muchas gracias por ser mi amiga.

**M.C. Alejandra Morales Montiel**

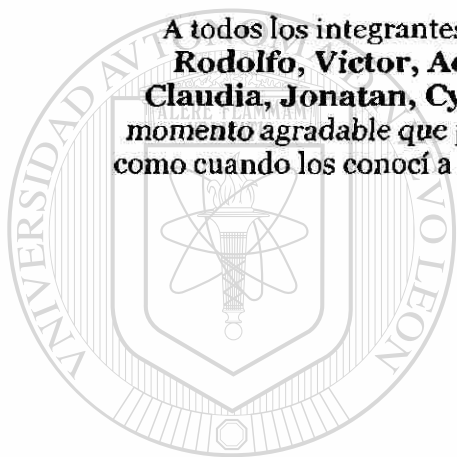
Muchas gracias por tu amistad durante estos años en mi estancia en esta ciudad, gracias por todos los momentos que pasamos.

**Q.B.P. Addis Abeva Flores Soto**

Muchas gracias por permitirme ser “asesor” en el desarrollo de tu tesis, por compartir conmigo tantos y tantos experimentos frustrados, *pero sobre todo* muchas gracias por ser mi amiga.

A mis amigos **Tita, Yesenia, Omar, Xavier, Alma, Aida y Miriam**, por su apoyo moral y por alentarme a seguir siempre adelante.

A todos los integrantes del Laboratorio L4 del Instituto de Biotecnología, **Rodolfo, Victor, Addis, Eder, Roberto, Paola, Rita, Bernardo, Claudia, Jonatan, Cynthia, Clara, Bárbara**, muchas gracias por tanto momento agradable que pase en su compañía, nunca mi vida fue tan divertida como cuando los conocí a todos ustedes. Espero contar siempre con su amistad.  
Los quiero chicos



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CONTENIDO

Sección	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1.- INTRODUCCION.....	3
2.- HIPOTESIS.....	5
3.- OBJETIVO GENERAL.....	6
3.1 Objetivos Específicos.....	6
4.- ANTECEDENTES.....	7
4.1. Bioinsecticidas utilizados en la actualidad.....	7
4.1.1. Virus entomopatógenos.....	7
4.1.2. Bacterias entomopatógenas.....	8
4.1.3. Nematodos entomopatógenos.....	8
4.1.4. Hongos entomopatógenos.....	9
4.2 <i>Beauveria bassiana</i> .....	11
4.2.1. El ciclo de vida de <i>B. bassiana</i> .....	12
4.3 Patogénesis de los Hifomicetos.....	14
4.4 Modo de acción de los hongos entomopatógenos.....	14
4.4.1 Adhesión y germinación.....	14
4.4.2 Penetración de la cutícula.....	15
4.4.2.1 Producción de toxinas.....	16
4.4.3 Desarrollo del hongo.....	16
4.5 Enzimas extracelulares.....	17
4.6 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	19
4.7 Mecanismo de defensa del insecto.....	20
4.8 Factores que afectan la actividad de <i>Beauveria bassiana</i> .....	21
4.8.1 El huésped.....	21
4.8.2 El patógeno.....	22
4.8.3 Condiciones ambientales.....	22
4.9 Producción de hongos entomopatógenos.....	22
4.10 Ingeniería Genética de Hongos Entomopatógenos.....	23
4.11 Mutagénesis.....	24
4.12 Mutagénesis en hongos.....	25
4.13 Proteasas.....	26
4.13.1 Proteasas de origen microbiano.....	26
4.13.1.1 Bacterias.....	26
4.13.1.2 Hongos.....	27
4.13.1.3 Virus.....	27
4.14 Clasificación de las proteasas.....	28
4.15 Regulación enzimática.....	29

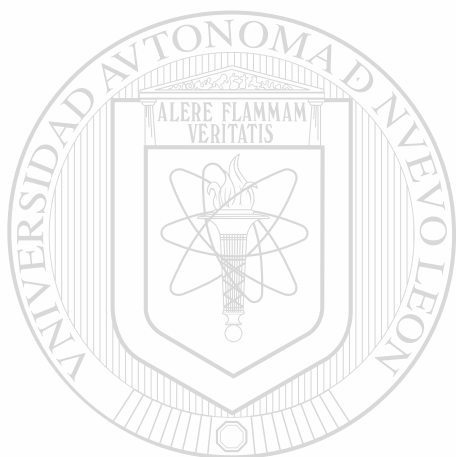
5.0 MATERIALES Y METODOS.....	34
5.1 Cepa y conservación.....	34
5.2 Ensayo mutagénesis: Determinación del tiempo de exposición.....	34
5.3 Detección y selección de mutantes.....	35
5.4 Estabilidad de las cepas mutantes.....	35
5.6 Obtención de cultivo monoespora.....	35
5.6 Determinación de proteína.....	36
5.7 Inducción de la actividad enzimática.....	36
5.8 Determinación de actividad general de proteasa.....	36
5.9 Zimogramas.....	37
5.10 Actividad enzimática en soporte.....	37
5.11 Ensayos de inhibición enzimática en soporte.....	38
5.12 Estudios de la inducción-represión de la producción de proteasas.....	38
5.12.1 Cinéticas de crecimiento.....	38
5.12.2 Determinación de peso seco.....	39
5.12.3 Determinación de azúcares reductores.....	39
5.13 identificación del tipo de proteasas por PCR.....	39
5.13.1 Extracción de DNA.....	39
5.13.2 Diseño de iniciadores.....	40
5.14 Reacción en cadena de la polimerasa.....	41
6.0 RESULTADOS.....	42
6.1 Ensayo de mutagénesis.....	42
6.2 Selección de las cepas mutantes.....	43
6.3 Estabilidad de las cepas mutantes.....	44
6.4 Determinación de proteína.....	45
6.5 Inducción de la actividad proteasa.....	45
6.6 Perfil de producción de proteasas.....	47
6.7 Tipo de actividad.....	48
6.8 Ensayo de inhibición en soporte.....	50
6.9 Represión bioquímica de la producción de proteasas.....	50
6.10 Cinéticas de crecimiento en medio represor.....	53
6.11 Identificación de las proteasas por PCR.....	57
7.0 DISCUSION.....	69
8.0 CONCLUSIONES.....	75
9.0 LITERATURA CITADA.....	77
APENDICE A.....	95
APENDICE B.....	115

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Titulo	Pág.
1	Control biológico de insectos plaga (picudo de la alfalfa). Izquierda y centro, insectos adultos muertos por <i>Beauveria bassiana</i> . Derecha, insecto adulto sano (control.....	9
2	Modo de crecimiento dimórfico de <i>B. bassiana</i> .....	13
3	Modo de acción de los hongos entomopatógenos.....	13
4	Porcentaje de sobrevivencia de <i>B. bassiana</i> cepa BbCh1 después de irradiación con luz UV.....	42
5	Desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas Paterna y mutantes crecidas sobre Agar caseína (AC) y medidas a los 5 días de cultivo.....	44
6	Proteína total de la cepa paterna y mutantes.....	46
7	Actividad enzimática de la cepa paterna y mutantes.....	46
8	Actividad específica de la cepa paterna y mutantes.....	47
9	Determinación del perfil de producción de proteasas por las cepas Paterna y mutantes mediante zimogramas de caseína.....	48
10	Determinación de actividad enzimática tipo tripsina en soporte.....	48
11	Determinación de actividad enzimática tipo quimiotripsina en soporte...	49
12	Determinación de actividad enzimática tipo elastasa en soporte.....	49
13	Determinación de la inhibición actividad enzimática en soporte por PMSF.....	50
14	Peso seco de cepa paterna y mutante en medio inductor.....	51
15	Comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> , Cepa Paterna en medio inductor.....	51
16	Comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento de <i>Beauveria</i>	

	<i>bassiana</i> , cepa M-82 en medio inductor.....	52
17	Producción de esporas de la cepa paterna y mutante en medio inductor...	52
18	Peso seco de cepa paterna y mutante en medio represor.....	53
19	Comportamiento del consumo de glucosa (g/ml) durante la cinética de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> .....	53
20	Comportamiento del consumo de glucosa por la cepa mutante en medio represor.....	54
21	Comportamiento del pH durante la propagación de <i>Beauveria bassiana</i> cepa mutante M82 en medio represor.....	54
22	Producción de esporas/ ml de la cepa paterna y mutante en medio represor.....	55
23	Zimogramas de caseína. Cepa paterna y mutante M 82 en medio YPD...	55
24	Zimogramas de caseína.. Cepa paterna y mutante en medio represor.....	56
25	Zimogramas de caseína.. Cepa paterna y mutante en medio inductor.....	56
26	Actividad enzimática en soporte. Actividad tipo quimi tripsina y tipo elastasa de cepa paterna y mutante en medio inductor.....	57
27	Comparación de la secuencia de aminoácidos por medio del programa LaserGene (DNASTar ver. 4.05) utilizando Clustal W, para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> .....	58
28	Localización esquemática de los iniciadores Pr1A y Pr1B sobre el gen <i>pr1</i> de <i>Beauveria bassiana</i> .....	59
29	Localización esquemática de los iniciadores AAP1 y AAP2 sobre el gen <i>pr1</i> de <i>Beauveria bassiana</i> .....	59
30	Localización esquemática de los iniciadores AAP3f y AAP3r sobre el gen <i>bsn1</i> de <i>Beauveria bassiana</i> .....	59
31	Localización esquemática de los iniciadores AAP4f y AAP4r sobre el gen <i>bsn1</i> de <i>Beauveria bassiana</i> .....	60
32	PCR con los iniciadores AAP3f y AAP3r.....	60
33	Comparación de la secuencia de nucleótidos por medio del programa LaserGene (DNASTar ver. 4.05) utilizando Clustal W; para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> .....	63

34	PCR con los iniciadores AAP1 y AAP3r.....	64
35	Localización esquemática del iniciador CGS 1 sobre el gen <i>cdep-2</i> de <i>Beauveria bassiana</i> .....	64
36	PCR con los iniciadores AAP1 y CGS1.....	65
37	Comparación de la secuencia de nucleótidos por medio del programa LaseGene (DNASTar ver. 4.05) utilizando Clustal W; para tres proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> .....	68



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

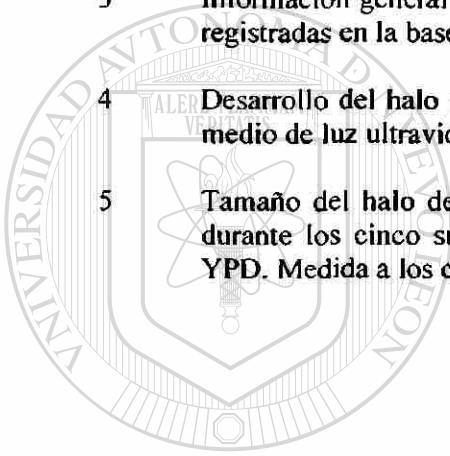


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
1	Algunos de los principales productos comerciales a base de hongos entomopatógenos.....	10
2	Información general del microorganismo utilizado.....	34
3	Información general de los iniciadores diseñados en base a secuencias registradas en la base de datos del Genbank.....	40
4	Desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas mutantes obtenidas por medio de luz ultravioleta. Observación en medio de agar caseína.....	43
5	Tamaño del halo de hidrólisis sobre AC de las cepas seleccionadas durante los cinco subcultivos sucesivos y alternados en AC y agar YPD. Medida a los cinco días de cultivo.....	45



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Uno de los factores más importantes involucrados en la virulencia de *Beauveria bassiana* es la capacidad para irrumpir y penetrar la cutícula del insecto mediante la acción de enzimas secretadas por el hongo. Algunas investigaciones reportan que la capacidad de una cepa para producir proteasas en cantidades suficientes, probablemente determina la virulencia de una cepa de hongo en particular, lo anterior es debido a que más de la mitad del peso de la cutícula de los insectos está constituida por proteínas. En la presente investigación fueron obtenidas cepas mutantes del hongo entomopatógeno *B. bassiana* cepa BbCh1, mediante luz ultravioleta, a una longitud de onda de 254 nm, con lo cual fueron obtenidas 136 colonias mutantes a una distancia de 10 cm y un tiempo de exposición de 4 min. De las 136 colonias fueron seleccionadas 6 colonias mutantes denominadas como M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 y M-82 que presentaron los mayores halos de hidrólisis al ser crecidas en agar suplementado con leche descremada (AC), alrededor de 4.5 cm para la M-82 y de 4.0 cm para todas las demás cepas y que fueron estables al menos a 5 subcultivos alternados en AC y agar YPD. La producción de proteasas fue inducida en medio líquido de sales con gelatina como inductor y la actividad enzimática y contenido de proteína determinada. Todas las cepas mutantes presentaron una actividad enzimática al menos dos veces mayor que la cepa paterna, aunque en la mutante M-82 la mayor actividad enzimática se presenta a las 48 h, no así en todas las demás cepas incluyendo la paterna, cuya actividad se presenta a las 72 h. el contenido de proteína es similar al de la cepa paterna en todas las cepas. Todas las cepas mostraron actividades tipo quimiotripsina y elastasa, pero no actividad tipo tripsina. La proteasa producida pertenece al grupo de las serino proteasas al ser inhibida su actividad con PMSF. El mecanismo de regulación de la proteasa de interés producida por la M-82, no se vio afectado por la mutación, ya que tuvo un comportamiento muy similar al de la cepa paterna en los diferentes medios usados para tal propósito. Por último, fue identificado el tipo de proteasa presente en las cepas por medio de iniciadores diseñados en base a las secuencias reportadas para tres proteínas degradadoras de cutícula producidas por *B. bassiana*, Pr1, Bsn1 y CDEP-2, encontrándose que las proteínas producidas por todas las cepas son del tipo Bsn1 o CDEP.

### Palabras clave

*Beauveria bassiana*, Mutagénesis, proteasas

---

**ABSTRACT**

Natural occurring entomopathogens are important regulatory factors in insect populations. The entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* is one of the most used biological control agents. It is believed that extracellular proteases play a key role in cuticle hydrolysis and fungal entry to the hemocoel since proteins are the major components of insect cuticle. In this study, *Beauveria bassiana* strain BbCh1 was mutagenized using UV light (254 nm), placing the lamp at 10 cm and irradiating a spore suspension for 4 min. 136 colonies were obtained after UV exposure. There were selected 6 mutant strains, named M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 and M-82 that showed a large and stable protein hydrolysis halo (4.0-4.5 cm) and were stable at least at five repeated alternate subculturing onto agar supplemented with skimmed milk (CA) and YPD. Protein content was similar for mutant and parental strains. General enzymatic activity was higher (at least two times) in mutant strains. All strains showed chymotrypsin-like and elastase-like activities, but they didn't show trypsin-like activity. The protease produced belongs to the group of serine proteases because it is inhibited by PMSF. The protease regulation mechanism was not affected by mutagenesis due to that mutant strain M-82 was very similar to parental strain when they were grown in inductor and repressor media. Finally, protease type present in parental and mutant strains was identified using primers designed on the sequences reported for three cuticle-degrading proteases produced by *B. bassiana*: Pr1, Bsn1 and CDEP-2, all the strains showed BSN1 or CDEP-2 protease type.

**Key words**

*Beauveria bassiana*, mutant, protease

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 1.- INTRODUCCIÓN

En el siglo pasado se vio la introducción en la agricultura de insecticidas químicos, así como también las graves consecuencias de su uso. Ciertamente, el uso intensivo de estos químicos han causado, no solo efectos nocivos en el medio ambiente y en la salud de los humanos, sino también contribuido a la aparición de resistencia contra estos químicos.

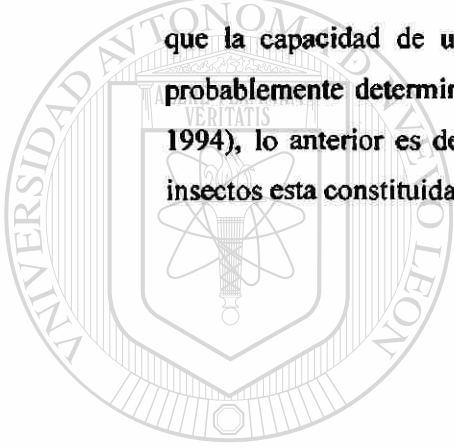
Las observaciones anteriores han generado gran interés de alternativas de control, tal es el caso del desarrollo de agentes de control microbiano para un manejo integral de insectos plaga.

Varios microorganismos se encuentran son utilizados como agentes de control biológico y éstos incluyen virus, bacterias, protozoarios y hongos. Entre los cuales los hongos entomopatógenos, ocupan un lugar preponderante. Se han reportado epidemias causadas por deuteromicetos usualmente *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Sorosporrella* sp bajo condiciones de alta humedad (Shah *et al.*, 1994; Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997; Delgado *et al.*, 1997, Lomer, 1997). Los hongos con mayor potencial son en particular los géneros *B. bassiana* y *M. anisopliae*, ya que son seguros para vertebrados (Goettel y Johnson, 1992; Goettel y Jaronski, 1997), fácilmente producidos *in vitro* (Jenkins y Prior, 1993; Feng *et al.*, 1994; Jenkins y Goettel, 1997, Jenkins *et al.*, 1998) y formulados como insecticidas biológicos para asperjarse con tecnología de ultra bajo volumen, utilizando 1 ó 2 l/ha (Bateman, 1992; Bateman *et al.*, 1993).

Pero la patogenicidad de los hongos es restringida por varios factores físicos y biológicos. Estos últimos comprenden desde la capacidad de adhesión de la espora a la cutícula, rapidez de germinación y crecimiento de la hifa, además de la capacidad para irrumpir y penetrar la cutícula del insecto mediante la acción conjunta

de presión mecánica y degradación de los componentes de la cutícula, mediante la acción de enzimas secretadas por el hongo (Hajek y St. Leger. 1994). Según Samuels *et al.* (1989), las cepas que muestran alta actividad patógena, muestran cantidades detectables de enzimas extracelulares como quitinasas, proteasas y lipasas.

Varias de estas enzimas, principalmente proteasas y quitinasas, que degradan la proteína y quitina de la cutícula del insecto, han sido identificadas y caracterizadas en hongos entomopatógenos como *B. bassiana* y *M. anisopliae* (El-Sayed *et al.*, 1989). Muchas investigaciones se han realizado con el fin de entender la función de estas enzimas durante eventos de patogenicidad, la mayoría de los estudios se han enfocado hacia la actividad de las proteasas, ya que algunos investigadores reportan que la capacidad de una cepa para producir proteasas en cantidades suficientes probablemente determina la virulencia de una cepa de hongo en particular (Gupta, 1994), lo anterior es debido a que mas de la mitad del peso de la cutícula de los insectos esta constituida por proteínas (Bidochka y Khachatourians, 1992).



UANL

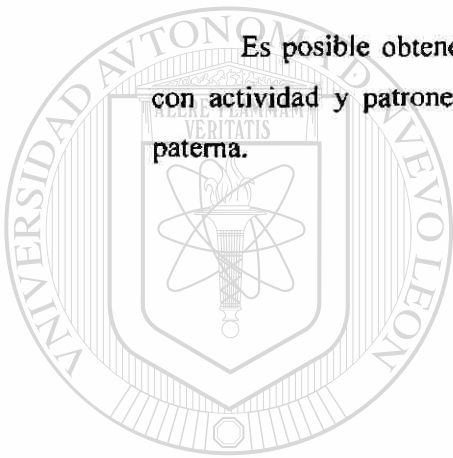
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.0 HIPOTESIS

Es posible obtener mutantes por medio de mutagénesis con luz ultravioleta con actividad y patrones de producción de proteasas diferentes a los de la cepa paterna.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General:

Obtención de cepas mutantes del hongo *Beauveria bassiana* con mayor actividad proteolítica

#### 3.2 Objetivos Particulares

1. Establecer un sistema de mutagénesis en el hongo *Beauveria bassiana*, para obtener cepas con mayor actividad proteolítica.
2. Estudiar el comportamiento de la cepa mutante bajo condiciones de inducción y represión de la actividad proteolítica.
3. Caracterizar la(s) proteasa(s) mutantes y paternas del entomopatógeno.
4. Determinar el tipo de proteasa presente en la cepa paterna y mutantes por medio de PCR

## 4.0 ANTECEDENTES

El uso indiscriminado de los insecticidas químicos, ha causado serios problemas de contaminación así como la aparición de resistencia de los insectos. Estos hechos han generado la necesidad de buscar nuevas alternativas que tengan menor impacto negativo en el ecosistema. El control Biológico ofrece una alternativa atractiva para usarse en el control de plagas. Los agentes de control biológico microbiano son organismos que se encuentran en la naturaleza; además su complejo modo de acción hace menos probable que se presente el fenómeno de desarrollo de resistencia. Los agentes de control biológico de plagas incluyen virus, bacterias, hongos, y nemátodos.

### 4.1. Bioinsecticidas utilizados en la actualidad

#### 4.1.1. Virus entomopatógenos

Los virus patógenos de insectos conocidos en la actualidad pertenecen a la familia Baculoviridae (BV). Los BV incluyen dos géneros patógenos específicamente para artrópodos (Nucleoplíedrovirus, NPV y Granulovirus, GV) y la mayoría de los baculovirus son infecciosos solamente para las especies del orden lepidóptera, con ninguna clase de efecto adverso para cualquier otro orden de insectos. En resumen, muchos de los baculovirus exhiben un muy reducido espectro, son principalmente tóxicos a una sola especie de hospedero, tal especificidad los hace buenos candidatos para su uso en los sistemas de manejo integral de plagas (Romanowski, 2002).

Hasta la fecha muchos de los casos exitosos en el uso de baculovirus como agentes de control biológico se debe a la explotación de una característica de estos organismos, la producción de nucleopolihedrovirus de *Anticarsia gemmatalis*



(AgMNPV) para el control de gusano terciopelo en cultivos de soya en Brasil. También la multinucleocapside del nucleopolihedrovirus de *Spodoptere frugiperda* (SfMNPV), la cual es la principal plaga de maíz y sorgo, ha sido desarrollado en México y Centro América como bioinsecticida (Williams, 2002);

#### 4.1.2. Bacterias entomopatógenas

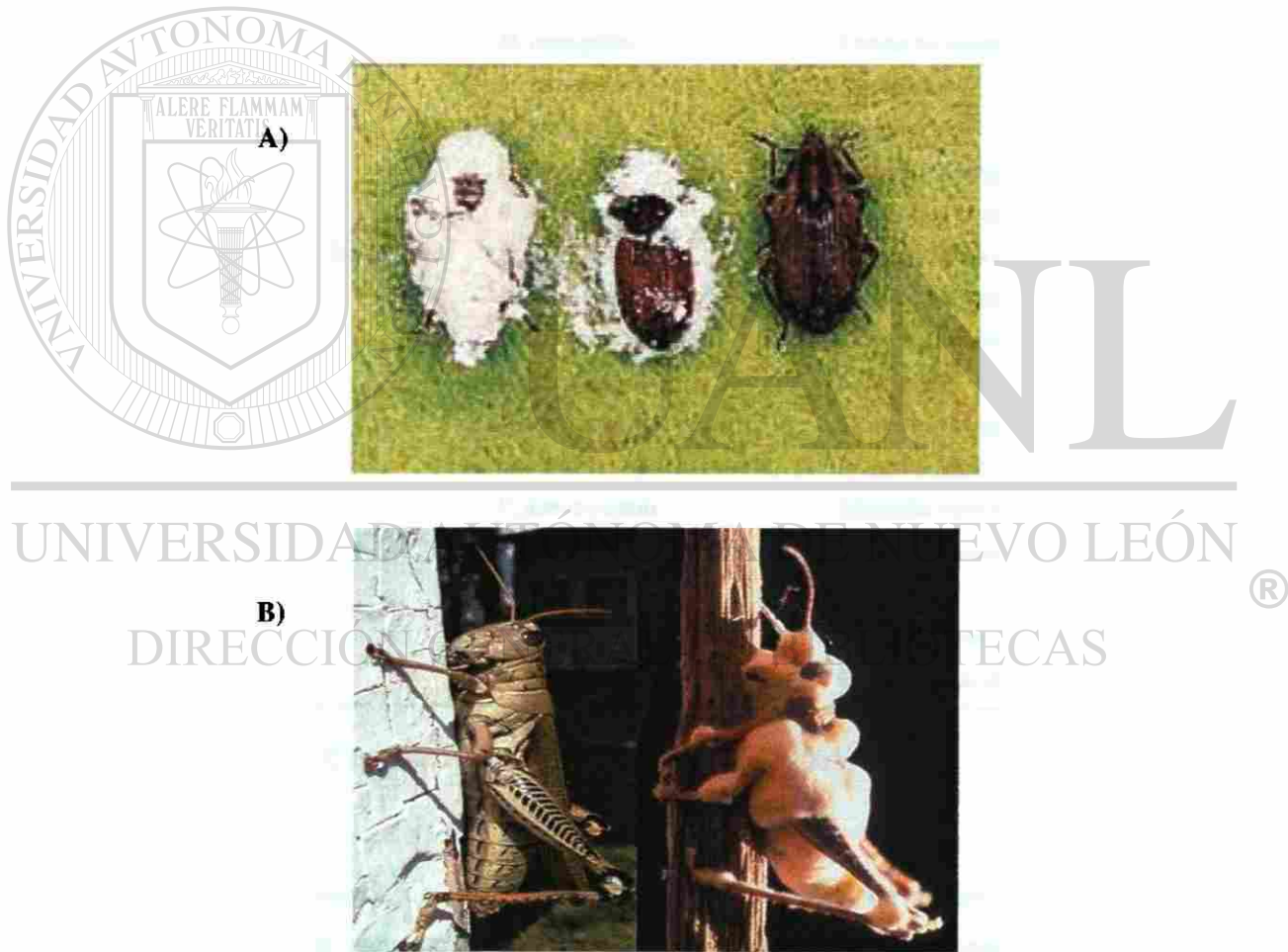
El mejor ejemplo de insecticidas bacterianos que se ha investigado muy a fondo pertenece al genero *Bacillus*. Comercialmente se han usado como insecticidas cuatro especies: *B. thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. moritai* y *B. sphaericus*. *B. thuringiensis*, es el agente de control biológico más exitoso, produce una serie de toxinas  $\alpha$ - y  $\beta$ -exotoxinas y  $\delta$ -endotoxina, esta última es sintetizada durante la fase de esporulación (Zhong, 2000). *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) ha sido usado exitosamente para el control de mosquitos y mosquita negra, además varias toxinas de *B. thuringiensis* han sido utilizadas en cultivos transgénicos como lo son el algodón, maíz y soya (Khachatourians, 1986).

#### 4.1.3. Nemátodos entomopatógenos

Los nemátodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* junto con sus bacterias simbióticas, *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, representan un agente de control biológico único. Los nemátodos depositan a la bacteria entomopatógena dentro del intestino del insecto, donde las bacterias se multiplican y producen un amplio rango de toxinas y exoenzimas hidrolíticas que son las responsables de la muerte y bioconversión de la larva del insecto en nutrientes, que son ideales para el crecimiento y reproducción del nematodo. Los nemátodos se reproducen hasta que los nutrientes se terminan, en cuyo tiempo pueden ser recolonizados por bacterias simbióticas (Forst y Clarke, 2002). El complejo nematodo-bacteria mata rápidamente al insecto (48 h) y no formar relaciones hospedero-patógeno altamente adaptables, tal como ocurre en la mayoría de otros parásitos utilizados para el control biológico y, por lo tanto presentan una gama de hospederos más amplia.

#### 4.1.4. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos se encuentran dentro de los primeros organismos que fueron usados en el control biológico de plagas. Más de 700 especies de hongos, de alrededor de 90 géneros son patógenos para insectos. La mayoría se encuentran dentro de los deuteromicetos y entomophthorales, algunos de los hongos patógenos presentan rangos de hospederos muy restringidos, por ejemplo, *Aschersonia aleyrodis*, que infecta solamente mosquitas, mientras que otras especies de hongos tienen un espectro de hospederos más amplio, con aislados individuales que son más específicos, por ejemplo, *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Fig. 1).



**Figura 1.** Ejemplos de control biológico de insectos plaga A) Picudo del algodón: Izquierda y centro, insectos adultos muertos por *B. bassiana*. Derecha, insecto adulto sano (control). B) Chapulín: Izquierda insecto adulto sano, derecha insecto infectado por *B. bassiana*.

Actualmente existen numerosos productos comerciales a base de hongos entomopatógenos, contra diferentes insectos blanco. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de productos a base de estos agentes de biocontrol que a la fecha se producen comercial o semicomercialmente

**TABLA 1**  
Algunos de los principales productos comerciales a base de hongos entomopatógenos\*.

Producto	Hongo	Blanco
Myeotal	<i>Verticillium lecanii</i>	Mosquita blanca y áfidos
Vertalec	<i>V. lecanii</i>	Áfidos
BioGreen	<i>M. anisopliae</i>	Larvas de escarabajo
Bio-Path	<i>M. anisopliae</i>	Cucarachas
Bio-Blast	<i>M. anisopliae</i>	Termitas
CornGuard	<i>B. bassiana</i>	Chapulín y langosta
Mycotrol GH	<i>B. bassiana</i>	Chapulín y langosta
Mycotrol WP & BotaniGard	<i>B. bassiana</i>	Mosquita blanca, áfidos y trips
Naturales-L	<i>B. bassiana</i>	Plagas de algodón
Proecol	<i>B. bassiana</i>	Gusano soldado
Boverin	<i>B. bassiana</i>	Catarinitas
Green Muscle	<i>Metarhizium flavoviride</i>	Chapulín y langosta
PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Mosquita blanca
Pae-Sin	<i>P. fumosoroseus</i>	Mosquita blanca
Bea-Sin	<i>B. bassiana</i>	Mosquita blanca, chapulín
B. bassiana	<i>B. bassiana</i>	Chapulín
Meta-Sin	<i>M. anisopliae</i>	Plagas caseras
Fitosan-M	<i>M. anisopliae</i>	Gallina ciega, chapulines

\* (Butt y Copping, 2000 y Tamez-Guerra *et al.*, 2001)

*Verticillium lecanii*, es usado en Europa para el control de áfidos e insectos de invernadero, se encuentra disponible en dos productos: Vertalec, para áfidos (Hall, 1981; Milner, 1997; Burges, 2000; Yeo *et al.*, 2003) y Micotal para mosquita blanca y arañas (Milner, 1997), cuyo productor es Koppert Biological Systems en Holanda. Estos productos se encuentran registrados en Dinamarca, Finlandia, Holanda,

Noruega y Reino Unido y su registro se encuentra pendiente en Francia, España y Turquía (Shah y Pell, 2003).

*B. bassiana* está disponible para una amplia gama de insectos y los productos a base de este hongo son muy vendidos en los Estados Unidos, desde inicios de 1980 por la empresa Mycotech (Bradley *et al.*, 1992). En 1999, Mycotal fué registrado por la Agencia de Protección Ambiental de USA. Los productos de Mycotech a base de *B. bassiana* fueron los primeros en comercializarse en los Estados Unidos. Aunque en el año 2000 la empresa Mycotech fue absorbida por Emerald Bio Agriculture, esta continúa con la producción y comercialización de estos productos.

Un tercer ejemplo es *Metarhizium sp.*, el cual después de un arduo programa de 12 años de investigación que inició en 1990, involucrando al menos 40 científicos y una inversión de aproximadamente \$ 17 millones USD, se ha patentado un producto llamado "Green Muscle", disponible comercialmente y recomendado por la FAO para el control de langosta y chapulín en África. Para lograr este objetivo el proyecto se realizó con la colaboración de diversas instituciones de investigación del Reino Unido, Holanda y las Repúblicas de Benin y Nigeria. Especies tales como *M. anisopliae* y *B. bassiana* han sido bien caracterizadas con respecto a su patogenicidad y han sido usadas como agentes de control biológico de plagas alrededor del mundo.

#### 4.2 *Beauveria bassiana*

*B. bassiana* es la primera especie de hongo entomopatógeno que fue utilizada en el control biológico de plagas; se han aislado numerosas cepas con actividad insecticida contra una gran variedad de insectos plaga. *Beauveria* es un género factible de reproducción masiva (Hernández-Velázquez *et al.*, 1996); pertenece a la subdivisión Deuteromicotina; las clases de esta subdivisión, se caracterizan por no presentar el estado sexual de reproducción, por lo que se les conoce con el nombre de hongos imperfectos: la clase Hifomicetos, a la cual pertenece el género antes mencionado, es la más importante; esta incluye a la mayoría de las especies conocidas como patógenas para insectos plaga. Los Hifomicetos se caracterizan por

formar micelio septado con conidióforo simple o agrupado. La identificación de los géneros se basa en la forma en que se originan las conidias en el conidióforo (Tanada y Kaya, 1993).

El género *Beauveria* es un hongo entomopatógeno con hifas septadas, contiene las estructuras reproductivas denominadas conidióforos, sobre éstas se desarrollan las conidias; el micelio de *Beauveria* se ramifica para formar los conidióforos, que son simples e irregulares y terminan en vértice en forma de racimos, la base de la célula conidiógena es globosa presentando un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios, los cuales son también de forma globosa de 2-3 x 2.0  $\mu\text{m}$  (Humber, 1981). *Beauveria* alcanza su desarrollo completo en medio de cultivo sólido en 21 días a 27°C; se caracteriza por presentar una apariencia polvosa de color blanco algodonoso o amarillento cremoso; los hospederos de este género son principalmente lepidópteros, coleópteros y hemipteros, pero puede presentarse en dípteros e himenópteros (Hernández-Velázquez *et al.*, 1996).

Una micosis causada por *B. bassiana* fue la primera enfermedad infecciosa presentada en un insecto, *Bombyx mori*, y una cepa estrechamente relacionada con *B. bassiana* (*B. globulifera*) fue usada en los EUA, en uno de los primeros intentos para controlar insectos plaga por métodos biológicos (Ignoffo *et al.*, 1979). A nivel de laboratorio, existe riesgo de que características como crecimiento, esporulación y virulencia de una cepa disminuya o se pierda debido a la repetición de cultivos a que se somete para su conservación y/o manejo. Sin embargo, esta se puede recuperar reaislando las cepas después de atacar, matar y reemerger del insecto blanco (Hayden *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1994) ó mediante la obtención de cultivos monoespora, con lo cual una cepa puede mantenerse estable hasta por 80 subcultivos (Samsinakova y Kalalova, 1983; Hall, 1980).

#### 4.2.1. El ciclo de vida de *B. bassiana*

*B. bassiana* presenta un modo dimórfico de crecimiento. En ausencia de un hospedero específico, *Beauveria* pasa a través de un ciclo de vida vegetativo asexual que incluye germinación, crecimiento micelial y la formación de conidias (Fig. 2). En presencia de su hospedero, *Beauveria* cambia al ciclo de vida patógeno. Las

conidiosporas germinan en la superficie de la cutícula y los tubos germinativos penetran el integumento del insecto directamente.

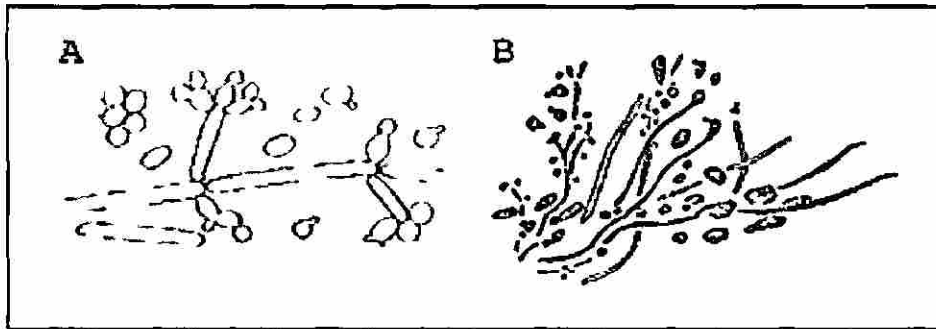


Figura 2. Modo de crecimiento dimórfico de *B. bassiana*. (A) Fase parasítica en forma de levadura cuando infecta a la especie susceptible. (B) Fase saprofita muestra hifas filamentosas.

Quando han penetrado la cutícula, el hongo altera su morfología de crecimiento a una fase de crecimiento de levadura y produce cuerpos hifales, los cuales circulan en la hemolinfa y proliferan por gemación (Fig. 3). En seguida de la muerte del insecto, el crecimiento del hongo regresa a la forma típica de hifa (etapa saprófita). La habilidad de pasar por la etapa de crecimiento de levadura, probablemente sea un prerrequisito para la patogenicidad.

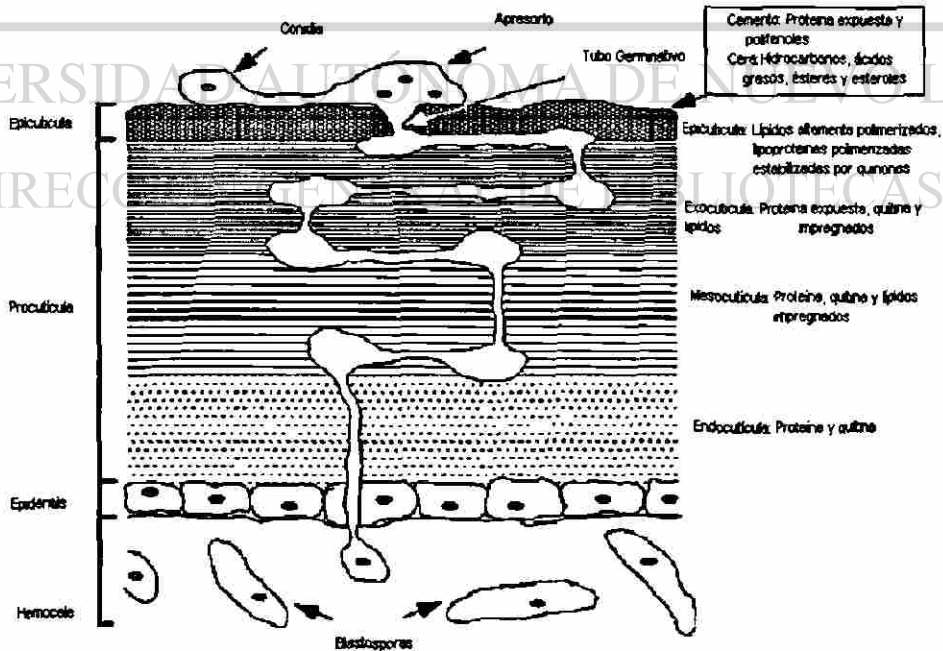


Figura 3. Modo de acción de los hongos entomopatógenos.

### 4.3 Patogénesis de los Hifomicetos

Entre los entomopatógenos solamente los hongos han adquirido la habilidad para invadir a sus hospederos a través de la cutícula externa, ya que el modo de acción de otros microorganismos entomopatógenos como virus, bacterias, protozoarios y nemátodos, está limitado a que sea ingerido por el hospedero.

### 4.4 Modo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos, como la mayoría de los hongos patógenos de plantas y vertebrados, infectan a sus huéspedes a través de la cutícula externa (Ferrón, 1978); este modo de infección es único y característico de los hongos, ya que todos los otros microorganismos entomopatógenos, incluyendo nemátodos, virus y bacterias, tienen el inconveniente que deben ingresar al huésped, por alguna vía, normalmente oral, anal y/o orificios de respiración. Sin embargo los hongos pueden penetrar por todas las vías mencionadas así como a través de la cutícula externa (Yanagita, 1987; Miranpuri y Khachatourians, 1991, Siebeneicher *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1968).

El desarrollo de la enfermedad o micosis puede ser separado en tres fases: a) adhesión y germinación de la espora; b) penetración en el hemocele y c) desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del hospedero (Chamley, 1992; Goettel y Johnson, 1992).

#### 4.4.1 Adhesión y germinación

El contacto espóra-hospedero es el principal requisito para desarrollar una micosis y el éxito de este contacto dependerá de varios factores, entre los que se encuentran mecanismos pasivos relacionados con la secreción de un material mucilaginoso y estructuras superficiales (Boucias y Pendland, 1991; Rath *et al.*, 1995). Las conidias secas de los Deuteromicetos en cambio, poseen fascículos o

surcos; en estos casos, la unión es debida a la hidrofobicidad de los surcos y la cutícula del insecto (Boucias *et al.*, 1988, Jeffs y Khachatourians, 1997).

La germinación, por su parte, depende, en gran medida, de las condiciones ambientales principalmente temperatura y humedad (Ignoffo, 1992; St. Leger, 1991). Este evento de unión puede depender también de aspectos bioquímicos y topográficos y se ha demostrado que los micropliegues de la epicutícula juegan un papel importante en la germinación (St. Leger *et al.*, 1991). Una vez que la conidia se ha colocado sobre la epicutícula del hospedero, ésta sufre cambios morfológicos importantes para iniciar la germinación y penetración.

#### 4.4.2 Penetración de la cutícula

Una vez que la espora germina, el tubo germinativo resultante puede penetrar la cutícula directamente o producir un apresorio del cual se desarrolla una clavija de infección en la cutícula del insecto (Zacharuk, 1981). La epicutícula es una barrera formada por varias capas y cada una posee propiedades muy particulares, en la mayoría de los insectos, la capa externa es frágil y es rota por fuerzas mecánicas, evento que es facilitado por la secreción de enzimas hidrolíticas, como proteasas, quitinasas, lipasas, esterasas y aminopeptidasas, favoreciendo la penetración (St. Leger *et al.*, 1987; Hernández-Torres *et al.*, 2004). La capa media consiste de polímeros de lipoproteína estabilizada por quinonas y es más resistente que la capa externa, pero es hidrolizada por varias exoenzimas del patógeno (Chamley y St Leger, 1991). El ejemplo más conocido de la penetración está dado en *M. anisopliae*, quien sintetiza una proteasa llamada Pr1, la cual es secretada por el apresorio del hongo sobre la cutícula de *Manduca sexta* para poder penetrarla. Y de cuyos estudios se concluyó que esta proteasa es el factor clave en la penetración la cutícula del insecto por el hongo (St. Leger *et al.*, 1988). La cutícula esta formada en un 70% aproximadamente de proteínas, lo que explica que sean las proteasas más importantes que las quitinasas en el proceso de penetración.

La digestión enzimática, además de la presión celular presentada por los extremos de las hifas, culmina con el rompimiento de la barrera cuticular, una vez que la epicutícula ha sido rota, inicia el proceso de penetración, el cual puede ser por



medio de hifas o estructuras que se extienden lateralmente. La penetración lateral puede causar fracturas que favorecen la penetración y facilita la dispersión del patógeno por la producción de exoenzimas y otros compuestos que facilitan la invasión del hospedero. El grado de resistencia de la epicutícula a la acción de las exoenzimas, depende del grosor, la tensión y grado de esclerotización de la cutícula. Los insectos con segmentos altamente esclerotizados son invadidos vía espiráculos y/o membranas atrooidales (Charnley, 1989). El daño en la cutícula desarrolla un proceso de melanización, como mecanismo de defensa, pero frecuentemente, esto ocurre tarde o en magnitud insuficiente para detener el crecimiento del patógeno (Hajek y St. Leger, 1994).

#### 4.4.2.1 Producción de toxinas

Cuando el hongo alcanza la hemolinfa del insecto, puede crecer como blastosporas o cuerpos hifales. Esto puede facilitar la dispersión y colonización del hemocele, optimiza la asimilación de nutrientes y a pesar de los esfuerzos del sistema inmune. Esta respuesta inmune puede ser humoral (fenoloxidasas, lectinas) y/o celular (fagocitosis, encapsulación).

Antes de que el hongo pueda proliferar en el hemocele, generalmente supera la respuesta inmune del insecto mediante la producción de toxinas. *B. bassiana* produce varios compuestos tóxicos que incluyen beauvericina, bassianolida y oosporeina y *M. anisopliae* produce varios depsipéptidos cíclicos llamados destruxinas, los cuales producen una inmunosupresión o una parálisis (Bradfish *et al.*, 1990). La muerte del insecto puede resultar de una combinación de acciones tales como son la falta de nutrientes, obstrucción física o la invasión de los órganos y toxicosis.

#### 4.4.3 Desarrollo del hongo

Después de cruzar la barrera que representa el integumento, el hongo se desarrolla en el hemocele en presencia de reacciones defensivas celulares, los

plasmocitos, poco es conocido acerca del reconocimiento del hongo por la respuesta inmune del insecto. Se ha sugerido que la fenoloxidasa, sin embargo, el principal mecanismo de defensa celular contra el hongo es la encapsulación de éste. La importancia de estos mecanismos, depende del hospedero y del patógeno. La morfología del proceso de infección ha sido bien estudiada, pero el proceso bioquímico y fisiológico que determina la susceptibilidad o resistencia, esta muy poco comprendido. Algunos entomopatógenos sintetizan metabolitos que actúan interfiriendo algún sistema metabólico del hospedero o bien, dañando directamente la permeabilidad celular. Uno de estos ejemplos más claros es la dextruxina sintetizada por *M. anisopliae*. Este tipo de metabolito puede afectar varios organelos, paraliza las células y causa disfunción en el intestino medio, túbulos de Malpighi, homocitos y tejido muscular (Samuels *et al.*, 1988). En el caso de *B. bassiana* o *Verticillium lecanii*, estos producen toxinas tipo depsipéptidos cíclicos como la beauvericina, las cuales erosionan el granuloma y permiten a las blastosporas invadir el hemocele. Sin embargo, el hospedero también puede sintetizar compuestos que inhiban el crecimiento del hongo, previniendo la infección letal.

Esta demostrada la actividad antibacteriana de “Cordicepin”, también en *Beauveria* “Oosporein”, un pigmento rojo responsable del cambio de color del cadáver, tiene actividad bactericida (Eyal *et al.*, 1994). La colonización de los diferentes órganos se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y traqueas.

La muerte del insecto marca el fin de la fase parasítica del hongo, pero el resultado letal de la enfermedad es solamente un aspecto de la infección, ya que se han observado disturbios secundarios en la fecundidad, sobrevivencia en diapausa y resistencia al frío en insectos que sobreviven a la infección (Tanada y Kaya, 1993).

#### 4.5 Enzimas extracelulares

Muchos patógenos pueden producir un espectro de enzimas degradadoras de cutícula, correspondientes a los diferentes polímeros de la cutícula de los insectos, proteína, quitina y lípidos (St Leger *et al.*, 1986; Charnley y St. Leger, 1991).

Cuando *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *V. lecanii* son crecidos en medios líquidos conteniendo cutícula, secretan secuencialmente esterases y enzimas proteolíticas (endoproteasa, aminopeptidasa y carboxipeptidasa) (<24 h), seguida de N-acetil glucosaminidasa y finalmente quitinasa y lipasa (3-5 días después). El orden de aparición de las enzimas se produce de acuerdo a los constituyentes solubilizados en el medio de cultivo. La quitinasa es una enzima inducible y en la cutícula la quitina se encuentra dentro de una matriz de proteína, por lo que la aparición de la quitinasa es el resultado de la inducción por quitina después de la degradación de las proteínas cuticulares. La detección de lipasa puede ser debido al hecho de que la enzima esta generalmente unida a la pared en cultivos jóvenes (St. Leger *et al.*, 1986 a, b y c).

La principal enzima producida por *M. anisopliae* in vitro durante la formación del apresorio es Pr1. Pr1 también tiene una buena actividad general de proteasa contra un amplio espectro de proteínas (caseína, elastina, albúmina de suero bovino, colágeno) y cutícula de insecto (St. Leger *et al.*, 1987 b). La unión de Pr1 a grupos de la cutícula cargados negativamente, esta ligada a su naturaleza básica. Después de la absorción, los sitios activos se ponen en contacto con uniones peptídicas susceptibles y entonces los péptidos solubilizados son posteriormente degradados hasta una cadena de alrededor de 5 péptidos.

Pr1 se produce alrededor de las 24 h, pero los niveles de producción de Pr1 pueden mejorarse suplementando los cultivos con cutícula de insecto u otros polímeros insolubles, en cantidad no suficiente para producir represión catabólica. La adición de metabolitos más fácilmente utilizables como por ejemplo glucosa o alanina reprimen la producción de la proteasa extracelular. Por lo tanto la producción de esta enzima es constitutiva pero reprimible (St. Leger *et al.*, 1988a). De manera similar la adición de metabolitos fácilmente utilizables durante el crecimiento de *M. anisopliae* sobre cutícula de insecto, previene la síntesis de Pr1 y por lo tanto la penetración del hongo. Es probable entonces que la falta de nutrientes sea una señal para el cambio de un modo de crecimiento saprofito a un modo de crecimiento patogénico después de que los nutrientes se han agotado en la cutícula del insecto.

#### 4.6 *Metarhizium anisopliae*

*M. anisopliae* es hasta ahora el hongo entomopatógeno mejor estudiado y varios factores de virulencia involucrados en el proceso de patogénesis han sido identificados (Clarkson y Charnley, 1996). Una proteasa tipo subtilisina, denominada PR1 ha sido clonada y caracterizada (St Leger *et al.*, 1992). PR1 es sintetizada como un precursor grande que contiene un péptido señal de 18 aminoácidos y un propéptido de 89 residuos y la proteína madura (28.6 kDa) contiene 281. La secuencia presenta similitudes considerables con otras enzimas de la clase subtilisina de las serino endoproteasas. En particular, los residuos de serina, histidina y aspártico que comprenden el sitio activo de estas proteasas se encuentran conservados en PR1. PR1 posee una amplia especificidad primaria por aminoácidos con un grupo lateral hidrofóbico en el segundo átomo de carbón (por ejemplo, fenilalanina, metionina y alanina), pero también posee una especificidad secundaria por cadenas peptídicas hidrofóbicas grandes con el sitio activo reconociendo al menos cinco subsitios. Esta no especificidad relativa puede ser causa de su actividad contra un gran número de proteínas (caseína, elastina, albúmina de suero bovino, colágeno) y cutícula de insecto (St. Leger *et al.*, 1987 b). Para *M. anisopliae*, parece ser que PR1 es factor determinante en la patogénesis en virtud de su habilidad de degradar la cutícula y su producción a niveles altos por el patógeno in situ durante la infección. (St Leger *et al.*, 1987). Además, la adición de múltiples copias de *pr1* bajo el control de un promotor constitutivo incrementa la virulencia de las transformantes (St Leger *et al.*, 1996). El mecanismo de degradación de la cutícula por PR1 de *M. anisopliae* fue sugerido como sigue (St Leger *et al.*, 1987):

- 1) PR1 se absorbe en la cutícula vía fuerzas electrostáticas no específicas
- 2) El sitio activo se pone en contacto con cualquier parte de una proteína cuticular y bajo las condiciones apropiadas, por ejemplo, temperatura, corta péptidos susceptibles lo cual libera a proteínas cuticulares
- 3) Las proteínas solubilizadas son posteriormente degradadas hasta que el largo de cadena se de alrededor de 5 residuos).

Además de PR1, otras endoproteasas, proteasa con actividad tipo tripsina (PR2), ha sido caracterizada también de *M. anisopliae*, pero su papel no está claro (St Leger, 1996).

#### 4.7 Mecanismo de defensa del insecto

La defensa celular y humoral que poseen los insectos contra heridas u organismos invasores, consiste principalmente en reconocimiento, agregación de hemocitos, formación de nódulos, fagocitosis y melanización ó lisis de las células invasoras (Gupta, 1986; Hung *et al.*, 1993).

Los hemocitos, fenoloxidasas, quinonas y opsoninas, participan en el reconocimiento de las heridas y defensa contra organismos invasores (Gunnarsson, 1988; Pendland *et al.*, 1988; Schmit *et al.*, 1977). Cuando la cutícula del insecto sufre daño, los hemocitos comienzan a acumularse y a agregarse dentro y alrededor de la herida, penetran la membrana celular cambiando la apariencia de las células (Gunnarsson, 1988). La defensa celular del insecto huésped, dependerá de la capacidad de los hemocitos para encapsular las esporas del hongo (Schmit *et al.*, 1977; Huxam *et al.*, 1989b). Los granulocitos, la clase más abundante de hemocitos, fagocitan al hongo y posteriormente, los plasmocitos forman un pseudotejido en capas concéntricas, para originar un granuloma que posteriormente es melanizado, y el hongo puede sufrir lisis (Hajek y St. Leger, 1994).

Un componente importante del sistema de defensa interna del insecto es la fenoloxidasa, que además del reconocimiento, participa en la melanización de sitios dañados en la cutícula y de células invasoras (Schmit *et al.*, 1977). Dicha enzima está presente en los hemocitos como profenoloxidasa y en su activación en cascada intervienen componentes de la pared celular del hongo como peptidoglicano, beta-1,3-glucano, lipopolisacáridos y laminarinas (Marmaras *et al.*, 1996; Soderhall y Smith, 1986) ó activadores endógenos como serinas-proteasas de las células invasoras (Saul y Sugumaran, 1987). Sin embargo, las células micopatógenas pueden superar la defensa del insecto mediante estrategias como: tolerancia al sistema de defensa, neutralidad a hemocitos o enmascaramiento por proteínas del insecto

huésped (Hung y Boucias, 1992; Hung *et al.*, 1993), y producción de metabolitos secundarios como destruxinas, bauvericinas y enantinas que suprimen dicho sistema de defensa, disminuyendo la formación de agregados hemocíticos alrededor de las células del hongo (Huxman *et al.*, 1989a). Una vez que la infección progresa, la concentración de granulocitos se reduce y el huésped es incapaz de formar granulomas en cantidad suficiente, entonces el hongo supera la encapsulación y continúa creciendo y proliferando (Hung y Boucias, 1992).

#### 4.8 Factores que afectan la actividad de *Beauveria bassiana*

La virulencia de cualquier microorganismo entomopatógeno, depende principalmente de tres condiciones: 1) el huésped, 2) el patógeno y 3) el ambiente en que ocurre la relación huésped-patógeno.

##### 4.8.1 El huésped

Del huésped influyen su naturaleza genética, estadio de desarrollo, estado nutricional y de salud y los hábitos alimenticios del insecto (Sánchez, 1996). La susceptibilidad de un insecto plaga para ser atacado, depende del estadio de desarrollo en que se encuentra, ya que todos los microorganismos patógenos pueden atacar los diferentes estadios de desarrollo, pero no lo hacen con la misma virulencia; así, algunos géneros de hongos entomopatógenos, en los que se incluye el género *Beauveria* puede presentar mayor eficacia para el control de los primeros estadios larvales de muchos géneros del orden Coleóptero.

En cuanto al estado nutricional y de salud del insecto, así como los hábitos alimenticios, serán más susceptibles al ataque de microorganismos patógenos, aquellos insectos que se encuentran bajo estrés, por ejemplo, debilitados por otros patógenos o con baja calidad en la alimentación (Tanada, 1993)

#### 4.8.2 El patógeno

Del patógeno influyen su naturaleza genética, la cantidad de ingrediente activo presente, así como su vigor. De la misma manera en que el huésped solo puede ser atacado por ciertas cepas de patógenos, estos a su vez, solo pueden atacar a ciertos tipos de insectos (Sánchez, 1996).

De esta forma *B. bassiana*, ataca *Hypothenemus hempei* en cafeto, mosquitas blancas y áfidos en hortalizas, bruquidos del frijol en granos almacenados. (Hernández, 1997).

#### 4.8.3 Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales particularmente temperatura, humedad relativa y luz solar, además del movimiento del aire son muy importantes en la infección y esporulación de hongos entomopatógenos.

Los requerimientos de temperatura varían con la especie de hongo y el nicho ecológico. Los deuteromicetos encontrados en áreas tropicales y subtropicales tienen una temperatura óptima de germinación sobre los 25°C; la rapidez del desarrollo micelial y evolución de la infección también dependen de la temperatura. Para *B. bassiana* la temperatura óptima se encuentra sobre los 25°C.

La radiación solar puede actuar sobre la germinación de los conidios o sobre los estados iniciales del crecimiento del tubo germinativo; así se ha demostrado que los rayos ultravioleta tienen el mayor efecto negativo sobre conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, entre otros (Hernández, 1996).

#### 4.9 Producción de hongos entomopatógenos

La producción de hongos entomopatógenos, como en el caso de *B. bassiana*, se ha realizado durante varios años en cultivo semisólido con resultados de patogenicidad satisfactorios, pero con bajos rendimientos de producción; por lo que,

su uso y aplicación como insecticida biológico, se encuentra limitado a la capacidad de propagación del microorganismo en un cultivo sumergido que proporcione la alternativa de escalarlo a un proceso industrial, con altos rendimientos de producción pero sin alterar su capacidad patogénica, esta última, se ve afectada notablemente cuando el hongo se propaga en medio de cultivo líquido.

En función de la forma de propagación de hongos entomopatógenos, se pueden obtener diferentes tipos de productos; masa micelial dispersa, agregados miceliales en forma de esférulas, blastosporas, conidios aéreos y conidios en cultivos sumergidos semejantes a los conidios aéreos. Las formas infectivas de los hongos entomopatógenos son las blastosporas y los conidios. El micelio que no es infectivo, se utiliza en el control de algunas plagas, para que con la humedad ambiental forme conidios aéreos. La producción de conidios puede hacerse en medio sólido, líquido y empleando un sistema mixto (Hernández-Velázquez, 1996).

Con la propagación en medio sólido se obtienen conidios aéreos, generalmente en granos de cereal precocido (arroz, trigo, salvado). Los hongos también pueden ser propagados en medios líquidos que contengan una fuente de carbono y sales orgánicas, en fermentadores de 1 hasta 300 ó 500 litros; en estos medios, crecen formando micelio que genera blastosporas. Una ventaja del uso de medios líquidos es que estos involucran una tecnología de propagación del hongo en tanques agitados que es bien conocida en la industria farmacéutica, y este conocimiento puede ser aplicado a la producción de blastosporas de hongos entomopatógenos (Humphreys *et al.*, 1990).

#### 4.10 Ingeniería Genética de Hongos Entomopatógenos

La propagación del uso de hongos como agentes de control biológico dependerá de las mejoras de las cepas silvestres, combinando características de diferentes cepas y mutantes. Se pueden considerar dos tipos de mejoras

- 1) Mejorando la eficacia del bioinsecticida, por ejemplo, reduciendo la dosis necesaria para matar insectos, reduciendo el tiempo de muerte del insecto



o disminuyendo el daño a los cultivos por la reducción del tiempo de alimentación.

- 2) Expandingo el rango de hospederos. El completo entendimiento del proceso de patogénesis es esencial para el desarrollo de cepas hipervirulentas

La biología molecular provee las herramientas necesarias para elucidar los mecanismos de patogénesis y para en un futuro, producir organismos recombinantes con características nuevas. Algunos esfuerzos para lograr estos objetivos se han realizado con *M. anisopliae* y en mucho menos nivel con *B. bassiana* (Hegedus, 1991). Han sido establecidos los sistemas de transformación genética *in vitro* e *in vivo*, los cuales son una parte esencial de la investigación moderna de hongos, y son necesarios para la manipulación experimental de genes de virulencia (Goettel y St Leger, 1990). El éxito en el uso de estos procedimientos, depende de la disponibilidad de marcadores de transformación seleccionables. Las técnicas de transformación han sido utilizadas para aislar genes patógenos específicos, investigar determinantes de virulencia *M. anisopliae*, y para producir cepas con más alta virulencia.

#### 4.11 Mutagénesis

La definición que dio De Vries de la mutación era la de cualquier cambio heredable en el material hereditario que no se puede explicar mediante segregación o recombinación.

Por otra parte, la definición de mutación a partir del conocimiento de que el material hereditario es el ADN y de la propuesta de la Doble Hélice para explicar la estructura del material hereditario, sería que una mutación es cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN.

La mutación es la fuente primaria de variabilidad genética en las poblaciones, mientras que la recombinación al crear nuevas combinaciones a partir de las generadas por la mutación, es la fuente secundaria de variabilidad genética. Una

mutación puede comprender la sustitución de un solo par de bases, la delación o la inserción de uno o de más pares de bases, o puede constituir una alteración importante de la estructura de un cromosoma.

Las mutaciones suelen producirse dentro de las regiones de un gen que codifica la proteína y en regiones externas a los genes que afectan su expresión, o en otros sitios del DNA. Por lo cual, las mutaciones pueden acarrear un cambio fenotípico que puede ser detectable o no. Debido a la gran variedad de tipos y efectos de las mutaciones, estas se han clasificado de diversas formas.

1) **Mutaciones al azar**, estas pueden ser espontáneas; si se producen de manera natural y se supone, en general, que son debidas a cambios aleatorios de la secuencia nucleotídica de los genes. O inducidas, cuando se utiliza algún agente físico (radiaciones, luz ultravioleta) o químico (análogos de bases, agentes que reaccionen con el DNA, agentes intercalantes) que pueden inducir mutaciones.

2) **Mutaciones dirigidas**. El objetivo de la mutagénesis dirigida es modificar una proteína al cambiar un residuo aminoacídico por otro, al eliminar una parte, o añadir otra. El punto inicial es tener el gen que codifica para la proteína de interés en un vector. El desarrollo de la tecnología génica ha conducido a nuevos métodos revolucionarios que hacen posible aislar mutantes de genes específicos de interés (Shortle *et al.*, 1981; Winnacker, 1985; Old y Primrose, 1985; Saunders y Saunders, 1987).

#### 4.12 Mutagénesis en hongos

En hongos entomopatógenos se ha utilizado a la mutagénesis como un medio para definir los factores que afectan la patogenicidad (Al-Aidroos y Roberts, 1976; Smith y Grula, 1983; El-Sayed *et al.*, 1989). El mutágeno más utilizado en hongos es la luz ultravioleta (UV), la cual causa mutaciones puntuales el tipo más frecuente de fuente de radiación UV que se usa para mutagénesis es la lámpara microbicida que emite grandes dosis de radiación UV en la región de 260 nm. Se suele utilizar una

dosis de radiación UV que produzca un 90% - 95% de muerte en la población buscándose posteriormente, entre los supervivientes, los mutantes; aunque también se han empleado otros agentes como el etano-metano-sulfonato (St. Leger *et al.*, 1993). También, la modificación genética en hongos puede realizarse mediante el aislamiento, fusión y transformación y regeneración de protoplastos (Pendland y Boucias, 1984; Messias *et al.*, 1986; Shimizu y Hayata, 1990; Pfeifer y Khachatourians, 1992).

#### 4.13 Proteasas

Las proteasa son la única clase de enzimas que ocupan una posición importante con respecto a su aplicación en los campos comercial y biológico. Las enzimas proteolíticas catalizan el rompimiento de los enlaces peptídicos en otras proteínas, son enzimas degradativas las cuales catalizan la hidrólisis total de proteínas y representan uno de los tres grupos más grandes de enzimas industriales y cuentan con alrededor de un 60% de la venta mundial de enzimas. Los microorganismos representan una excelente fuente de enzimas, estas representan el 40% de la venta mundial de enzimas (Godfrey y West, 1996).

##### 4.13.1 Proteasas de origen microbiano

Los microorganismos representan una excelente fuente de enzimas debido a su gran diversidad bioquímica y su susceptibilidad a la manipulación genética. Las proteasas microbianas representan aproximadamente el 40% de la venta total de enzimas en el mundo (Rao *et al.*, 1998).

##### 4.13.1.1 Bacterias

Las proteasas más comerciales son producidas por microorganismos alrededor del género *Bacillus*. Las proteasas neutras de bacterias son activas en un rango de pH de 5.0 a 8.0 y tienen relativamente baja tolerancia. Debido a su

intermediario rango de reacción, las proteasas neutras generan menos amargor en comidas hidrolizadas, que las proteínas animales. Las proteasas neutras de origen bacteriano están caracterizadas por su alta afinidad por aminoácidos hidrofóbicos. Su termotolerancia es una ventaja para controlar su reactividad durante la producción de hidrolizados alimenticios con bajo grado de hidrólisis.

Las proteasas alcalinas se caracterizan por su alta actividad a pH alcalino. Su temperatura óptima es alrededor de los 60 °C. Estas propiedades de las proteasas bacterianas alcalinas las hacen apropiadas para su uso en la industria de detergentes.

#### 4.13.1.2 Hongos

Los hongos elaboran una gran variedad de enzimas que las bacterias. Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* produce proteasas ácidas, básicas y neutras. Las proteasas fúngicas son activas en un amplio rango de pH 4.0 a 11.0; y exhiben una amplia especificidad de sustrato. Sin embargo, tienen menos rango de reacción y menos tolerancia al calor que las enzimas bacterianas. Las enzimas fúngicas se pueden producir convenientemente en una fermentación en estado sólido. Las proteasas ácidas tienen un pH óptimo entre 4.0 y 4.5 y son estables entre 2.5 y 6.0.

Son particularmente útiles en industria quesera debido a sus especificaciones de pH y temperatura. Las proteasas neutras son metaloproteasas activas a pH 7.0 y son inhibidas por agentes quelantes. Las proteasas alcalinas se usan en la industria de transformación de alimentos.

#### 4.13.1.3 Virus

Las proteasas virales han ganado importancia debido a su papel en el proceso de cuasar ciertas enfermedades como SIDA y cáncer. Serin, aspártico, y cistein peptidasas se encuentran en varios virus.

A pesar de que las proteasas están dispersas en la naturaleza, los microbios sirven de fuente principal por su rápido crecimiento, su limitado espacio requerido para el cultivo y la facilidad con la que se pueden manipular genéticamente para

generar nuevas enzimas con propiedades alteradas que son deseables para distintas aplicaciones (Rao *et al.*, 1998).

#### 4.14 Clasificación de las proteasas

De acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas están clasificadas en el subgrupo 4 del grupo 3 (hidrolasas). Las proteasas se clasifican en base a tres criterios principales (Barett, 1994):

1. El tipo de reacción que catalizan
2. La naturaleza química del sitio catalítico y
3. La relación de evolución con respecto a su estructura.

Son divididas a su vez en dos grandes subgrupos: exopeptidasas y Endopeptidasas. Las exopeptidasas actúan en los enlaces peptídicos en las regiones cercanas a los grupos amino y carboxilo terminales del sustrato, mientras que las endopeptidasas lo hacen en la región de la cadena polipeptídica lejos de los N y C terminales del sustrato. Basado en el grupo funcional presente en el sitio activo, las proteasas se dividen en cuatro grupos principales (Hartley, 1960):

1. Proteasas séricas
2. Proteasas aspárticas
3. Cistein proteasas
4. Metaloproteasas

Los mecanismos de acción de las proteasas han sido de gran interés para los investigadores. La purificación de estas enzimas es un pre-requisito para estudiar su mecanismo de acción. Un gran número de procedimientos de purificación para proteasas han sido bien documentados, estos involucran cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y técnicas de filtración en gel (Phadarate *et al.*, 1992).

Las proteasas secretadas (más de 100; Cox y Wills, 1987), durante las primeras etapas de penetración (Bidochka y Khachatourians, 1990), son consideradas

como el factor de virulencia más importante debido a que la proteína es el constituyente más abundante de la cutícula (61-70%) (Hepburn, 1985; Bidochka, 1989) además de que se encuentra rodeando las microfibrillas de quitina (Blackwell y Weih, 1980). Samsinakova *et al.*, (1971), mostraron que las quitinasas eran efectivas contra la cutícula de larvas de *Galleria mellonella* solamente si se aplicaban después que las proteasas, de manera similar, Smith y col (1981), demostraron que la hidrólisis completa de la cutícula de larvas de *Heliothis zea*, con preparaciones comerciales, fue lograda con una secuencia de proteasas seguida de quitinasas.

Los organismos entomopatógenos poseen mecanismos para suprimir o evitar las respuestas inmunes dentro del insecto, infectando y produciendo enzimas, las cuales ayudan a extraer nutrientes del cuerpo del insecto. Los hongos entomopatógenos utilizan enzimas proteolíticas, las cuales les permiten infectar hospederos susceptibles directamente vía el exoesqueleto, mientras que las proteasas digieren las proteínas de la cutícula (Clarkson y Charnley, 1996). Las proteasas extracelulares producidas por *B. bassiana* o *M. anisopliae*, parecen participar en la supresión de la respuesta inmune celular dentro de la hemolinfa de larvas infectadas de *Galleria mellonella* (Griesch y Vilcinskis, 1998)

#### 4.15 Regulación enzimática

Las proteasas son un grupo complejo de enzimas que difieren en sus propiedades como especificidad de sustrato, sitio activo y mecanismo catalítico, pH y sustrato. Las diferentes aplicaciones para las proteasas requieren pH específicos y óptimos para su mejor rendimiento. Las propiedades necesarias para su aplicación industrial difieren de sus propiedades fisiológicas. A pesar de los muchos estudios sobre proteasas, relativamente es muy poco lo que se sabe acerca de los factores que controlan sus especificaciones de sustratos no fisiológicos

Los hongos entomopatógenos, al invadir al hospedero, comienzan a producir una serie de enzimas para lograr la infección. La degradación de la cutícula del hospedero puede resultar de enzimas extracelulares o similares, que actúan sobre la pared celular del insecto.

Hüber (1958), estudió a *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Cordyceps militaris* y reportó la producción de quitinasas y proteasas en sus fluidos extracelulares. Gabriel (1968) también reportó que *E. epiculata*, *E. thaxteriana*, *E. virulenta* y cuatro cepas de *E. coronata* producían quitinasas, lipasas y proteasas en respuesta a sustancias inductoras adicionadas al medio. Enzimas extracelulares producidas por hongos entomopatógenos como lo son proteasas, quitinasas y lipasas son correspondientes a los constituyente principales de la cutícula de los insectos, por ejemplo proteínas, quitina y lípidos, han sido detectadas en distintos hongos, entre ellos *B. bassiana*. (St Leger 1986).

Leopold y Samsinakova (1970) cuantificaron la producción de quitinasas de *B. bassiana*, que también produce lipasas y proteasas. Primero observaron un fenómeno común, la producción de quitinasa no siempre era correlacionado a la virulencia. Esto se comprueba con los trabajos de Smith *et al.*, (1981), que preparó exoesqueletos limpios de larvas de *Heliothis zea*. Los análisis químicos mostraron que los exoesqueletos tenían quitina agrupada en capas proteicas. No había hoyos por donde pudieran pasar las hifas del hongo, esto se observó mediante SEM. Los hoyos aparecieron después de tratar los exoesqueletos con proteasas y después con quitinasas, y no viceversa, lo que sugiere que ese es el orden natural de aparición de las enzimas al momento de invadir al insecto.

Bidochka y Khachatourians (1990) también concluyen que la producción de proteasas es un factor de virulencia, al demostrar que la ésta se produce en las primeras fases de la infección, en un estudio de *B. bassiana* contra un chapulín (*Melanoplus sanguinipes*)

Después se continuó con trabajos en los que se comenzó la caracterización de las enzimas. Kucera (1981) aisló dos proteasas, P1 (proteasa tipo serina con masa de 35 kDa, pH óptimo de 7.25) y P2 (enzima tipo SH con masa de 71 kDa, pH óptimo 9.0), que determinó tóxica por su efecto en *G. mellonella*.

St. Leger, en 1986, reportó una serie de investigaciones sobre la naturaleza de las enzimas secretadas por hongos y su rol en el proceso de infección. *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *V. lacanii* fueron crecidas en un medio con cutícula, lo que terminaba con

la producción de enzimas, es decir, eran inducibles. Por ejemplo, según Smith y Grula (1983), la quitinasa es una enzima inducible en *B. bassiana*, ya que observaron que con N-acetilglucosamina, glucosamina libre y quitobiosa, existía una inducción en cuanto producción de quitinasa se refiere. De ahí surgió la importancia de entender el mecanismo de regulación de las proteínas, al relacionarlo con los mecanismos de infección.

Existen diferentes parámetros que regulan la producción de enzimas de los microorganismos, por ejemplo el pH y la disponibilidad de nutrientes. En el caso de los hongos estos factores son muy importantes, por no decir prescindibles.

Genes identificados de *Aspergillus nidulans* regulados por ambientes de pH pueden ser clasificados en tres categorías: aquellos que codifican enzimas secretadas, los que codifican permeasas y aquellos involucrados en la síntesis de metabolitos de exportación.

Muchos microorganismos, particularmente sí pueden crecer en distintos valores de pH, expresan genes de acuerdo al pH de su entorno. Los genes cuya expresión parece estar influenciada por el pH incluyen aquellos involucrados en la provisión de enzimas de secreción, permeasas y metabolitos de exportación. (Arst y Peñalva, 2002)

Los genes regulados por pH que codifican enzimas de secreción incluyen a *pacA* que codifica para fosfatasa ácida (Caddick y Arst, 1986), *xlnB* codifica xylanasa (MacCabe *et al.*, 1998), *abfB* de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (Gielkens *et al.*, 1999), y otros más, que preferentemente se expresan bajo condiciones ácidas. Otro gen es, por ejemplo, *priA* que codifica una proteasa alcalina, que se expresa de preferencia en condiciones de medio alcalino (MacCabe *et al.*, 1998).

En cuanto al medio de crecimiento, es bien conocido que el amonio es preferido como fuente de nitrógeno para *Saccharomyces cerevisiae*, dando un crecimiento más rápido que, por ejemplo, prolina o urea, y que los componentes del metabolismo del nitrógeno están regulados a nivel de expresión genética y actividad enzimática (Magasanik, 1992).



Si la concentración de amonio es un regulador, esto puede implicar que *Saccharomyces cerevisiae* tiene un sensor de amonio (Dever *et al.*, 1992).

Estudios en *Colleotrichum truncatum* muestran que la concentración de carbono y la proporción de nitrógeno y carbono son importantes factores nutricionales que regulan la esporulación del hongo en cultivo sumergido (Jackson y Bothast, 1990).

En 1986 St. Leger *et al.*, reportaron una serie de investigaciones de la naturaleza de las enzimas secretadas por hongos y su papel en el proceso infectivo. *M. anisopliae*, *B. bassiana*, y *V. lecanii* fueron cultivados en medio con cutícula lavada. La atención se enfocó en un aislado de *M. anisopliae* que produjo una endoproteasa, quitinasa y N-acetil-D-glucosaminidasa.

Trabajos con *B. bassiana* demuestran que la síntesis de proteasas esta regulada por un circuito multirregulatorio en donde ciertas fuentes de carbono junto con amonio reprimen la síntesis de proteasas (Bidochka y Khachatourians, 1988). Investigaciones después, se observó que N-acetil glucosalina, un componente importante de la cutícula del insecto, también reprimía la síntesis (Bidochka y Khachatourians, 1988).

Ulhoa y Peberdy en 1991, demostraron que la formación inductiva de quitinasas en micelio lavado de *Trichoderma harzianum* se veía afectada notablemente por la adición de glucosa o N-acetilglucosamina, lo que sugiere que una represión catabólica esta envuelta en la regulación de la síntesis de quitinasa. En otro estudio, Kucera y Samsinakova (1968) reportaron proteasas de alto y bajo peso molecular producidas por una cepa de *Beauveria bassiana*. Estas proteasas fueron tóxicas cuando fueron inyectadas en insectos. Además, se demostró que la producción de éstas proteasas se veía influenciada por el tipo de fuente de nitrógeno.

En *Aspergillus nidulans* la producción de proteasas extracelulares está sujeta al menos a 4 mecanismos regulatorios: carbón, nitrógeno, y represión de metabolitos de sulfuros y control de pH. Un quinto mecanismo de regulación es inducción por una proteína exógena, presente en *Aspergillus Niger* (Jarai y Buxton 1994).

Con los antecedentes descritos, algunos autores proponen el modelo del operón *lac* como explicación a la regulación enzimática de las proteasas producidas por los hongos. El operón está formado por los genes estructurales *Z*, *Y* y *A*, y por las secuencias adyacentes de ADN conocidas como *región operadora*. El gen *LacI* produce una molécula represora que regula la transcripción de los genes estructurales.

El funcionamiento de este operón depende de la presencia o ausencia de lactosa en el medio. Cuando este azúcar no está presente en el medio, se produce la molécula represora y se une al operador del operón, por lo que se bloquea la transcripción de los genes estructurales ya que la polimerasa no puede avanzar; no se producen enzimas. Por el contrario, de haber lactosa presente, el sitio de unión de la molécula represora se altera cuando se une a la lactosa, el operador queda libre y entonces la polimerasa tiene la vía libre para iniciar la transcripción.

Cuando hay glucosa, interviene la proteína activadora por catabolito (CAP). La represión por catabolito es el reflejo de la mayor facilidad de metabolizar la glucosa que la lactosa. Las células “prefieren” la glucosa, y si esta presente, no activan el operón *lac*, aún cuando también dispongan de lactosa. Cuando no hay glucosa, CAP ejerce un control positivo uniéndose al sitio de unión de CAP, lo que facilita que la RNA polimerasa se una al promotor y en consecuencia, inicie la transcripción. Para que la transcripción sea máxima, el represor debe estar unido a la lactosa (para que no reprima la expresión del operón), y CAP debe estar unido al sitio de unión de CAP.

En presencia de glucosa, CAP no puede unirse eficientemente a su sitio de unión porque no sufre su cambio conformacional, y entonces no se estimula la transcripción.

## 5.- MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Cepa y conservación

La cepa *Beauveria bassiana* BbCh1, considerada como paterna, fue proporcionada por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Tecomán, Colima (Tabla 2). La cepa paterna fue cultivada y conservada en medio YPD y en YPD con aceite mineral, y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

La composición de los medios de cultivo, así como la forma de preparación de las diferentes soluciones y Buffers, se muestran en los apéndices A y B, respectivamente.

**TABLA 2**

Información general del microorganismo utilizado

Clave	Patógeno	Huésped	Cultivo	Origen
BbCh1	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Brachystola magna</i>	Maiz	Durango

### 5.2 Ensayo mutagénesis: Determinación del tiempo de exposición

La mutagénesis fue realizada con una lámpara marca UVP, modelo UVG, longitud de onda de 254 nm. El primer parámetro medible fue el tiempo de exposición. Los ensayos fueron realizados a diferentes tiempos con una distancia constante de 10 cm. Para determinar el mejor tiempo, medimos la viabilidad celular después de cada ensayo. En breve: Preparar una suspensión de  $1 \times 10^7$ , preparado a partir de un cultivo de 15 días de edad, 10 ml de esta suspensión fueron irradiados con luz UV durante diferentes tiempos exposición 0, 2 4, 6, 8 y 10 min. Posteriormente, las esporas irradiadas, fueron inoculadas cultivadas en medio de agar

YPD (St. Leger *et al.*, 1999), e incubadas durante siete días a 30 °C en oscuridad, al término de este tiempo las colonias crecidas fueron contadas para así seleccionar el tiempo de exposición. El criterio de selección del tiempo fue considerando aquel al cual se redujo la viabilidad en un 60-70%.

### 5.3 Detección y selección de mutantes

Una vez seleccionado el mejor tiempo de exposición, una suspensión de 4 ml ( $1 \times 10^7$  esporas / ml) fueron irradiados, inoculados en AC e incubada por 7 días a 28°C en la oscuridad. Las cepas mutantes fueron seleccionadas por el tamaño de halo de hidrólisis, formación de zonas claras alrededor de la colonia y sembradas nuevamente en agar caseína y agar YPD.

### 5.4 Estabilidad de las cepas mutantes

Para probar la estabilidad de las cepas mutantes, éstas fueron cultivadas en forma sucesiva y alternada durante seis subcultivos en agar YPD y en AC, durante dichos cultivos, el halo de hidrólisis de las cepas fue verificado.

### 5.6 Obtención de cultivo monoespora

La obtención de cultivos monoespora a partir de la cepa paterna y de las cepas mutantes, fue realizada, con algunas modificaciones a la metodología desarrollada por Veen (1967), de la siguiente manera: En puntos previamente marcados en el exterior de la caja Petri conteniendo agar YPD se depositaron 2 µl de una suspensión de  $1 \times 10^4$  esporas/ml. Posteriormente la cantidad de esporas por punto y su germinación a las 12 h, fue determinado bajo microscopio de contraste de fases (10 X), remarcando aquellos puntos con una sola espora. Las fracciones de agar YPD junto con la espora germinada, fueron colocadas en diferentes cajas Petri con el mismo medio de cultivo, para su crecimiento a 26 °C., con la ayuda de una micropipeta con puntilla (1 ml) recortada y estéril.

### 5.6 Determinación de proteína.

La determinación de proteína soluble fue realizada con el método de Bradford (Bradford, 1976), con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

### 5.7 Inducción de la actividad enzimática.

Para la inducción de la síntesis de las enzimas proteasas, las cepas paterna y mutantes de *B. bassiana* fueron inoculadas al 5% con una suspensión de esporas ( $10^7$  esporas/ml) en caldo YPD durante 72 h. Posteriormente el micelio resultante de 20 ml, filtrado a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y lavado dos veces con agua bidestilada estéril, fue transferido a matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de Medio mínimo de sales (MMS). El medio mínimo de sales consiste de gelatina al 1% (w/v) en medio mínimo de sales (pH 7.0), (Bidochka, 1987) y los cuales fueron incubados a 180 rpm y 28°C tomando una muestra cada 24 horas. Después de cuatro días de crecimiento, los cultivos fueron filtrados a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y los sobrenadantes almacenados a -20°C hasta su análisis.

### 5.8 Determinación de actividad general de proteasa

Las enzimas proteolíticas fueron obtenidas del medio MMS. La actividad enzimática fue determinada de la manera siguiente: 120  $\mu\text{l}$  de enzima se agregan a 480  $\mu\text{l}$  de azocaseína (1% p/v) en buffer Tris 25 mM con  $\text{MgCl}_2$  (concentración final 5 mM), la mezcla incubada a 30 °C por 30 minutos. La reacción fue detenida al adicionar 600  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético 10% (v/p) e incubar 30 min en hielo. Los tubos fueron centrifugados 10 min a 15 000 g / 4°C. El sobrenadante, 800  $\mu\text{l}$ , fueron neutralizados con 200  $\mu\text{l}$  de NaOH 1.8 N. La absorbancia fue leída a 420 nm. Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad que da un incremento en  $A_{420}$  de 0.01 en 30 minutos a 30°C (Secades y Guijarro, 1999).

### 5.9 Zimogramas.

El perfil de proteasas de las cepas mutante y paterna, fue determinado en geles de poliacrilamida al 10.0% y separadas a 4°C con el sistema de buffer descrito por Laemmli (1970). El gel fue incubado en una solución de caseína al 1.0% (p/v) en buffer Tris 0.1 M por 2 h a 4 °C. Después, lavado dos veces con agua bidestilada y con buffer Tris 0.1 M, e incubado por 2 h a 30 °C. La actividad de proteasa (zonas claras) fue revelada en los geles tiñéndolos con azul brillante de Coomasie. La cantidad de proteína total de los geles ajustada a 3 µg.

### 5.10 Actividad enzimática en soporte.

La producción y tipo de actividad proteolítica de las cepas mutante y paterna fue determinada mediante la utilización de los sustratos sintéticos (SIGMA): *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide (SAAPPpNA, actividad tipo quimiotripsina), *N*-benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BApNA, actividad tipo tripsina) y *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu *p*-nitroanilide (SAAPLpNA, actividad tipo elastasa); utilizando la técnica descrita en literatura (Vinokurov *et al.*, 2005), en la que se utiliza membrana de nitrocelulosa como soporte.

El procedimiento consiste en lo siguiente: Saturar la membrana de nitrocelulosa en buffer PBS 1X durante 15 min y dejar secar. Incubar con el sustrato 30 °C/3h en agitación a 100 rpm. Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 10%, después de esto, incubado con la membrana por 2h/ 30 °C. Para revelar la actividad enzimática (diazociar), agregar nitrato de sodio (0.1% en HCl 1N). Agitar 5 min, y enjuagar con agua bidestilada. Adicionar suficiente (30-40 ml) de sulfamato de amonio (0.5% en HCl 1N) e incubar 5 min en agitación. Enjuagar con agua bidestilada. Finalmente, agregar solución de N-(1-naphthyl) ethylenediamine (0.05% en alcohol etílico al 50%) y esperar aparición de color, indicativo de hidrólisis de los sustratos.

### 5.11 Ensayos de inhibición enzimática en soporte

Para el ensayo de inhibición enzimática se partió de el hecho de que todas las proteasas degradadoras de cutícula producidas por *B. bassiana* reportadas pertenecen a las serino proteasas, por lo que se utilizó un inhibidor de esta clase de enzimas como lo es el Fluoruro de Fenil Sulfonil Metano (PMSF).

El protocolo es el siguiente: Antes de la electroforesis en gel de poliacrilamida (8%), incubar las muestras con el inhibidor de serino proteasas PMSF (concentración final 3M; SIGMA) por 15 min. Después de la electroforesis, transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa, previamente saturada con el sustrato, para después incubarla y revelar la actividad de la misma manera que para el ensayo de determinación de actividad enzimática en soporte sólido.

### 5.12 Estudios de Inducción-Represión de la producción de proteasas

#### 5.12.1 Cinéticas de crecimiento

Se realizaron cinéticas con cuatro medios diferentes: YPD (extracto de levadura 3g/l, peptona 10 g/l, glucosa 20 g/l), medio no inductor (Bidochka, 1987), medio inductor y como medio represor el reportado según Bidochka en 1987, con adición de gelatina al 1%. Cada cinética se realizó por triplicado. Se utilizaron 20 matraces de 250 ml por cinética, en agitación constante a 180 rpm, 30 °C. Las muestras fueron tomadas a las 0, 4, 8 y 12 h, después cada 24 h, hasta la obtener dos valores iguales en el peso seco (fase estacionaria de crecimiento del microorganismo). La medición de pH se realizó de manera convencional. La cuantificación de esporas se realizó en cámara de Neubauer con la técnica de conteo de eritrocitos (Catwell y Cantelo 1979)

### 5.12.2 Determinación de peso seco:

La determinación de peso seco fue realizada filtrando los sobrenadantes y micelio de los cultivos, con filtro Whatman No. 2. La biomasa se estima por medio del peso seco del micelio, sometiendo la muestra a secado a 80 °C, durante 24 h y la muestra se pesa en una balanza analítica

### 5.12.3 Determinación de azúcares reductores.

La concentración de glucosa se estimó usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores (Miller, 1959). Procedimiento: Se prepara un estándar de glucosa para curva de calibración. Se coloca 1 ml de muestra en un tubo de ensayo y se le añade 1 ml de DNS. Se pone a baño maría 5 min. Enfriar en hielo. Agregar 2 ml de agua bidestilada fría y agitar en vórtex. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

### 5.13 Identificación del tipo de proteasas por PCR

#### 5.13.1 Extracción de DNA

Con el fin de determinar el tipo de proteasa presente tanto en la cepa paterna como en las mutantes, realizar extracciones de DNA, de la siguiente manera.

Inocular las cepas paterna y mutantes de *B. bassiana* ( $10^7$  esporas) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo YPD, los cuales fueron incubados a 180 rpm y 28°C por 3 días. Las extracciones de DNA fueron realizadas mediante la metodología reportada por Cenis (1992), la cual consiste en lo siguiente: Lavar dos veces el micelio resultante de 3 ml de medio de cultivo con buffer TE, pH 8.0 (Tris 10 mM y EDTA 1 mM), posteriormente macerar por algunos minutos y agregar el buffer de extracción (Tris, 200 mM; NaCl, 250 mM; EDTA, 25 mM y SDS 5.0%), macerar por otro minuto mas y agregar 30 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. incubar a -20°C por 10 min, centrifugar 5 min a 14



rpm, para luego transferir el sobrenadante a tubos nuevos y agregar un volumen igual de isopropanol. Precipitar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ , centrifugar 5 min a 14000 rpm, decantar el sobrenadante y lavar con etanol al 70%, centrifugar nuevamente y dejar secar el DNA en una campana de bioseguridad por 20 min, resuspender en agua bidestilada y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La integridad del DNA fue verificada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio y la concentración determinada en un espectrofotómetro a una absorbancia de 260nm (Waldschmith *et al.*, 1997).

### 5.13.2 Diseño de iniciadores

Para llevar a cabo la PCR y determinar el tipo de proteasa presente en las cepas paterna y mutantes, fueron diseñados iniciadores, tomando como base secuencias bien caracterizadas, registradas en la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), los iniciadores que se diseñaron fueron los siguientes

TABLA 3

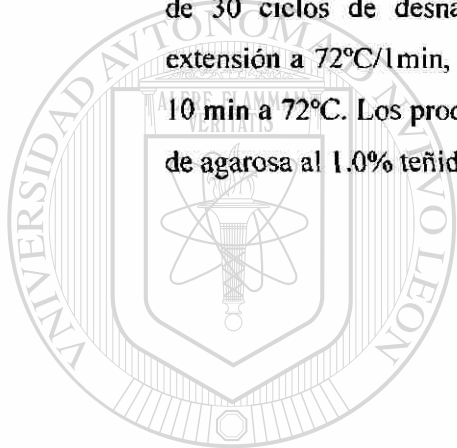
Información general de los iniciadores diseñados en base a secuencias registradas en la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Iniciador	Secuencia (5' – 3')	Posición	Tamaño (pb)	Clave de Acceso/ Nombre
AAP1	CCAGCAAGCAAAGTCTTTCG	-60/-34		
AAP2	GCTATTTATTAACCTCAGCGT	+1069/+1091	1151	U16305/Pr1
Pr1A	ATGCGTCAATCAATCATCGCTGCCGC	+1/+26		
Pr1B	GGGTACCGTGGACTATTCAACGGGG	+1230/+1257	1257	U16305/Pr1
AAP3f	CTATCAATCATCGCTGCCGCTCTT	+6/+30		
AAP3r	TCTCACCCGTGAAGCCCAC	+505/+524	519	AF154118/ Bsn 1
AAP4f	CTGACCGCCGCTCCACCTTCTC	+990/+1012		
AAP4r	ATAAGGTCGGTTTTTGTGCGG	1369/+1391	400	AF154118/ Bsn 1
CGSr	TACCTGGCATTTAACGGCGC	+1114/+1143		EF195164/C EDP-2

#### 5.14 Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR fue realizada en tubos eppendorf de 200  $\mu$ l, el volumen total de la reacción fue de 50  $\mu$ l. La mezcla de reacción para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos fue la siguiente: DNA, 500 ng; Buffer 5X (Green Go Taq reaction buffer, PROMEGA), mezcla de nucleótidos trifosfatos (dNTP's), 400 $\mu$ M; 2.0  $\mu$ M de cada iniciador y 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Go Taq, PROMEGA).

La PCR fue llevada a cabo en un termociclador, Perkin-Elmer Geneamp 2400, de la siguiente manera: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94° C seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/1 min; alineamiento a 58°C/1min y extensión a 72°C/1min, al terminar estos ciclos un tiempo de extensión adicional de 10 min a 72°C. Los productos fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

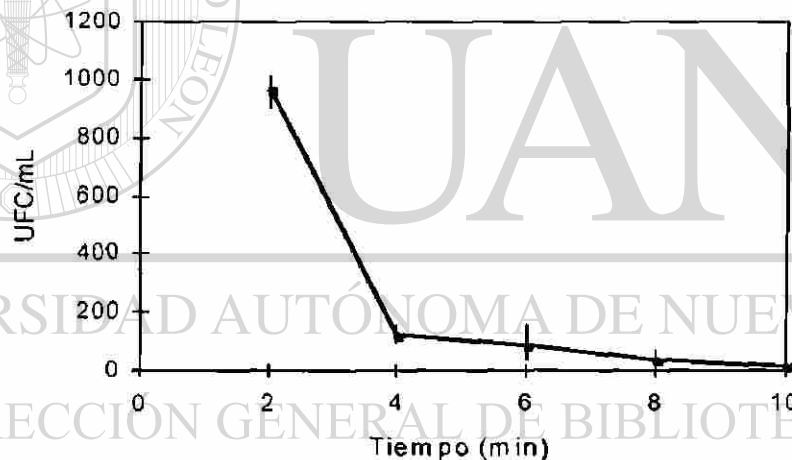


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 Ensayo de mutagénesis

La lámpara de luz UV fue colocada a 10 cm de la suspensión de conidias. La Figura 4 muestra la curva de sobrevivencia de *B. bassiana* al tratamiento; como puede observarse, el tiempo al cual hubo menos del 1% de sobrevivencia, es decir, menos de 30 colonias, fueron 4 min, tiempo que fue seleccionado para llevar a cabo la mutagénesis y así poder seleccionar las colonias mutantes.



**Figura 4.** Porcentaje de sobrevivencia de *B. bassiana* cepa BbCh1 después de irradiación con luz UV (254 nm). 4 ml de una suspensión de  $1 \times 10^7$  a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 min a 10 cm. Posterior a la irradiación, las muestras fueron cultivadas en agar YPD y contadas para así seleccionar el tiempo de exposición. El criterio de selección del tiempo fue considerando aquel al cual se redujo la viabilidad en un 60-70%. Puede observarse que a 4 min el porcentaje de sobrevivencia es menor al 1%. Los datos de la gráfica muestran la media de tres repeticiones diferentes.

## 6.2 Selección de las cepas mutantes

Después de la exposición a la luz ultravioleta fueron obtenidas alrededor de 10000 colonias mutantes, de las cuales, fueron seleccionadas 136 colonias mutantes, que fueron sembradas en cajas con AC, diariamente se hicieron observaciones en cuanto al crecimiento, así mismo, también fueron medidos el diámetro de la colonia y el halo de hidrólisis. Ejemplo de ello se puede observar en la Tabla 4. El resto de las colonias se enlistan en el apéndice C. Las cepas mutantes fueron seleccionadas por su habilidad de producir halos de hidrólisis alrededor de la colonia, cuando las cepas fueron crecidas en cajas con agar suplementado de leche descremada (AC). De estas 136 colonias se hizo una selección inicial de 36, las cuales presentaron un halo de hidrólisis mayor que el de la cepa paterna, y fueron sembradas nuevamente en cajas con AC y monitoreadas diariamente en cuanto al desarrollo del halo de hidrólisis, así como su estabilidad, algunas de ellas no fueron estables en el desarrollo del halo de hidrólisis, que fue disminuyendo conforme las resiembras.

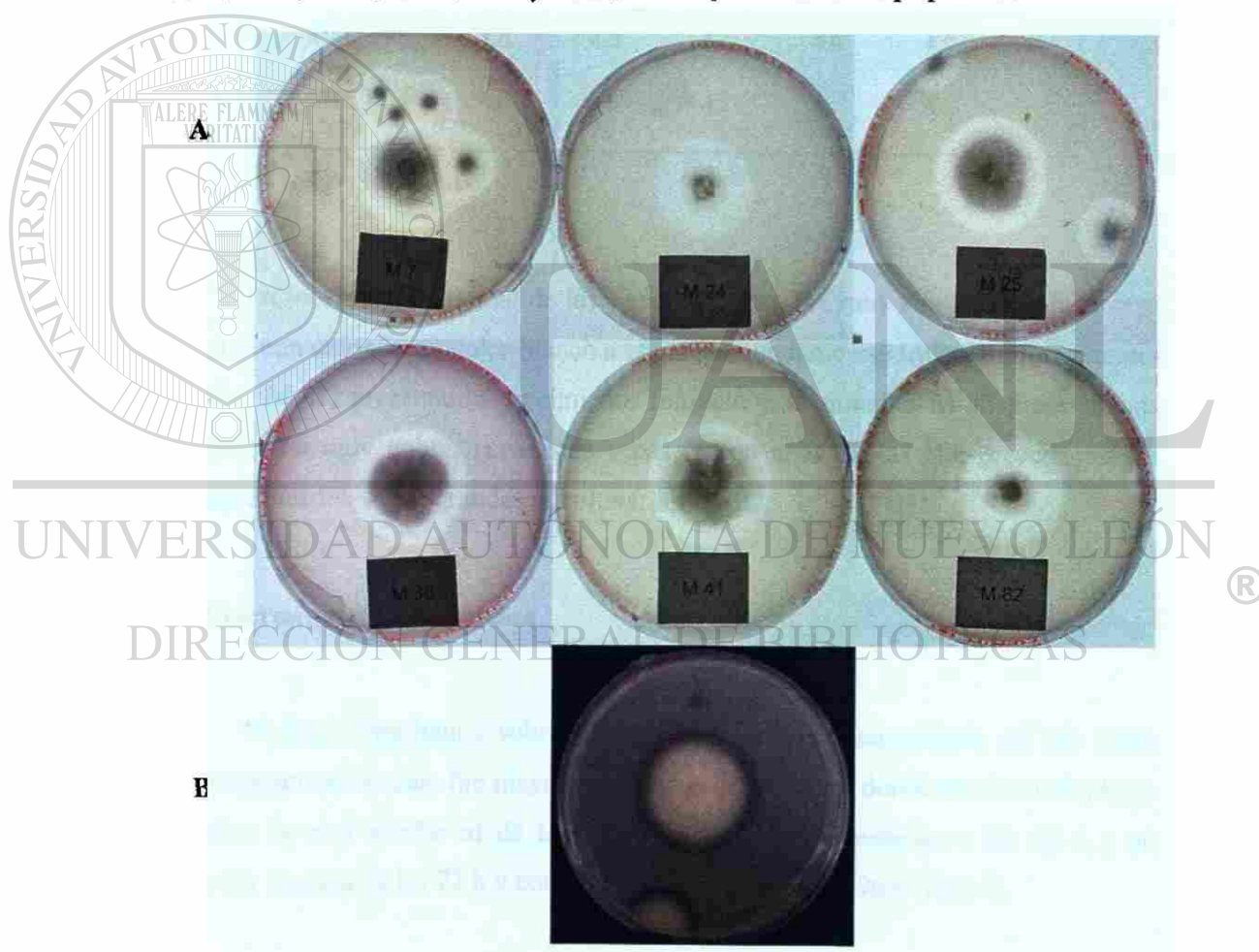
**TABLA 4**  
Ejemplo del desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas mutantes obtenidas por medio de luz ultravioleta. Observación en medio de agar caseína\*.

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
Paterna	6	0.5	D	9	1	D	14	1.5	D	19	4	C
1	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
2	5	1	D	8	1	D	14	1	D	28	1.5	C
3	5	0.5	D	6	1	D	13	1	D	27	1.5	C
4	4	1.5	C	7	1.5	D	12	1.5	C	27	1	C
5	5	1	D	8	1	D	14	1	D	22	2.5	C
6	6	1	C	10	1.5	C	14	1.5	C	26	4	C
7	6	1	C	9	1	C	12	1	C	27	3.5	C
8	5	0	-	5	0	-	6	0.5	D	17	2	C
9	4	1	D	7	1.5	C	13	1	C	27	1.5	C
10	5	1	C	9	1	C	13	1.5	C	29	1.5	C
11	6	1	C	9	1	C	13	1	C	23	2	C
12	4	1.4	C	8	1.5	C	13	1	C	23	2.5	C
13	4	1	D	6	1.5	D	11	1	D	25	1	C
14	5	1	D	9	1.5	D	14	1.5	C	27	2	C
15	5	1.5	D	9	1	D	14	0.5	D	26	1.5	C
16	4	0.5	D	5	1	D	7	1.5	C	22	1	C

\* Una suspensión de 4 ml ( $1 \times 10^7$  esporas / ml) fue irradiada, inoculados en AC e incubada 7 días a 28°C en la oscuridad. Las cepas mutantes fueron seleccionadas por el tamaño de halo de hidrólisis, formación de zonas claras alrededor de la colonia. Col- Colonia, H- Halo, A- Apariencia del halo (C-Claro, D-Difuso).

### 6.3 Estabilidad de las cepas mutantes

La estabilidad de las mutantes fue determinada realizando cultivos sucesivos y alternados en agar YPD y AC. De las 36 colonias seleccionadas previamente, 6 cepas fueron estables al menos a 5 subcultivos alternados en agar YPD y AC. En la tabla 6 se presenta el tamaño del halo de hidrólisis durante los 5 subcultivos de las 6 colonias seleccionadas, en AC, así como también en la figura 5 se muestra la imagen del halo formado por las diferentes cepas crecidas en agar caseína, en esta imagen puede observarse que los halos de hidrólisis de las cepas mutantes designadas como M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 y M-82, son mayores al de la cepa paterna.



**Figura 5** Desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas Paterna y mutantes crecidas en Agar Caseína y medidas a los 5 días de cultivo. Panel A, mutantes; Panel B, Paterna.

TABLA 5

Tamaño del halo de hidrólisis, en AC, durante los cinco subcultivos sucesivos y alternados en AC y agar YPD. Medida a los cinco días de cultivo.

Cepa	SC 1	SC2	SC3	SC4	SC5
Paterna	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0
M7	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
M24	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
M25	4.0	3.5	4.5	4.0	4.5
M36	3.0	3.5	4.0	4.0	4.0
M41	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
M82	4.0	4.5	4.5	4.5	4.5

SC= Subcultivo

La morfología colonial de las cepas mutantes fue muy similar a la de la cepa paterna, con colonias de color blanco a crema y abundante esporulación. La mutantes M-24 y M-82, presentaron crecimiento limitado y la mutante M-82 presento una esporulación muy pobre, pero estas cepas fueron unas de las que presentaron los halos de hidrólisis más grandes al cultivarlas en AC.

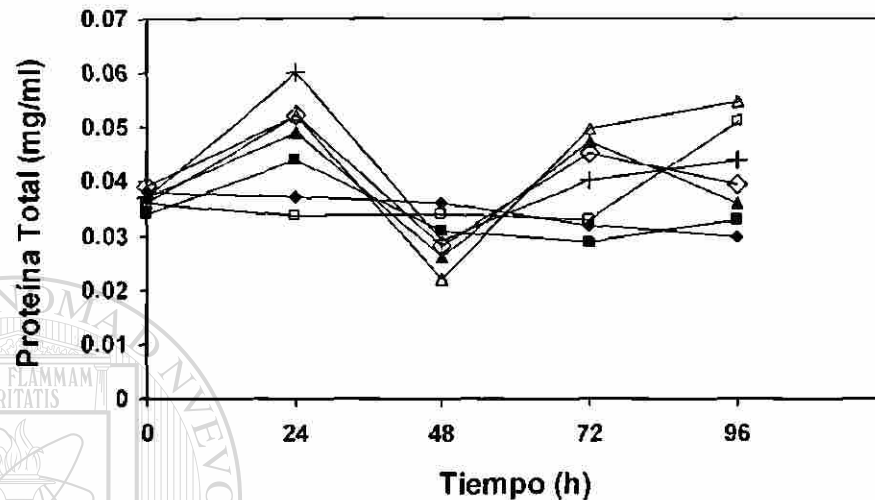
#### 6.4 Determinación de proteína

Nuestros resultados sobre el contenido de proteína soluble en las cepas mutantes seleccionadas, fue mayor después de 72 h día, en donde en el contenido de proteína es muy similar al de la cepa paterna, con un descenso a las 48 h y un posterior aumento a las 72 h y con muy poco aumento a las 96 h (Fig. 4).

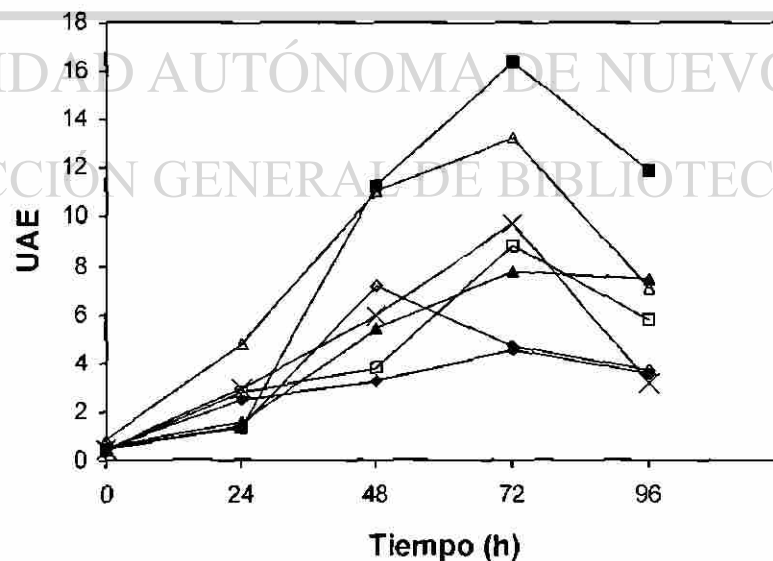
#### 6.5 Inducción de la actividad proteasa

La actividad general de proteasa fue determinado cada 24 h. Cuando las diferentes cepas de *B. bassiana* fueron crecidas en el medio mínimo de sales

adicionada con 1% de gelatina, la máxima actividad fue detectada al tercer día (72 h) en todas las cepas excepto en la mutante M-82 que se detectó a las 48 h y con una mayor actividad que la de la cepa paterna, al menos de dos veces, en todas las cepas mutantes (Figura 7).

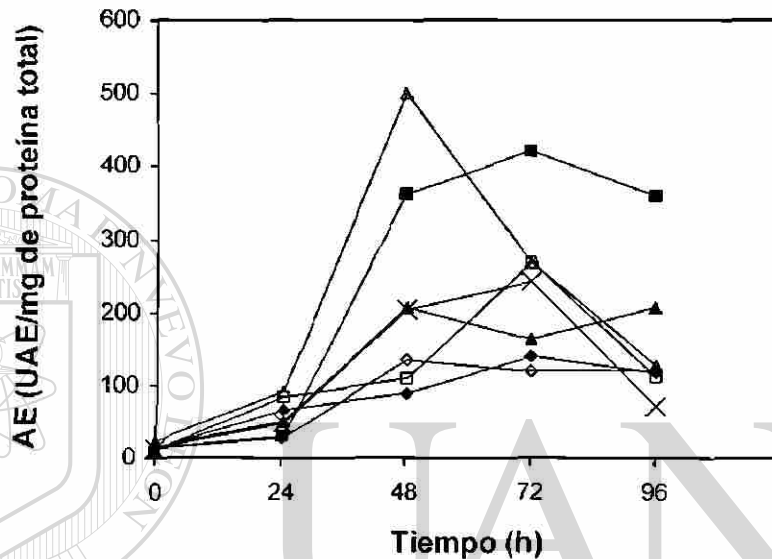


**Figura 6-** Proteína total de la cepa paterna y mutantes. La proteína fue cuantificada directamente de los filtrados de los cultivos mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como estándar. Puede observarse que el contenido de proteína en todas las cepas es muy similar al de la cepa paterna. -◆- Cepa Paterna, -⊕- M7, -▲- M24, -△- M25, -⊕- M36, -□- M41 y -◇- M82. Proteína total a las 72h.



**Figura 7** Actividad enzimática (UAE) de las cepas paternas y mutantes. La actividad enzimática fue hecha utilizando azocaseína como sustrato (Secades y Gujarro, 1999). La mayor actividad enzimática se detectó a las 72 h en todas las cepas excepto en la cepa mutante M 82, la cual se detectó a las 48 h. -◆- Cepa Paterna, -⊕- M7, -▲- M24, -△- M25, -⊕- M36, -□- M41 y -◇- M82. UAE – Unidades de Actividad enzimática. Actividad enzimática a las 72 h.

En cuanto a la actividad específica, todas las cepas presentaron una actividad específica mayor o igual a la de la cepa paterna, siendo las cepas mutantes M-25, M-7 y M-36 las que presentaron una mayor actividad específica, encontrándose esta en diferentes tiempos durante la cinética, la mutante M-25 presentó la mayor actividad específica a las 48 h, así como también la M-82, mientras que todas las demás cepas la presentaron a las 72 h (Figura 8).

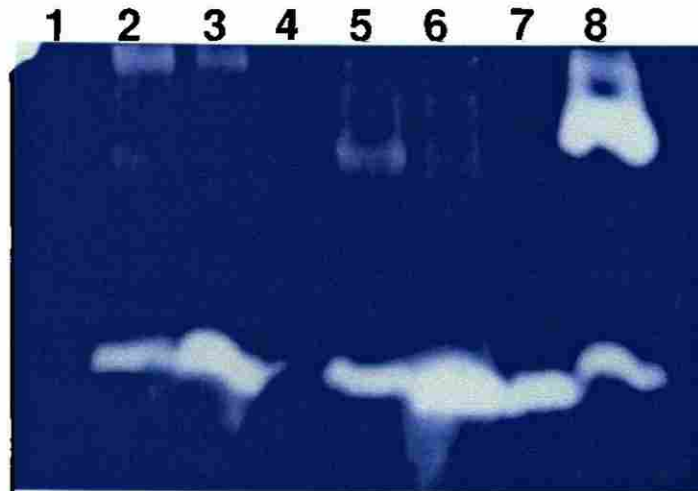


**Figura 8** Actividad específica (AE) de las cepas paterna y mutantes. Puede observarse que todas las mutantes presentan una mayor actividad específica que la cepa paterna -◆- Cepa Paterna, -◢- M7, -▲- M24, -△- M25, -◣- M36, -◻- M41 y -◇- M82. UAE = Unidades de Actividad Enzimática. Actividad enzimática a las 72 h

## 6.6 Perfil de producción de proteasas

El perfil de producción de proteasas, es decir el número y el tamaño de las proteasa extracelulares producidas tanto por la cepa paterna como por las cepas mutantes, fue evaluado mediante zimogramas de caseína, el cual reveló que el perfil de producción de proteasas en algunas mutantes, tales como M7, M36 y M82 fue diferente al producido por la cepa paterna (Figura 9), pero todas las cepas mostraron una banda de actividad principal de actividad proteolítica de un peso molecular de entre los 29 y 36 kDa.





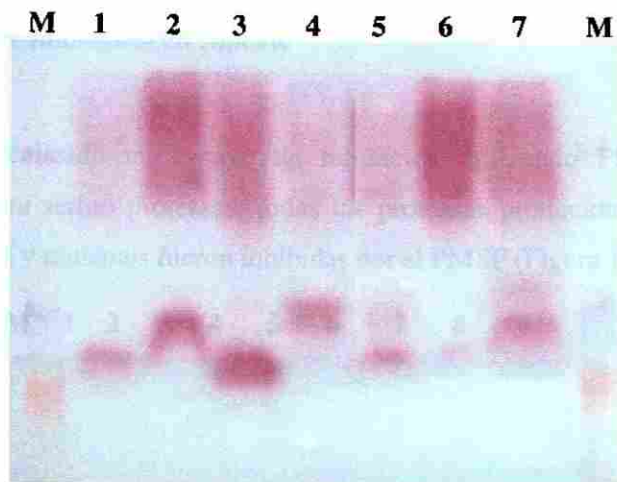
**Figura 9** Determinación del perfil de producción de proteasas por las cepas paterna y mutantes mediante un zimograma de caseína al 1.0%. Algunas de las cepas mutantes muestran un perfil de producción de proteasas diferentes al de la cepa paterna. Carriles: 1, Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, control negativo; 5, M-25; 6, M-36; 7, M-41; 8, M-82.

### 6.7 Tipo de actividad

Como la mayoría de las proteasas reportadas son, principalmente de tres tipos, determinamos el tipo de actividad, tipo tripsina (Figura 10); tipo quimiotripsina (Figura 11) y tipo elastasa (Figura 11) usando sustratos sintéticos. Ninguna de las proteasas producidas por las diferentes cepas presentó actividad tipo tripsina.

M 1 2 3 4 5 6 7

**Figura 10** Determinación de actividad tipo tripsina. Ninguna de las cepas mostró este tipo de actividad con el sustrato BApNA M, Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Cepa Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, M-25; 5, M-36; 6, M-41; 7, M-82.



**Figura 11** Determinación de actividad enzimática tipo quimi tripsina con nitrocelulosa como soporte. M.-Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Cepa Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, M-25; 5, M-36; 6, M-41; 7, M-82.



**Figura 12** Determinación de actividad enzimática tipo elastasa con nitrocelulosa como soporte. M, Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Cepa Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, M-25; 5, M-36; 6, M-41; 7, M-82.

### 6.8 Ensayo de inhibición en soporte

Fue realizado un ensayo de inhibición utilizando PMSF, un inhibidor específico para serino proteasas, todas las proteasas producidas por las diferentes cepas, paterna y mutantes fueron inhibidas por el PMSF (Figura 13).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



**Figura 13** Determinación de la inhibición de la actividad enzimática por PMSF con nitrocelulosa como soporte. M, Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Control Positivo; 2, Cepa Paterna; 3, M-7; 4, M-24; 5, M-25; 6, M-36; 7, M-41; 8, M-82.

### 6.9 Represión bioquímica de la producción de proteasas

Los ensayos de inducción y represión fue realizado solo para las cepas paterna y M-82 en el medio inductor. El tiempo de duplicación de fue muy similar, 16 h y 14 h para la paterna y M-82, respectivamente. Con respecto a la biomasa (micelio), se presentó una cantidad de 1.55 mg/ml en la cepa paterna y 1.63 mg/ml en la cepa mutante (Fig. 14).

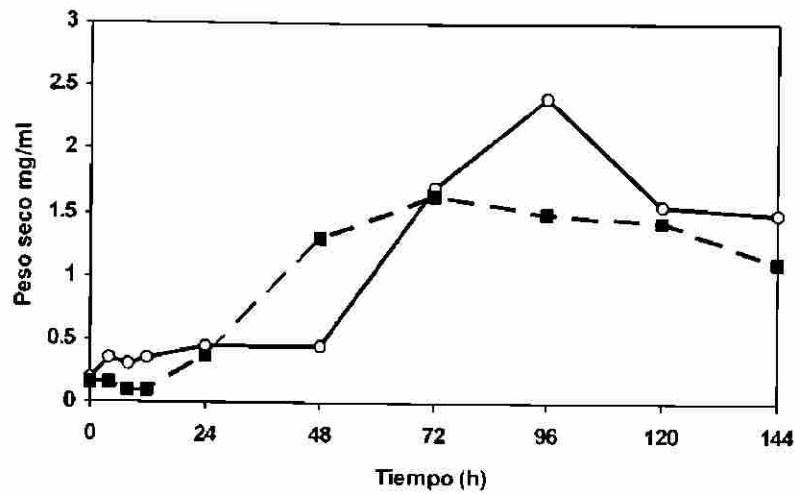


Figura 14. Producción de biomasa de cepa paterna y M-82 en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Ceba Paterna. --- M 82.

La Figura 15 representa como se comportó el y el pH de la cepa paterna en el medio inductor. El pH tuvo una variación de 6.66 al momento 0 h, hasta un pH de 3.37 a las 120 h, casi al final de la cinética.

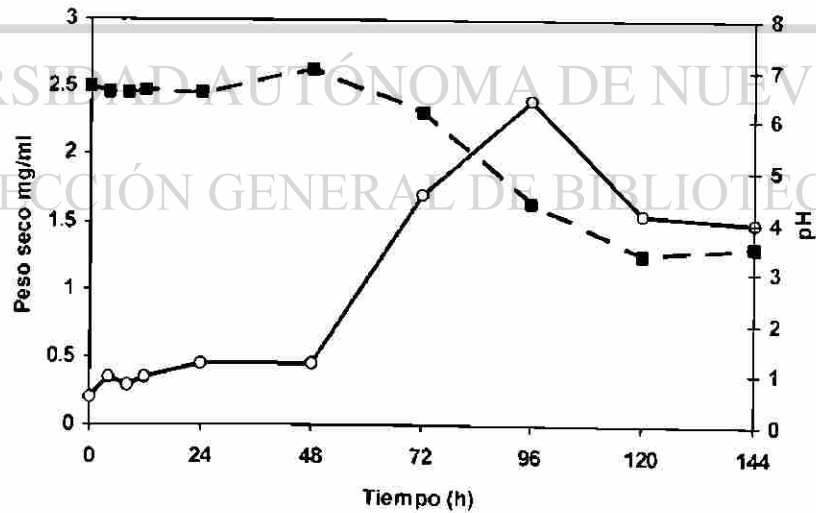
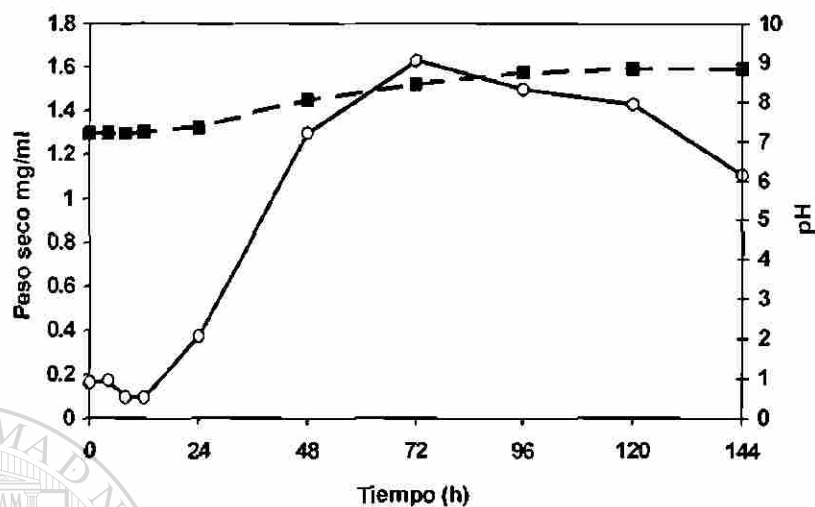


Figura 15. Comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana*, Cepa Paterna en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. -●- Peso seco, ---pH.

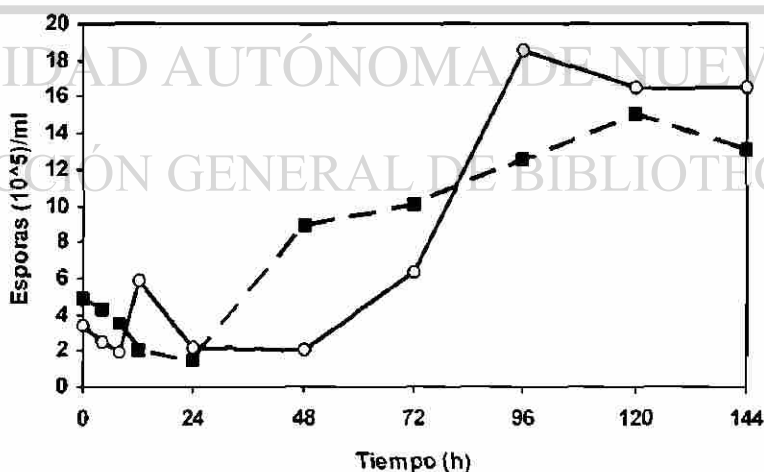
160630

El pH de la cepa mutante en medio inductor no tuvo una variación muy marcada, de 7.22 al momento 0 h, hasta un pH = 8.86 a las 72 h (Fig. 16).



**Figura 16.** Variación del pH durante la cinética de crecimiento de M-82 en medio inductor compuesto por NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. -●- Peso seco. - - - - pH.

En la Figura 17 se muestra la concentración de esporas/ml que tuvieron la cepa paterna y M-82 en el medio inductor. La cepa paterna tuvo una producción de esporas de  $12.6 \times 10^5$  esporas/ml a las 96 h, y M-82  $15 \times 10^5$  a las 120 h.



**Figura 17** Producción de esporas de la cepa paterna y M-82 en medio inductor compuesto por NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. -●- Cepa Paterna. - - - - M-82.

### 6.10 Cinéticas de crecimiento en medio represor

La cepa paterna tuvo 6.33 mg/ml y la mutante 4.5 mg/ml, ambas a las 120 h (Fig. 18). Los tiempos de duplicación fueron de 21 h y 16 h para las cepas, respectivamente.

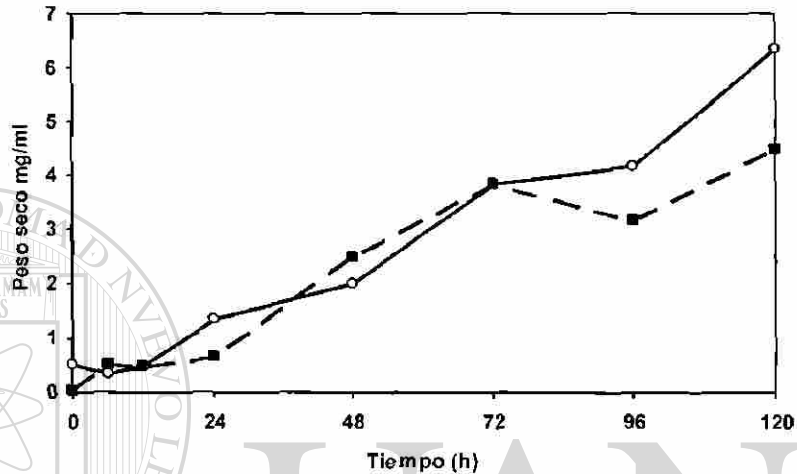


Figura 18. Biomasa de cepa paterna y M-82 en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. ●- Cepa Paterna, ---- M 82.

El consumo de la fuente de carbono del medio represor al término de la cinética se detuvo en los 2.25 g/ml con la cepa paterna (Fig. 19).

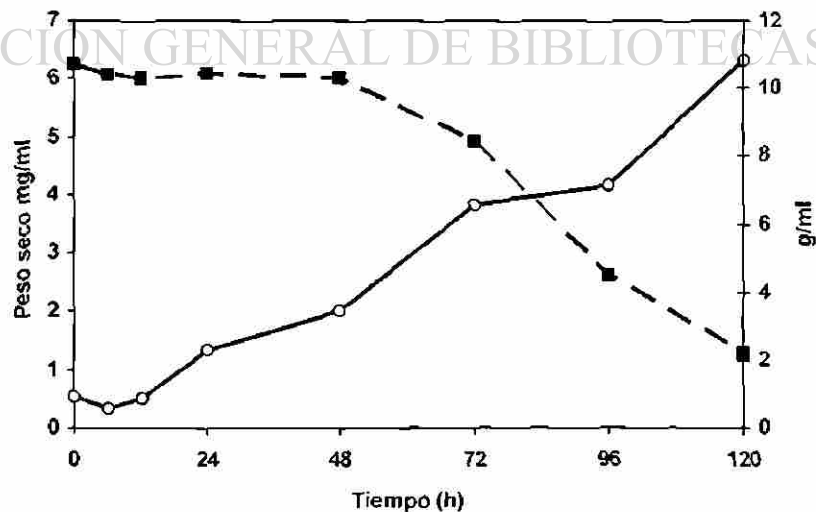
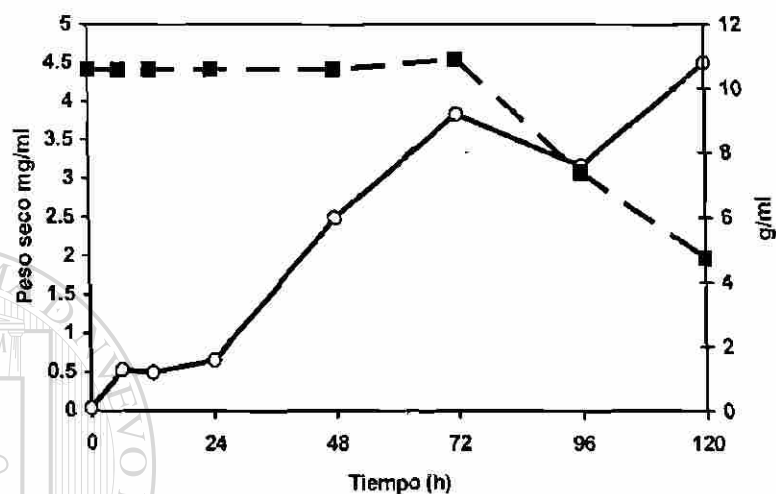
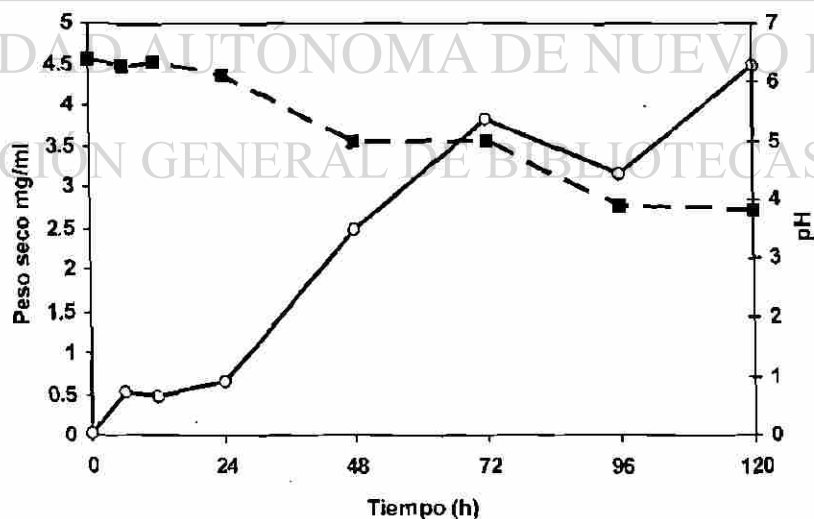


Figura 19. Consumo de glucosa (g/ml) durante la cinética de crecimiento de cepa paterna en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. ●- Peso seco, ----Glucosa.

Durante esta cinética, el pH cambió de 6.48 al tiempo 0 a 3.3 al final de la cinética, siendo el pH más bajo (Fig. 20). Al final de la cinética de crecimiento de la cepa mutante en medio represor se observó un restante de glucosa de 4.8 g/ml (Fig. 20), y se observó un pH final de 3.82 (Fig. 21).

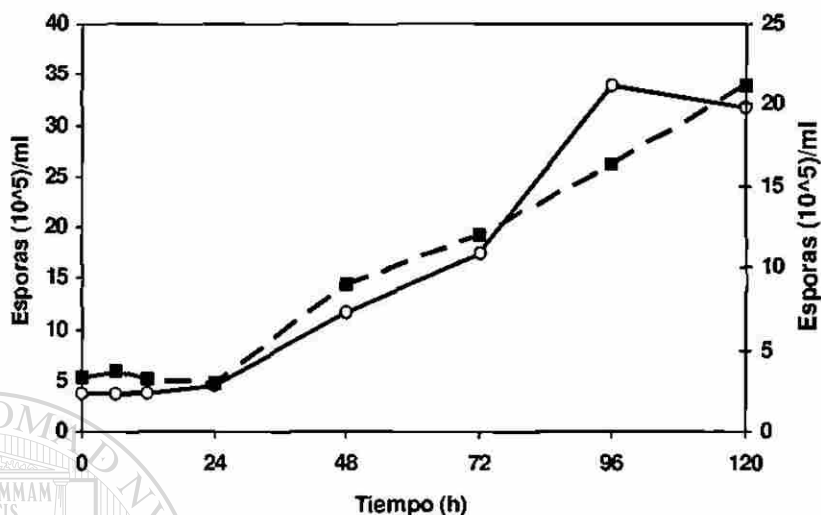


**Figura 20.** Comportamiento del consumo de glucosa por la cepa mutante en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Peso seco, ----Glucosa



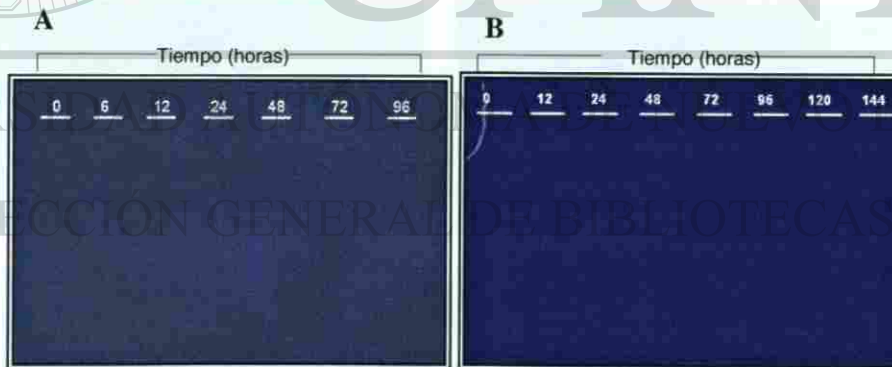
**Figura 21.** Variación del pH durante la propagación de M-82 en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Peso seco, ----pH.

La producción de esporas de la cepa paterna fue de  $33.83 \times 10^5$  a las 96 h y de la mutante  $21.16 \times 10^5$  a las 120 h, (Fig. 22).



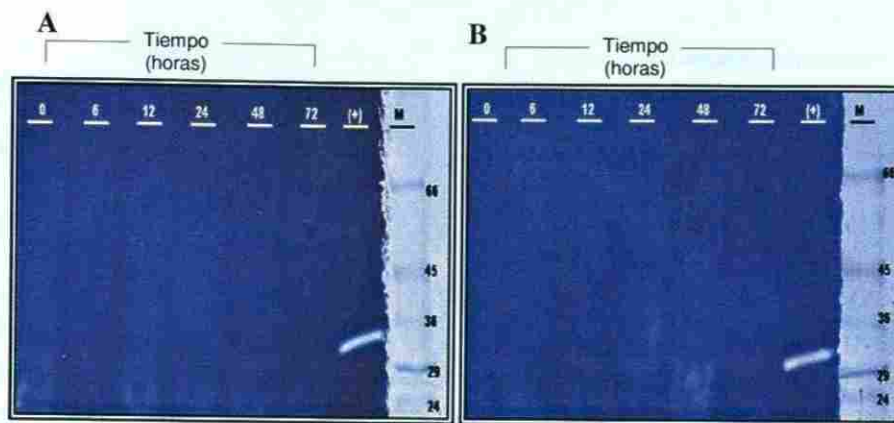
**Figura 22.** Producción de esporas/ ml de la cepa paterna y mutante en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Cepa Paterna, ---M 82H.

No se detectó actividad enzimática en las cepas paterna y mutante en el medio YPD (Figura 23 A y B) ni en medio represor (Figura 24 A y B).



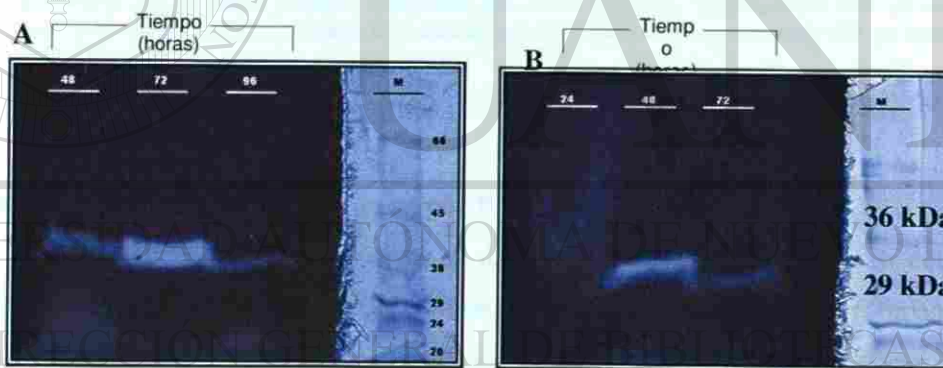
**Figura 23.** Zimogramas de caseína. Cepa paterna (A) y mutante M-82 (B) en medio YPD.





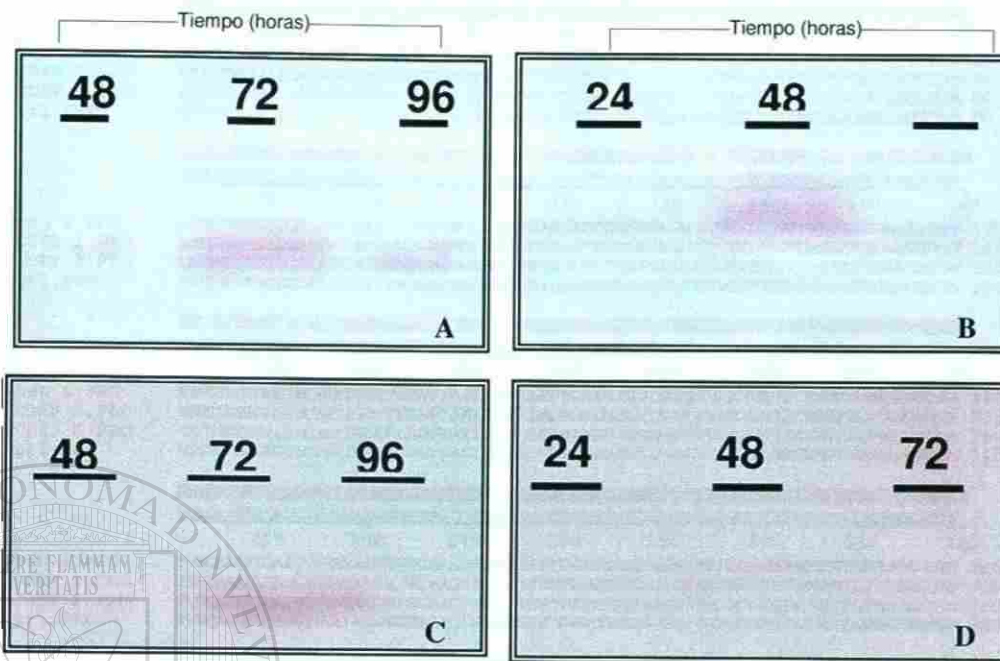
**Figura 24.** Zimogramas de caseína. Cepa paterna (A) y mutante (B) en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. (+) Mutante en medio inductor a las 72 h. (M) Marcador kD, SDS-7

Las cepas en el medio inductor si mostraron actividad (halo). La banda observada oscila entre los 29 y 36 kDa. La cepa paterna a las 48, 72 (máxima detección) y 96 h (Fig. 25 A), mientras que la mutante la presentó a las 24, 48 (máxima detección), y 72 h (Fig. 25 B).



**Figura 25.** Zimogramas de caseína. Cepa paterna (A) y mutante (B) en medio inductor compuesto por NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. (M) Marcador SDS 7

En el medio inductor se detectó actividad tipo quimi tripsina y elastasa en la cepa paterna, a las 48, 72 y 96 h (Figura 26 A y B); la cepa paterna también presentó los mismos tipos de actividad a las 24, 48 y 72 h (Figura 26 C y D).



**Figura 26.** Actividad enzimática en soporte. Actividad tipo quimi tripsina de cepa paterna (A) y mutante (B) en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. Actividad tipo elastasa de cepa paterna (A) y mutante (B) en medio inductor.

### 6.9 Identificación de las proteasas por PCR

La secuencia de aminoácidos de diversas proteasas degradadoras de cutícula producidas por *B. bassiana* fue comparada. Los resultados de esta comparación muestran que las tres proteasas comparadas son muy parecidas entre si (Figura 27), por lo que se decidió diseñar iniciadores en base a la secuencia más conocida, Pr1. Al ver la similitud de las proteínas, la identificación del tipo de proteasas presentes en las cepas paterna y mutantes, comenzó con el diseño de iniciadores, basados en la secuencia del gen de la proteasa Pr1, reportada por Joshi *et al.* (1995)

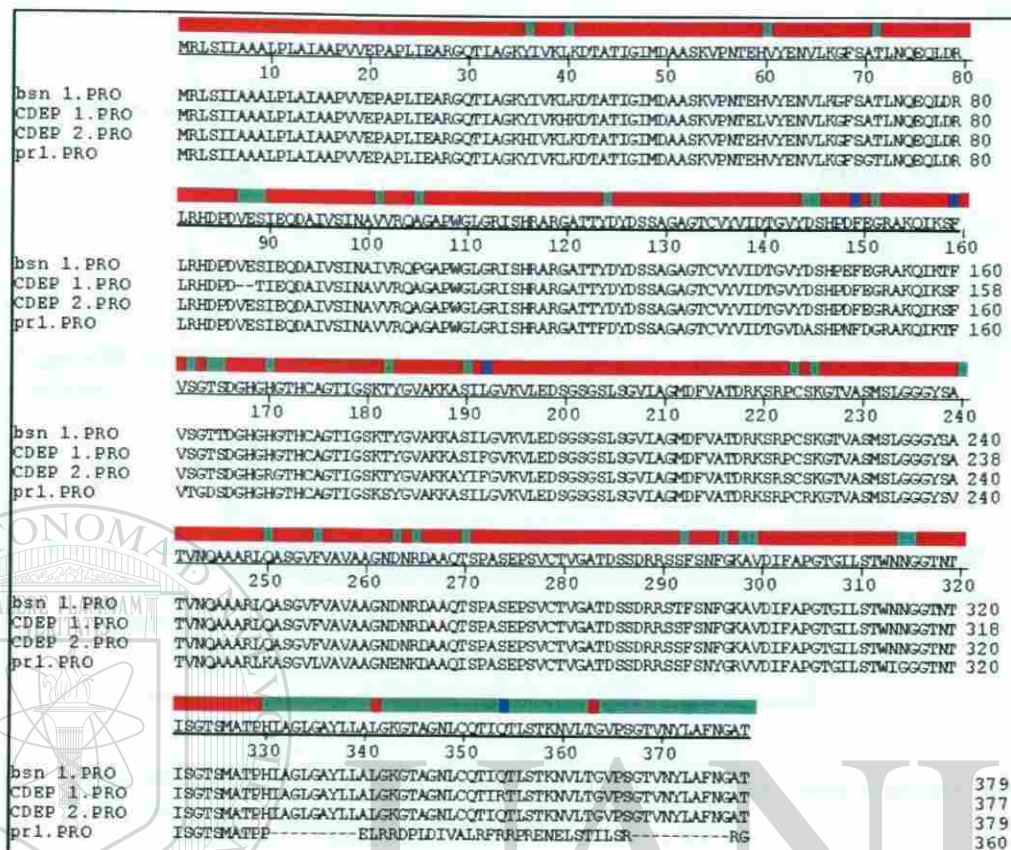


Figura 27 Comparación de la secuencia de aminoácidos por medio del programa LaserGene (DNAsar ver. 4.05) utilizando Clustal W, para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, Pr1 (Joshi et al., 1995); Bsn1 (Kim et al., 1999); CDEP-1(Fang et al. 2001) y CDEP-2(Zeng et al, 2006).

En la Figura 28 se muestra la localización de los iniciadores en el gen, el iniciador Pr1 A se localiza desde el codón de inicio ATG hasta el nucleótido +26; el iniciador reverse Pr1 B se localiza en la posición +1230a+1257, esta región se encuentra después del codón de término. La utilización de estos iniciadores no amplificó el fragmento esperado de 1257 pb, por lo que fueron diseñaron unos nuevos iniciadores en diferente región. La Figura 29 muestra la localización de los nuevos iniciadores sobre el gen *pr1*. El iniciador AAP1 se localiza en la posición -60(-34), antes del codón de inicio y el iniciador reverse en la posición +1069-1091 y abarca 12 pares de bases después del codón de término.

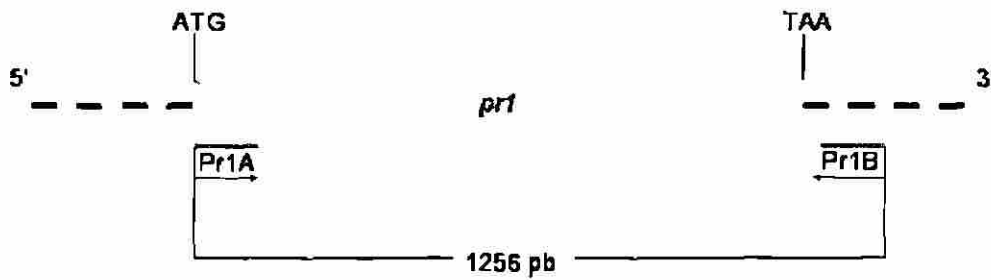


Figura 28. Localización esquemática de los iniciadores Pr1A y Pr1B sobre el gen *prl* de *B. bassiana*.

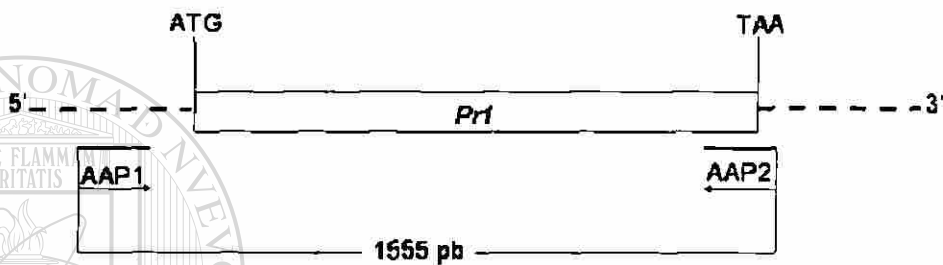


Figura 29 Localización esquemática de los iniciadores AAP1 y AAP2 sobre el gen *prl* de *B. bassiana*.

El fragmento esperado de 1151 pb, no amplificó con el uso de estos iniciadores, por lo que fueron diseñados nuevos iniciadores, tomando la secuencia de DNA reportada de otra proteasa producida por *B. bassiana* denominada Bassiasina I (Kim *et al.*, 1999). Los dos pares de iniciadores diseñados; AAP3 y los AAP4 en dos regiones diferentes del DNA, el iniciador AAP3f, localizado en la posición +6-+30 después del codón de inicio y el primer reverso AAP3r en la posición +505-+524 (Figura 30); el iniciador AAP4f localizado en la posición +990-1012 y el iniciador reverso AAP4r en +1369-+1391, después del codón de término (Figura 31).

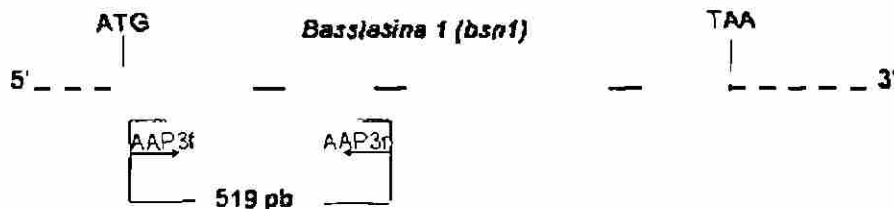
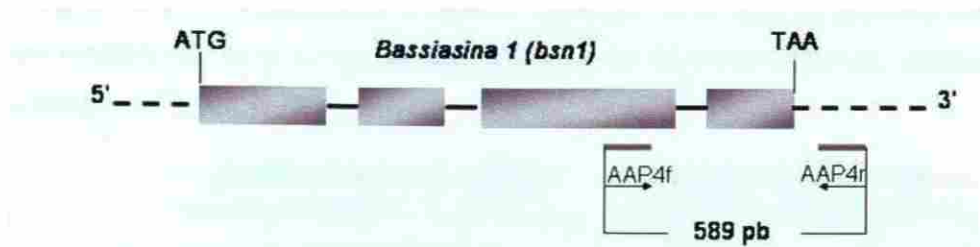


Figura 30 Localización esquemática de los iniciadores AAP3f y AAP3r sobre el gen *bsn1* de *B. bassiana*



**Figura 31** Localización esquemática de los iniciadores AAP4f y AAP4r sobre el gen *bsn1* de *B. bassiana*.

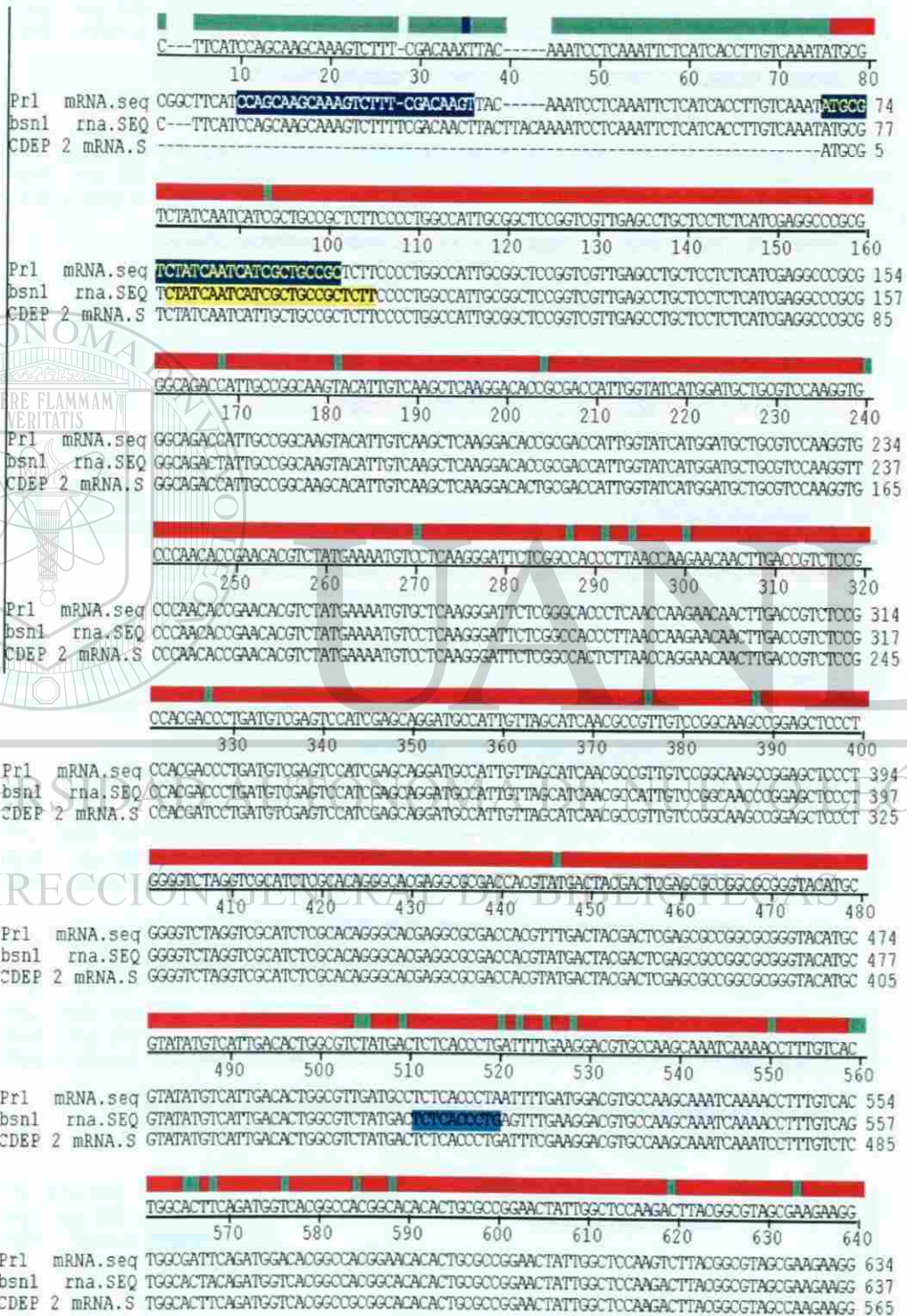
Un fragmento esperado de 519 pb, fue visualizado en gel de agarosa al 1.0% con Buffer TAE (Fig. 32) con los iniciadores AAP3f y AAP3r.



**Figura 32.** PCR con los iniciadores AAP3f y AAP3r. M, Hyperladder IV (BIOLINE); 1, Cepa paterna; 2, M-82; 3, M-25; 4, M-36; 5, M-36; 6, M-82. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE.

Los iniciadores AAP4f y AAP4r no amplificaron el fragmento esperado de 401 pb. Hasta aquí, ningún par de iniciadores diseñados a partir de la secuencia de mRNA de Pr1 amplificó el producto esperado, solo un par de iniciadores identificados como AAP3f y AAP3r y diseñados a partir de la secuencia del gen

completo de Bsn1, amplificaron el producto esperado por lo que fue necesario hacer una comparación de la secuencia nucleotídica de las diferentes proteasas, utilizando el programa Clustal W (Fig. 33).



CGTCCATTTTGGGCGTCAAGGTGCTCGAAGACAGTGGCTGGGTTGCTCAGCGGGGTCATTTGCCGAATGGACTTTTGTG  
 650 660 670 680 690 700 710 720  
 Pr1 mRNA.seq CGTCCATTTTGGGCGTCAAGGTGCTCGAAGACAGTGGGTTGCTCAGCGGGGTCATTTGCCGAATGGACTTTTGTG 714  
 bsn1 rna.SEQ CGTCCATTTTGGGCGTCAAGGTGCTCGAAGACAGTGGCTGGGTTGCTCAGCGGGGTCATTTGCCGAATGGACTTTTGTG 717  
 CDEP 2 mRNA.S CGTACATTTTGGGCGTCAAGGTGCTCGAAGACAGTGGCTGGGTTGCTCAGCGGGGTCATAGCGGAATGGACTTTTGTG 645

GCTACGGACCGGAAATCCCGTCCATGCAGCAAAGGCACCGTCCAGCATGTCCCTTGGCGGTGGCTACTCGGCCACCGT  
 730 740 750 760 770 780 790 800  
 Pr1 mRNA.seq GCTACGGACCGGAAATCCCGTCCATGCAGCAAAGGCACCGTCCAGCATGTCCCTTGGCGGTGGCTACTCGGCCACCGT 794  
 bsn1 rna.SEQ GCTACGGACCGGAAATCCCGTCCATGCAGCAAAGGCACCGTCCAGCATGTCCCTTGGCGGTGGCTACTCGGCCACCGT 797  
 CDEP 2 mRNA.S GCTACGGACCGGAAATCCCGTCCATGCAGCAAAGGCACCGTTCAGCATGTCCCTTGGCGGTGGCTACTCGGCCACCGT 725

GAACAGGCGCGGGGCTCGAGGCTTGGGGGTTTGTGCGCGTCCGCCGGCAACGACAATAGGGATGCCGCC  
 810 820 830 840 850 860 870 880  
 Pr1 mRNA.seq GAACAGGCGCGGGGCTCGAGGCTTGGGGGTTTGTGCGCGTCCGCCGGCAACGAAAATAAGGATGCCGCC 874  
 bsn1 rna.SEQ GAACAGGCGCGGGGCTCGAGGCTTGGGGGTTTGTGCGCGTCCGCCGGCAACGACAATAGGGATGCCGCC 877  
 CDEP 2 mRNA.S GAACAGGCGCGGGGCTCGAGGCTTGGGGGTTTGTGCGCGTCCGCCGGCAACGACAATAGGGATGCCGCC 805

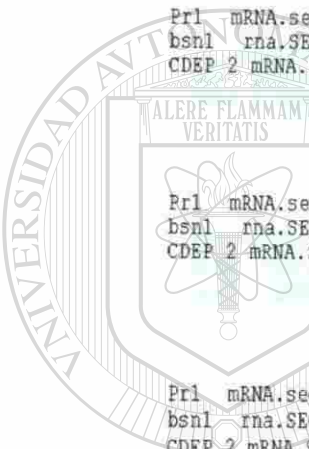
AGACCTGGCCGCTCGAGCGTCCGTCTGCACCGTGGAGCTACCGACTGTCTGACCGCGCTCCAGCTTCTCCAAC  
 890 900 910 920 930 940 950 960  
 Pr1 mRNA.seq AGACCTGGCCGCTCGAGCGTCCGTCTGCACCGTGGAGCTACCGACTGTCTGACCGCGCTCCAGCTTCTCCAAC 954  
 bsn1 rna.SEQ AGACCTGGCCGCTCGAGCGTCCGTCTGCACCGTGGAGCTACCGACTGTCTGACCGCGCTCCAGCTTCTCCAAC 957  
 CDEP 2 mRNA.S AGACCTGGCCGCTCGAGCGTCCGTCTGCACCGTGGAGCTACCGACTGTCTGACCGCGCTCCAGCTTCTCCAAC 885

TTTGGAAAAGCTGTGACATTTTGCACCTGGCACTGGCACTTCTGCACTGGAAATATGGGGCACTAATACATCTC  
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
 Pr1 mRNA.seq TATGGAAGAGTGTGACATTTTGCACCTGGCACTGGCACTTCTGCACTGGAAATATGGGGCACTAATACATCTC 1030  
 bsn1 rna.SEQ TTTGGAAAAGCTGTGACATTTTGCACCTGGCACTGGCACTTCTGCACTGGAAATATGGGGCACTAATACATCTC 1030  
 CDEP 2 mRNA.S TTTGGAAAAGCTGTGACATTTTGCACCTGGTACTGGCACTTCTGCACTGGAAATATGGGGCACTAATACATCTC 965

GGGCACCTGGATGGCACTTCCACATTTGGGGTCTGGTGCCTAOCCTTTTGGCTCTGGCAAGGCACTGCGGCAACC  
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
 Pr1 mRNA.seq GGGCACTGGATGGCACTTCCACATTTGGGGTCTGGTGCCTAOCCTTTTGGCTCTGGCAAGGCACTGCGGCAACC 1080  
 bsn1 rna.SEQ GGGCACTGGATGGCACTTCCACATTTGGGGTCTGGTGCCTAOCCTTTTGGCTCTGGCAAGGCACTGCGGCAACC 1110  
 CDEP 2 mRNA.S GGGCACTGGATGGCACTTCCACATTTGGGGTCTGGTGCCTAOCCTTTTGGCTCTGGCAAGGCACTGCGGCAACC 1040

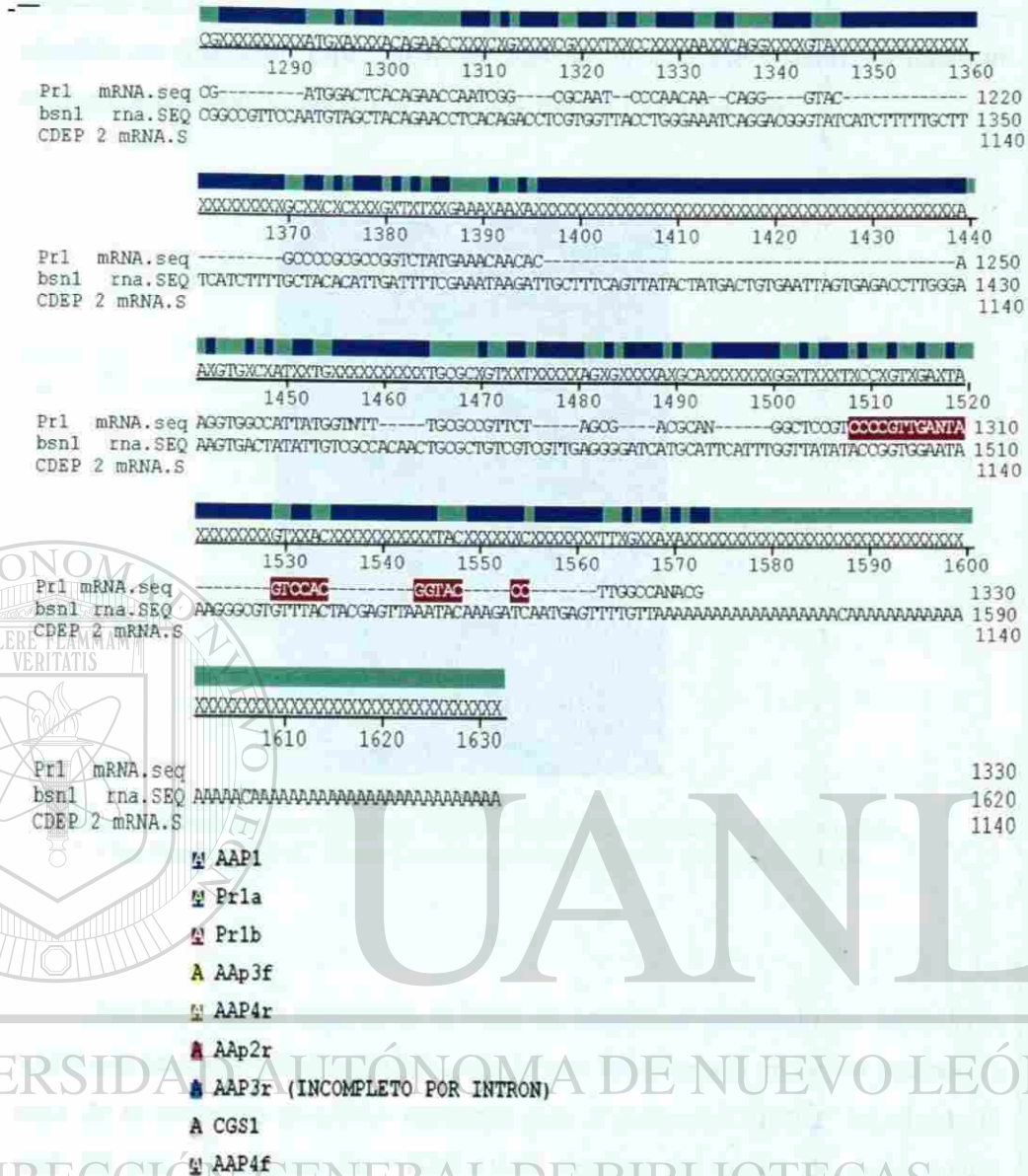
TCTGCCAABCTTCTGCACTTCTCTCCAGCAATGTCCTGCTGGGCTTCTTCCAGCAAGGCACTAOCCTGGCAATT  
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 Pr1 mRNA.seq GTCGC---ATTGAGATT---AGGAG---GCGGAG---GAAAAG---AATATC-GACAATT 1130  
 bsn1 rna.SEQ TCTGCCAABCTTCTGCACTTCTCTCCAGCAATGTCCTGCTGGGCTTCTTCCAGCAAGGCACTAOCCTGGCAATT 1190  
 CDEP 2 mRNA.S TCTGCCAABCTTCTGCACTTCTCTCCAGCAATGTCCTGCTGGGCTTCTTCCAGCAAGGCACTAOCCTGGCAATT 1120

AACGGGCGCACTAAXXXXXXXXXXXGAGAGXXXXXXXXXXGAXTAXAXGXCXGTYXTXGXXXXXXXXXXTXXXGGGXX  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280  
 Pr1 mRNA.seq C---TGTCAC---SCAGAG---GTAATAAATAG---CAGTCATCG---CGTATTTTGGGA 1180  
 bsn1 rna.SEQ AACGGGCGCACTAATATTTGACTAGCAGAGTGTTCACAGCAGT---TAAGGTCGTTTTTGTGTCCTCTTTCCCGGGT 1270  
 CDEP 2 mRNA.S AACGGGCGCACTTAA 1140



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUARAMANGA DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





**Figura 33** Comparación de la secuencia de nucleótidos por medio del programa Clustal W; para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, Pr1 (Joshi *et al.*, 1995); Bsn1 (Kim *et al.*, 1999) y CDEP-1(Zeng *et al.*, 2006).

El anterior análisis dio como resultado que las cuatro proteasas comparadas en su secuencia nucleotídica, son esencialmente iguales en la parte inicial del gen, con diferencias contrastantes en la parte final (Fig. 33). Para comprobar lo anterior, los iniciadores AAP1 (Pr1) y AAP3r (Bsn1) que abarca la región del promotor del gen se emplearon para realizar una amplificación; con las cepas Paterna y M-82 fue

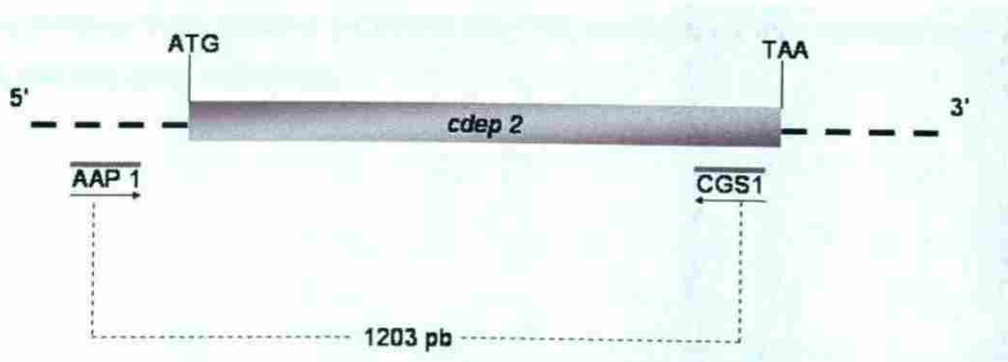


obtenido un fragmento esperado de de 589 pb, el cual fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% con Buffer TAE (Fig. 34).



**Figura 34** PCR con los iniciadores AAP1 y AAP3r. M, Hyperladder IV (BIOLINE); 1, Cepa Paterna; 2, M-82. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE.

No hubo ningún fragmento al tratar de amplificar utilizando los iniciadores AAP1 y el iniciador reverso AAP4r, por lo que fue diseñado un nuevo iniciador a partir de la secuencia de cDNA reportada para la proteasa CDEP-2 localizado al final del gen, en la posición +1114-+1143 después del codón de inicio cuatro nucleótidos antes del codón de término (Fig. 35).



**Figura 35:** Localización esquemática del iniciador CGS 1 sobre el gen *cdep-2* de *B. hassiana*.

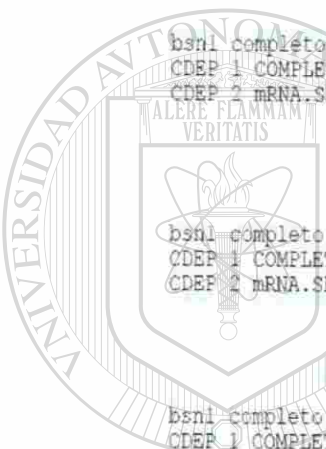
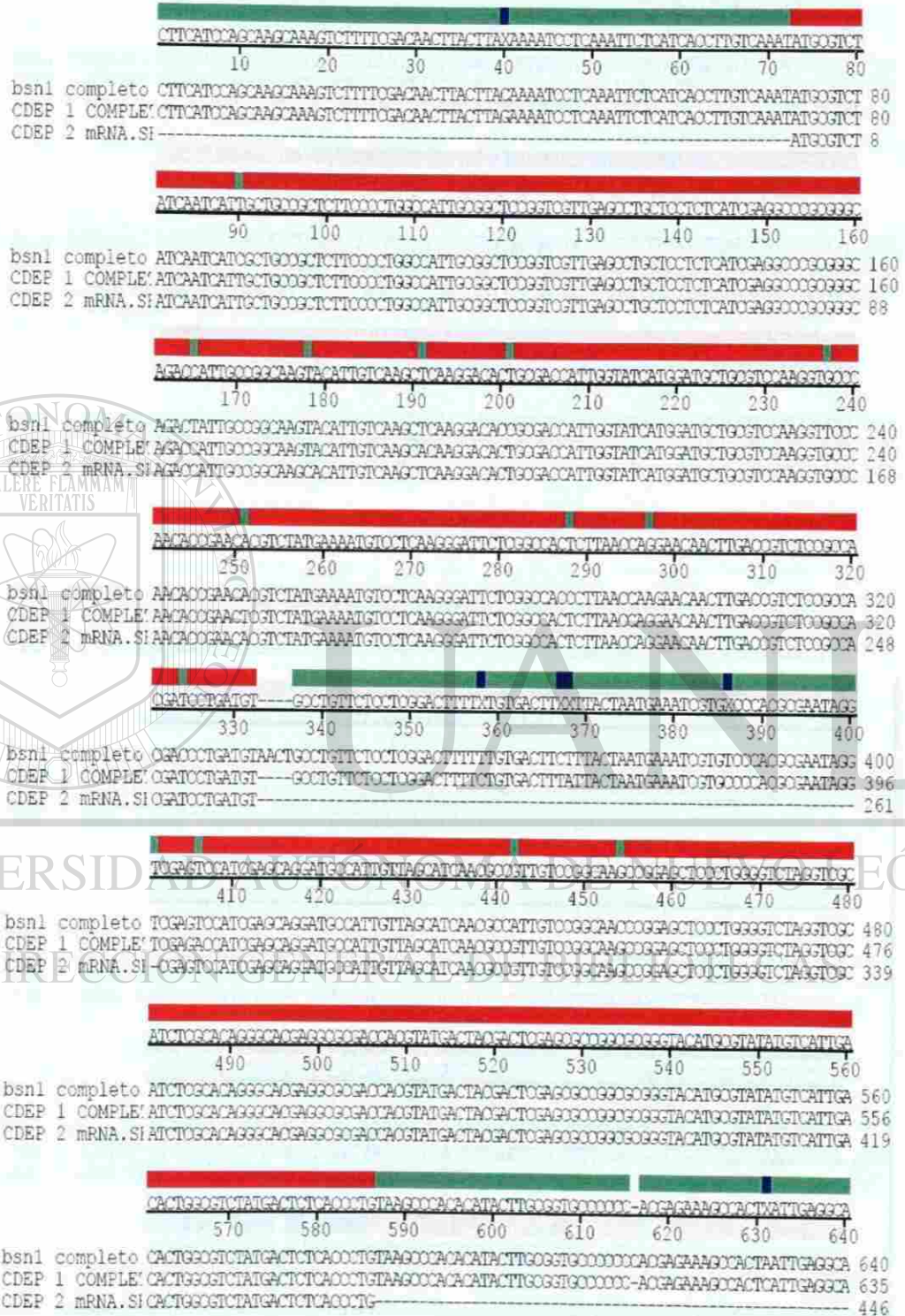
La amplificación con los iniciadores AAP1 y CGS1, fue obtenido un fragmento esperado de 1398 pb y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE (Fig. 36).




**Figura 36** PCR con los iniciadores AAP1 y CGS1. M1.- Hyperladder IV (BIOLINE), M2.- Hyperladder I (BIOLINE). 1.-Cepa Paterna, 2.- Mutante 7., 3.- Mutante 36, 4.- Mutante 82. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE


## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS


Por último al realizar una comparación entre las secuencias nucleotídicas de las proteínas Bsn1, CDEP-1 y CDEP-2 (Fig. 37), resultaron ser muy similares entre si, con muy pocas variaciones.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUARAMANGA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN



  
 TCAATAGGATTTGAGGAGAGTGGCCAGCAAAATCAAATCCTTTGTCTCTGGCACTTCAGATGGTCAAGGCAAGGACAC
   
 650 660 670 680 690 700 710 720
   
 bsnl completo TCAATAGGATTTGAGGAGAGTGGCCAGCAAAATCAAATCCTTTGTCTCTGGCACTTCAGATGGTCAAGGCAAGGACAC 720
   
 CDEP 1 COMPLET TCAATAGGATTTGAGGAGAGTGGCCAGCAAAATCAAATCCTTTGTCTCTGGCACTTCAGATGGTCAAGGCAAGGACAC 715
   
 CDEP 2 mRNA.SI -----ATTTCAGGAGAGTGGCCAGCAAAATCAAATCCTTTGTCTCTGGCACTTCAGATGGTCAAGGCAAGGACAC 517



  
 ACTGGGCGGAACTATTGGCTCCAAGACTTAAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC
   
 730 740 750 760 770 780 790 800
   
 bsnl completo ACTGGGCGGAACTATTGGCTCCAAGACTTAAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 800
   
 CDEP 1 COMPLET ACTGGGCGGAACTATTGGCTCCAAGACTTAAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 795
   
 CDEP 2 mRNA.SI ACTGGGCGGAACTATTGGCTCCAAGACTTAAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 597



  
 AGTGGCTGGGTTGGTCAAGGAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC
   
 810 820 830 840 850 860 870 880
   
 bsnl completo AGTGGCTGGGTTGGTCAAGGAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 880
   
 CDEP 1 COMPLET AGTGGCTGGGTTGGTCAAGGAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 875
   
 CDEP 2 mRNA.SI AGTGGCTGGGTTGGTCAAGGAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 677

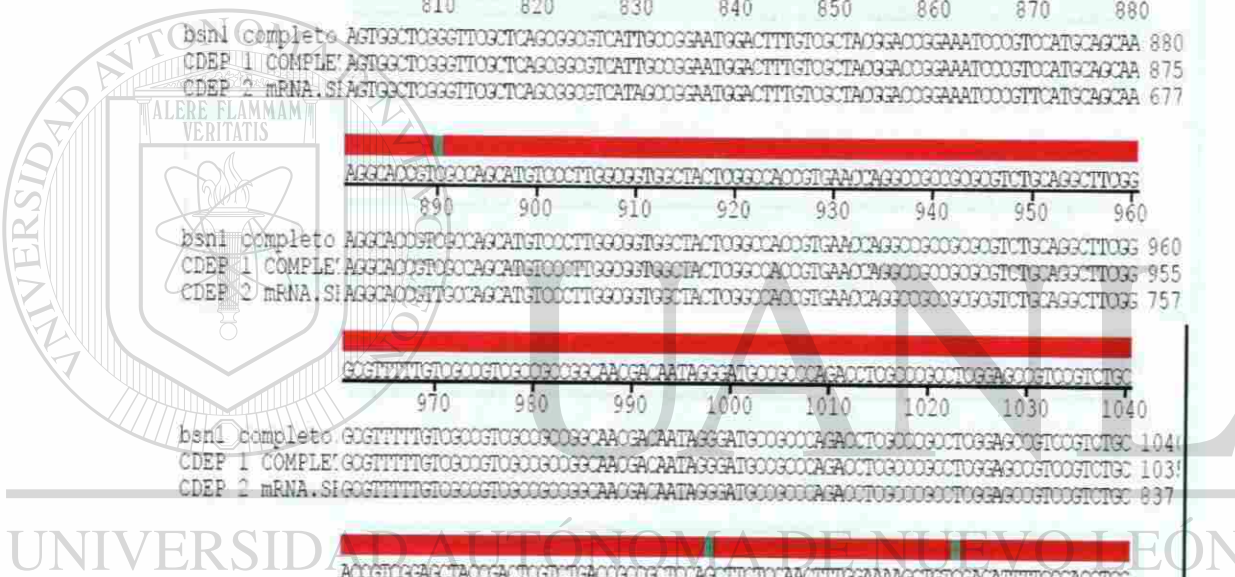

  
 AGGTAACCTGGGCACTATGCTGGGAGTGGTACTGAGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC
   
 890 900 910 920 930 940 950 960
   
 bsnl completo AGGTAACCTGGGCACTATGCTGGGAGTGGTACTGAGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 960
   
 CDEP 1 COMPLET AGGTAACCTGGGCACTATGCTGGGAGTGGTACTGAGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 955
   
 CDEP 2 mRNA.SI AGGTAACCTGGGCACTATGCTGGGAGTGGTACTGAGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 757

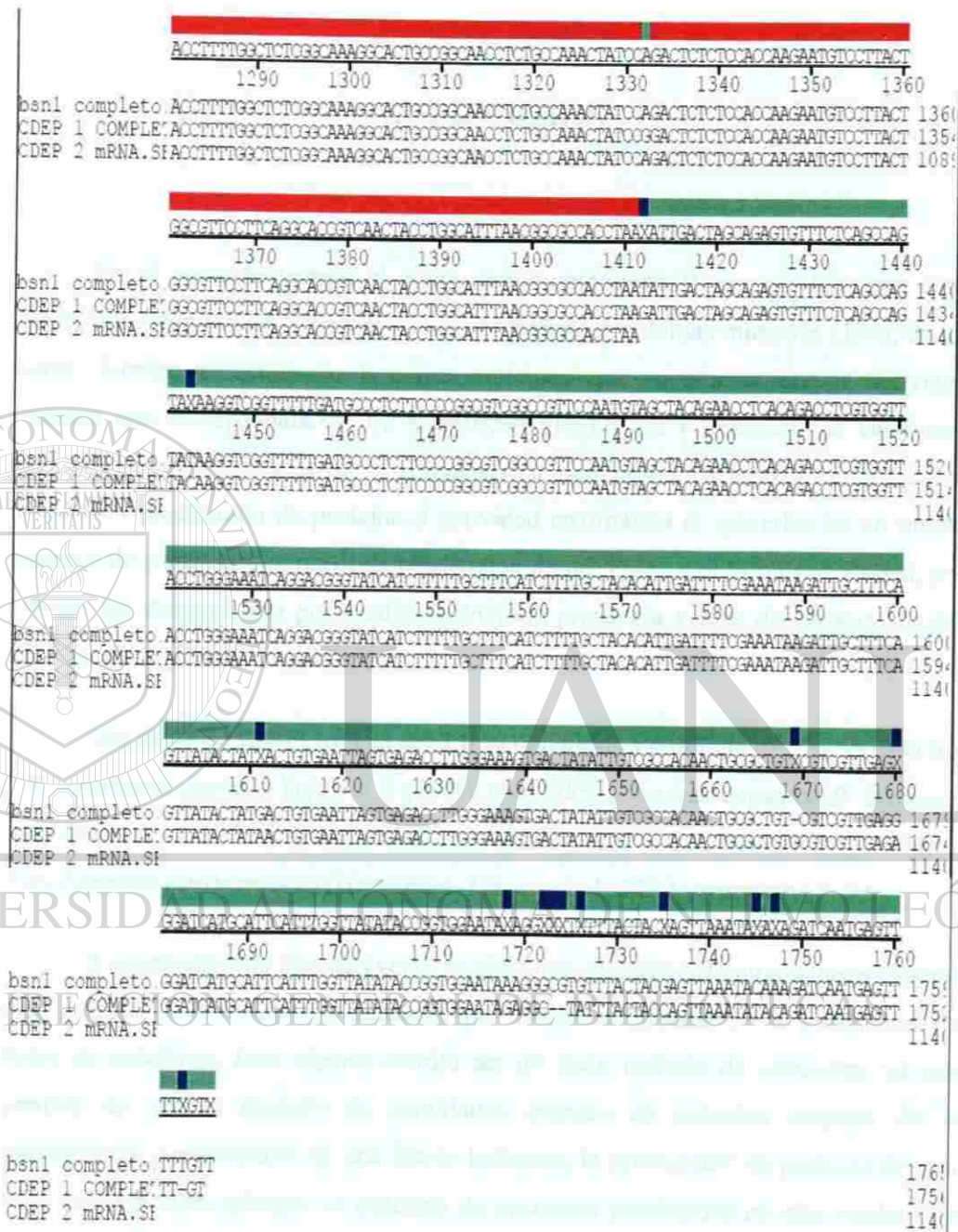

  
 GCGTTTTTGTGGGCTGGGCGGAGCAAGCAATAGGAGTGGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC
   
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
   
 bsnl completo GCGTTTTTGTGGGCTGGGCGGAGCAAGCAATAGGAGTGGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 1040
   
 CDEP 1 COMPLET GCGTTTTTGTGGGCTGGGCGGAGCAAGCAATAGGAGTGGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 1030
   
 CDEP 2 mRNA.SI GCGTTTTTGTGGGCTGGGCGGAGCAAGCAATAGGAGTGGGCAAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 837


  
 ACGTGGAGCTACCGACTGCTGAGCAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC
   
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
   
 bsnl completo ACGTGGAGCTACCGACTGCTGAGCAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 1120
   
 CDEP 1 COMPLET ACGTGGAGCTACCGACTGCTGAGCAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 1110
   
 CDEP 2 mRNA.SI ACGTGGAGCTACCGACTGCTGAGCAGGAGTTCAGGAGTACCAAGAGGAGTCCATTTTGGGCTCAGAGTCTCTGAGAC 917


  
 CACTGGCATTCCTGTGACCTGGAATAATGGGCACTGTGAGTTTCTGTTTTGCATCAGCGTTCACAAATAAAACCTGGA
   
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
   
 bsnl completo CACTGGCATTCCTGTGACCTGGAATAATGGGCACTGTGAGTTTCTGTTTTGCATCAGCGTTCACAAATAAAACCTGGA 1200
   
 CDEP 1 COMPLET CACTGGCATTCCTGTGACCTGGAATAATGGGCACTGTGAGTTTCTGTTTTGCATCAGCGTTCACAAATAAAACCTGGA 1190
   
 CDEP 2 mRNA.SI TACTGGCATTCCTGTGACCTGGAATAATGGGCACT----- 955


  
 AGCTGACTTTTTTTTGGCAGCTAGCAATACCATCTGGGCACTTGGATGGGCACTGCGGCACTTCCACATTGCGGCTCTGGTGGCT
   
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
   
 bsnl completo AGCTGACTTTTTTTTGGCAGCTAGCAATACCATCTGGGCACTTGGATGGGCACTGCGGCACTTCCACATTGCGGCTCTGGTGGCT 1280
   
 CDEP 1 COMPLET AGCTGACTTTTTTTTGGCAGCTAGCAATACCATCTGGGCACTTGGATGGGCACTGCGGCACTTCCACATTGCGGCTCTGGTGGCT 1270
   
 CDEP 2 mRNA.SI -----ATAACCATCTGGGCACTTGGATGGGCACTGCGGCACTTCCACATTGCGGCTCTGGTGGCT 1000





**Figura 37** Comparación de la secuencia de nucleótidos por medio del programa LaseGene (DNAsar ver. 4.05) utilizando Clustal W; para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, Bsn1 (Kim *et al.*, 1999); CDEP-1 (Fang *et al.*, 2001) y CDEP-2 (Zeng *et al.*, 2006).

## 7.0 DISCUSION

En el presente trabajo el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cepa BbCh 1, fue expuesto a luz ultravioleta, obteniéndose colonias mutantes (136), de las cuales fueron seleccionaron 6 cepas mutantes que mostraron mayor actividad proteasa que la cepa paterna. La estabilidad bioquímica y genética fue verificada mediante resiembras sucesivas y alternadas en agar caseína y agar YPD, así como también la producción de proteína y actividad enzimática al crecerlas en un medio inductor de proteasas, su perfil de producción de proteasas y el tipo de actividad, por último, fue determinada por medio de PCR la presencia y tipo de proteasa en las cepas paterna y mutante M82.

Los datos de sobrevivencia del 1.0 % obtenidos a 4 min de exposición a la luz UV, resultaron ser más bajos al 5 y 10% obtenidos con otras cepas de *B. bassiana* (Okino *et al.*, 1978; Vasseur *et al.*, 1990; Hegedus y Khachatourians, 1994) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Hernández-Torres, *et al.*, 2004), respectivamente.

A pesar que este tipo de evento es aleatorio, el ensayo de mutagénesis reportó alrededor de 10, 000 colonias mutantes que fueron examinadas en su producción de halos de hidrólisis. Esta técnica resultó ser un buen método de selección, ya que permite un rápido examen de cantidades grandes de colonias después de la mutagénesis y así evaluar, en una forma indirecta, la producción de proteasa de una cepa en particular, además, el espectro de proteasas producidas en este medio que contiene leche descremada, es muy similar al obtenido en cultivos con cutícula de insecto (St. Leger *et al.*, 1987; 1994).

Las técnicas empleadas para llevar a cabo la mutagénesis junto con las utilizadas para seleccionar las cepas mutantes sobreproductoras de proteasas, son relativamente sencillas y con buenos porcentajes de recuperación de mutantes, esto

debido a la habilidad de la luz UV tiende a generar mutaciones puntuales en vez de daños mas grandes al DNA, tales como deleciones (Bidochka y Khachatourians, 1990; 1993).

Al comparar el aspecto morfológico de las cepas mutantes, algunas cepas, aunque presentaban un halo de hidrólisis mayor al de la paterna, el crecimiento era muy pobre, caso concreto el de las mutantes M-24 y M-82; todas las mutantes seleccionadas presentaron abundante esporulación excepto la mutante M-82, cuya esporulación fue muy pobre, la decisión de seguir trabajando con la mutante M-82, a pesar de que el crecimiento y esporulación pobre que presentó, fue debido a que esta cepa produjo uno de los mayores halos de hidrólisis, además, de que presentó un perfil de producción de proteasas muy diferente al de la cepa paterna.

Seis cepas mutantes produjeron los halos de hidrólisis mayores que el de la paterna cuando se crecieron en placas de AC y fueron estables al menos a 5 subcultivos en AC y agar YPD; las mutantes M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 y M-82 las cuales fueron sembradas en un medio inductor de proteasas, en el cual la producción de proteína fue muy similar para todas las cepas, en cuanto a la actividad enzimática, la máxima alcanzada a las 72 h en todas las cepas estudiadas, excepto en la mutante M-82, que presentó la mayor actividad enzimática a las 48 h, hecho por demás interesante y por lo cual se decidió, además del halo de hidrólisis que producía, realizar los ensayos de regulación en esta cepa.

Alguna de las cepas mutantes, mostraron un perfil de producción de proteasa diferente al de la cepa paterna. Las mutantes M-24 y M-41 presentaron el mismo perfil de producción de proteasas que la cepa paterna, pero con una actividad mayor. Las diferencias que muestran algunas de las cepas mutantes que obtuvimos, puede deberse entre otras cosas, a la desregulación de diversos genes de otro tipo de proteasas, ya que la mutación por luz UV es un evento completamente al azar.

Aunque algunas cepas mutantes presentan un numero mas elevado de proteasas, esto no significa que todas sean tóxicas contra insectos, porque aunque Kucera y Samsinakova (1968) reportaron proteasas de alto y bajo peso molecular, producidas por una cepa de *B. bassiana*, Kucera (1971) reportó que la producción de dichas proteasas esta influenciada por el tipo de fuente de nitrógeno; en todas las

cepas puede observarse una banda de actividad principal de entre 29 y 36 kDa, que corresponde a una proteasa reportada por Bidochka y Khachatourians (1987), que reportaron una sola proteasa producida por *B. bassiana* en cultivos con cutícula, con un peso molecular de 36 kDa y la cual determinaron que era tóxica contra insectos.

De acuerdo a los ensayos de actividad en soporte, las proteasas de las cepas paterna, así como también las de las cepas mutantes mostraron actividad tipo quimioproteasa y tipo elastasa. Han sido aisladas quimioelastasas de varios fluidos de cultivos de hongos, en aislados patógenos de *B. bassiana*, *V. lecanii*, *Nomuraea rileyi* y *Aschersonia aleyrodis* (St. Leger *et al.*, 1987), indicando que este tipo de enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Cabe mencionar que ninguna de las proteasas de ninguna cepa mostraron actividad tipo tripsina, ya que no hidrolizaron el sustrato BApNA, estos resultados son similares a los reportados para otras proteasas purificadas de *B. bassiana* (Bidochka y Khachatourians, 1987; St. Leger *et al.*, 1986; Urtz, 2000), en contraste con otras proteasa producidas por otros hongos entomopatógenos, como *Lagenidium giganteum* (Dean, 1983) y *M. anisopliae* (St. Leger, 1986).

Por otra parte, de acuerdo al ensayo de inhibición enzimática en soporte, el tipo de actividad en la totalidad de las proteasas producidas por las diferentes cepas, paterna y mutantes, fue inhibida al usar PMSF, indicando que hay un residuo de serina en el sitio activo, por lo que las proteasas producidas por la cepa paterna y las cepas mutantes, pertenecen a la familia de las serino proteasas. En medios con gelatina, como inductor, *B. bassiana* cepa GK 2016 produce una serino proteasa extracelular de cerca de 35 kDa (Bidochka y Khachatourians, 1987). Las serino proteasas se encuentran ampliamente distribuidas entre casi todas las especies de hongos y casi todas ellas son extracelulares, sus pesos moleculares oscilan comúnmente en el rango de 18.5 a 35.0 kDa y su pH óptimo de actividad es alcalino (Rao *et al.*, 1998).

En los ensayos de inducción-represión bioquímica, en medio inductor, ambas cepas presentaron una actividad notable, la cepa mutante 24 h antes que la cepa paterna. *M. anisopliae* y *B. bassiana* regulan la producción de sus proteasas por los niveles de acetyl-D-glucosamina en el medio mediante una acción de inducción-represión (Smith y Grula, 1983; St. Leger *et al.*, 1986). Además, la adición de nitrato



de amonio a medios que contienen glucosa y gelatina reprimen la producción de proteasas por miligramo de peso seco (Bidochka y Khachatourians, 1988). Esto sugiere que la producción de proteasas por *B. bassiana* no solo es regulada por un simple circuito de catabolismo de carbono como la glucosa. Una proteasa, que es una glicoproteína, que ha sido extensamente estudiada en *N. crassa* (Abbot y Marlzof, 1984), esta sujeta a un circuito de multirregulación, donde tres genes regulatorios independientes están reprimidos por cisteína, glutamina y algunos productos de glucosa (Hanson y Marlzof, 1975).

La presencia ya sea de glucosa, manitol, glicerol o trehalosa, con amonio en un medio conteniendo gelatina reprime la producción de la proteasa. Algunos experimentos muestran que cAMP (5 Mm) libera glucosa e induce la represión de la producción de la proteasa (Bidochka y Khachatourians, 1988) por lo tanto podemos pensar que la producción de proteasas esta sujeta a una represión por catabolito, como ocurre con el operón *lac*. Como el comportamiento en los diferentes medios (inductor y represor) tanto de la cepa mutante como de la cepa paterna fue muy similar en cuanto a la producción de enzima, se puede decir que su sistema de producción de proteasa no esta desregulado, y que la mutación no fue lo suficientemente significativa para este efecto.

Por último fue determinado el tipo de proteasa presente en las cepas, al hacer una comparación de la secuencia de aminoácidos de tres proteasas reportadas (Pr1, Bsn1 y CDEP-2. Figura 14), el análisis demostró que las secuencias son muy similares entre si, teniendo en algunas partes, algunas variaciones, mismas que no representan diferencias importantes, cabe mencionar que los residuos (D, H y S) del sitio activo están conservados en todas las proteínas analizadas, así como también los sitios de procesamiento de propéptido y péptido maduro, tres de las proteínas son mas parecidas más entre si, Bsn1, CDEP-1 y CDEP-2, Pr1 muestra algunas diferencias con estas tres sobre todo en el extremo carboxilo terminal.

La identificación de proteasas comenzó con el diseño de iniciadores basados en la secuencia nucleotídica de la proteasa Pr1, que ha sido más ampliamente reportada y estudiada (Bidochka, 1987; Bidochka y Khachatourians, 1994; St Leger, *et al.*, 1987; Joshi *et al.*, 1995). Se diseñaron dos pares de iniciadores basados en

dicha secuencia, pero con ninguno de ello fue posible amplificar el fragmento esperado.

Al no amplificar ningún fragmento con los iniciadores basados en la secuencia nucleotídica de Pr1 se diseñaron nuevos iniciadores para una secuencia de una proteasa denominada Bsn1 y reportada por Kim *et al.* (1999), estos iniciadores se localizaron en la parte inicial del gen (+6-+524 pb) y llamados AAP3 y otro par en la parte final del gen (+990-+1391 pb), AAP4. Solo con los iniciadores AAP3, fue posible amplificar un fragmento esperado de 519 pb, localizado en la parte inicial del gen, mientras que al emplear los iniciadores AAP4 no amplificó ningún producto.

Al utilizar un iniciador basado en Pr1, (AAP1, localizado en -60/-34) y otro basado en Bsn1 (AAP3r, localizado en +505/+524) fue posible amplificar un fragmento de alrededor de 600 pb, pero al utilizar cualquier otro iniciador localizado hacia el final de cualquiera de las dos secuencias reportadas, no amplificó ningún producto.

En base a estos resultados, se pensó entonces en la posibilidad de que se tratara de una proteasa diferente a Pr1 y Bsn 1 y que por lo tanto las diferencias importantes estaban localizadas en la parte final de la secuencia nucleotídica. En este punto de la investigación se buscaron nuevas secuencias reportadas para alguna proteasa diferente a Pr1 y Bsn1, descubriendo en el GeneBank una nueva secuencia reportada para una proteína degradadora de cutícula denominada CDEP-2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=124110803>) en el último trimestre del 2006. por lo que se realizó una nueva comparación tomando en cuenta esta nueva secuencia reportada por medio del programa Clustal W. El análisis de dichas secuencias dio como resultado el diseño del iniciador CGS 1, basado en la secuencia de la proteína CDEP- 2.

La localización de los iniciadores puede observarse en la figura 20, es de notarse que todos los iniciadores diseñados en las partes inicial de los genes (extremo 5''), pueden usarse arbitrariamente, ya que en esta parte, los genes que codifican las tres proteínas son exactamente iguales, mientras que todos los iniciadores diseñados hacia el final de la secuencia nucleotídica (extremo 3') no, ya que es ahí donde se

encuentran las mayores diferencias entre los genes; las secuencias de Bsn1, CDEP-2 y CDEP-1 fueron muy parecidas entre sí, excepto la de Pr1, que mostró las mayores diferencias sobre todo en la parte final del gen, por dicha situación no amplificó ningún fragmento con los iniciadores diseñados en base a dicha secuencia, concluyendo entonces, que las proteasas producidas por las cepas analizadas no son del tipo Pr1 y que muy probablemente sean de la familia de las CDEP ó Bsn1, esto no lo podemos concluir, debido a que las secuencias de nucleótidos de estas tres proteínas es muy similar, además, que la comparación no fue llevada a cabo de manera completa, ya que para una de las proteínas CDEP, solamente existe reportada la secuencia de mRNA.

En años pasados muchas de las investigaciones sobre hongos entomopatógenos han sido enfocadas al mejor entendimiento del modo de acción y para determinar el rol preciso de cada una de las enzimas involucradas en el proceso de infección, en especial de proteasas y quitinasas. El desarrollo mediante mutación con luz ultravioleta de cepas de *B. bassiana* deficientes en la producción de proteasa, ha sido una herramienta importante para determinar el papel que juegan las proteasas en la patogenicidad (Bidochka y Khachatourians, 1990).

Por otro lado, es una buena herramienta para generar cepas mejoradas de hongos entomopatógenos, Vasseur (1990) usó luz UV para producir mutantes sobreproductoras de quitinasas de *Aphanocladium album*, Hernández-Torres y colaboradores (2004), obtuvo una cepa mutante sobreproductora de quitinasas de *P. fumosoroseus* mediante el uso de luz UV además de correlacionarla con la virulencia contra larvas del insecto *Bemisia tabaci*., ya que las cepas con actividad proteolítica incrementada, pueden ser consideradas buenas herramientas para el control biológico de insectos plaga, ya que como se mencionó anteriormente, las proteasas tienen un papel muy importante en los eventos de penetración de la cutícula (St. Leger *et al.*, 1987, 1995; Bidochka y Khachatourians, 1990), además que se ha demostrado que utilizando cepas sobreproductoras de proteasas, se disminuye considerablemente el tiempo de infección y muerte del insecto (St. Leger *et al.*, 1996).

## 8.0 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante la presente investigación y bajo las condiciones en que se realizó, se concluye lo siguiente:

- Se estableció un sistema de mutagénesis y detección de mutantes con mayor actividad proteolítica.
- Fueron aisladas 6 cepas mutantes (M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 y M-82), las cuales presentaron mayor actividad enzimática que la cepa paterna.

- La producción de enzimas fue similar todas las cepas, salvo que en la cepa mutante M 82, la aparición de actividad se presentó 24 h antes que en la paterna.

- Las mutantes M-7, M-36 y M-82 presentaron un perfil de producción de proteasas diferente al de la cepa paterna.

- Todas las proteasas de las cepas analizadas presentaron actividad tipo quimiotripsina y tipo elastasa.

- Ninguna de las proteasas producidas por las cepas analizadas presentó actividad tipo tripsina.
- Las proteasas producidas por las cepas paterna y mutantes pertenecen a la familia de las serino proteasas al ser inhibida su actividad por PMSF.
- El mecanismo de regulación de la proteasa de interés no fue afectado por la mutación.
- La producción de la proteasa presenta un mecanismo de regulación catabólica.
- Ninguna de las proteasas producidas por las cepas analizadas

son del tipo Pr1.

- Nuestros resultados sugieren que la proteasa encontrada en la cepa paterna y en la mutante M-82 pertenece al grupo de las proteasas CDEP.

## 9.0 LITERATURA CITADA

1. Abbot, R. J. y G. A. Marzluf. 1984. Major extracellular protease of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 159:505-510.
2. Al-Aidroos, K. y Roberts, D.W. 1976. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. Can. J. Genet. Cytol. 20: 211-219.
3. Arst, H. N. y M. A. Peñalva. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 426-446.
4. Baret, A.J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods enzymol. 244:145.
5. Baret, A.J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods Enzymol. 244:145.
6. Bateman, R.P. 1992. Controlled droplet application of mycopesticides to locusts. En Lomer, C.J. y Prior, C. (Eds). Biological control of locusts and grasshoppers (pp. 249-254). CAB International. Redwood press Ltd, Melkshan. UK p 394.
7. Bateman, R.; Carey, M.; Moore, D. y Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Annals of Applied Biology. 122: 145-152.

8. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1993. Oxalic acid hyperproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to an utilizable carbon source but not to virulence. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 53-57.
9. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1679-1684.
10. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1988. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Micol.* 12:161-168.
11. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 165-173.
12. Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 165-173.

---

13. Bidochka, M.J. 1989. Interaction of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*: a systematic study of pathogenesis. Ph. D. Thesis. University of Saskatchewan. Canada.
14. Bidochka, M.J. y Khachatourianas, G.G. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 64:26-32.
15. Blackwell, J. y Weih, M.A. 1980. Structure of chitin-protein complexes: ovipositor of the ichneumon fly *Megarthyssa*. *J. Mol.Biol.* 137: 49-60

16. Boucias, D.G. y Pendland, J. C. 1991. The cell fungal wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts, p. 303-316. En J.-P. y D. Latge G. Boucias (ed.), Fungal cell wall and immune response. Springer-Verlag KG, Heidelberg.

17. Boucias, D.G.: Pendland, J.C. y Latge, J.P. 1988. Nonspecific factors in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 54:1795-1805.

18. Bradfish, G. A. y Harper, S. L. 1990. Omega-Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). Toxicon 28:1249-54.

19. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

20. Bradley, C.A.; Black, W.E.; Kearns, R. y Wood, P. 1992. Role of production technology in Mycoinsecticide development. En: Leatham, G.F. Ed. Frontiers in industrial mycology. Chapman and Hall, New York, pp 160-173.

21. Burges, H.D. 2000. Techniques for testing microbials for control of arthropod pests in greenhouses. En: "Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests" (L.A. Lacey y H.K. Kaya Eds.), 505-526. Kluwer Academic, Dordrecht.

22. Butt, T.M. y Copping, L.G. 2000. Fungal Biological control agents. Pesticide outlook. October. 186-191.

23. Caddick MX; Arst HN; Taylor LH; Johnson RI. y Brownlee AG. 1986. Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. EMBO J. 5:1087-1090.



24. Cenis, J.L., 1992: Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20:2380.

25. Charnley, A.K. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In *The biotechnology of fungi for improving plant growth*. Ed. J.M. Whipps, R.D. Lumsden. pp 85-125. London: Cambridge Univ. Press.

26. Charnley, A.K. 1992. Mechanisms of Fungal Pathogens of Pest Insects with Particular Reference to Locusts. In *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. Edited by C.J. Lomer y C. Prior CAB International, Wallingford, U.K. pp. 181-190.

27. Charnley, A.K. y St. Leger, R.J. 1991. The role of the cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In *the fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Ed. Cole, G.T.; Hoch, H.C. pp 267-286. New York: Plenum.

28. Clark, T.B.; Kellen, W.R.; Fukuda, T. y Lindegren, J.E. 1968. Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 1-7.

29. Clarkson, J.M. y Charnley, A.K. 1996. New insights into the mechanism of fungal pathogenesis in insects. *Trends. Microbiol.* 4:197-203.

30. Cox, D. y Willis, J. H. 1987. Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with two dimensional electrophoresis. *Insect Biochem.* 17: 457-468.

31. Dean D. D. y A. J. Domnas. 1983. Extracellular enzymes of the mosquito parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. *Exp. Mycol.* 7:31-39.

32. Delgado, J.H.; Britton, M.L.; Lobo-Lima y Razafindratiana, E. 1997. Field and laboratory evaluations of leading entomopathogenic fungi isolated from *Locusta*

*migratorio* Sauss in Madagascar. Memoirs of the Entomological society of Canada. 171:323-328.

33. Dever, T.E.; Feng, L.; Wek, R. C.; Cigan, A. M.; Donahue, T.F y A.G. Hinnebusch. 1992. Phosphorylation of initiation factor 2 $\alpha$  by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GON 4 in yeast. Cell 68:585-596.

34. El-Sayed, G. N., Coudron, T. A., Ignoffo, C. M. y Riba, G. 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 54: 394-403.

35. Eyal, J.; Mabud, A.; Fischbein K.L.; Walter, J.F.; Osborne, L.S. y Landa, Z. 1994. Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 Strain Wich Produces a Red Pigment for Microbial Control. App. Biochem. Biotech. 44: pp 65-80.

36. Feng, M.G.; Popraski, T.J. y Khachatourians, G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Sci. Technol. 4: 4-34.

37. Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annu. Rev. Entomol. 23:701-714.

38. Forst, S. y D. Clarke 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. Entomopathogenic Nematology. R. Gaugler. CAB International, Wallingford. Oxon. UK., CABI Publishing: 57-78.

39. Gabriel, B. P. 1968. Histochemical study of the insect cuticle infected by *Entomophthora coronata*. J. Invertebr. Pathol. 11: 82.

40. Gielkens, M.C.C.; Dekkers, E.; Visser, J. y Graaf, L.H. 1999. Two cellobiohydrolase-D-xylose and the xylanolytic transcriptional encoding genes from

*Aspergillus niger* require activator *XlnR* for their expression. Applied Environmental Microbiology, 64:4340-4345.

41. Godfrey, T. y west, S. 1996. Industrial enzymology. 2<sup>nd</sup>. Ed. P 3. Mac Millan publishers Inc. New York. NY.

42. Goettel, M. S. y St Leger, R. J.. 1990. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. Curr. Genet. 17: 129-132.

43. Goettel, M.S. y Jaronski, S.T. 1997. Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological society of Canada. 171:83-99.

44. Goettel, M.S. y Johnson, D.L. 1992. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents. En Lomer, C.J. y Prior, C. (Eds). Biological control of locusts and grasshoppers (pp 356-361). CAB International, Redwood Press Ltd, Melkshan, UK.

45. Goettel, M.S.: St. Leger, R.J.: Rizzo, N.W.: Staples, R.C. y Roberts, D.W. 1989. Ultraestructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. J. Gen. Microbiol. 135: 2233-2239.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

46. Griesch, J. y Vilcinskas, A. 1998. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth. *Galleria mellonella*. Biocontr. Sci. Technol. 8: 517-531.

47. Gunnarsson, S.G.S. 1988. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. J. Invertebr. Pathol. 52: 9-17.

48. Gupta, S.C.; Leathers, T.D.; El-Sayed, G.N. e Ignoffo, C.M. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 64:13-17.
49. Gupta, A.P. 1986. Hemocytic and humoral immunity in arthropods. Wiley, New York. U.S.A.
50. Gupta, S. C., Leathers, T. D., El-Sayed, G. N. e Ignoffo, C. M. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 64: 13-17.
51. Hajek, A.E. y St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.
52. Hall, R.A. 1980. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 36:216-222.
53. Hanson MA y Marzluf GA. 1975. Control of the synthesis of a single enzyme by multiple regulatory circuits in *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci. 72:1240-1244
54. Hartley, B.S. 1960. Proteolytic enzymes. Annu. Rev. Biochem. 29:45-72.
55. Hayden, T.P.; Bidochka, M.J. y Khachatourians, G.G. 1992. Entomopathogenicity of several fungi toward the English grain aphid (Homoptera:Aphididae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. J. Econ. Entomol. 85: 58-64.

56. Hegedus, D. D. y G. G. Khachatourians. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Review. *Biotechnology Advances*, 13:455-490.
57. Hegedus, D. D., T. A. Pfeifer. 1991. Cloning and analysis of five mitochondrial tRNA- encoding genes from the fungus *Beauveria bassiana*. *Gene* 109: 149-54.
58. Hepburn, H. R. 1985. Structure of the integument. En: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G.A. Kerkut y L.I. Gilbert, Eds.). 3. 1-58. Pergamon, Oxford.
59. Hernández-Crespo, P y Santiago-Alvarez, C. 1997. Entomopathogenic fungi associated with natural populations of the Moroccan locust *Dociopterus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Gomphocerinae and other Acridoidea in Spain. *Biocontrol Science and Technology*. 7:357-363.
60. Hernández-Torres, I., Iracheta, M., Galán-Wong, L., Hernández, C., Contreras, J., Jackson, M., y Pereyra-Alferez, B. 2004. A *Paecilomyces fumosoroseus* mutant over-producing chitinase displays enhanced virulence against *Bemisia tabaci*. *W.J. Microbiol. Biotechnol.* 20:307-310.
61. Hernández-Velazquez, V.M. y Berlanga-Padilla, A.M. 1996. Control microbiano de hongos entomopatógenos. Memoria. II Curso de actualización en control biológico. Tecmán Colima. Pp. 94-106.
62. Hüber, J. 1958. Untersuchungen zur physiologie insektentötender pilze *Beauveria bassiana*. *Arch. Microbiol.* 29: 257.
63. Humber, R.A. 1981. Collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of strains, 1992. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-110, pp 177.

64. Hung, S.Y.; Boucias, D.G. y Vey, A.J. 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. J. invertebr. Pathol. 61: 179-187.
65. Hung, S.Y.; Boucias, D.G. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworms *Spodoptera exigua*. J. invertebr. Pathol. 60: 152-158.
66. Hupmhreys, A.M.; Matewele, P.; Cunlife, B. y Trinci, A. 1990. Comparison of sporulation of *Paecilomyces farinosus* and *Beauveria bassiana* in batch and fed-batch culture. Mycological research. 94: 1046-1050.
67. Huxham, I.M.; Samuels, K.D.Z.; Heale, J.B. y Mc Corkindale, N.J. 1989b. in vivo and in vitro assays for pathogenicity of wild type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. J. invertebr. Pathol. 53: 143-151.
68. Huxham, I.M.; Lackie, A.M. y McCorkindale, M.J. 1989a. Inhibitory effects of cyclopeptides, dextruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity in insects. J. insect Physiol. 35: 97-105.
- 
69. Ignoffo, C.M. 1979. Bioinsecticides. Chap. 1. En: Microbial Technology. Microbial Processes. Vol.1 Pipler and Perlan Ed. Academic. Press: 1-27.
70. Ignoffo, C.M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomol. 75:516-525.
71. Ignoffo, C.M.; García, C.; Kroha, M. y Couch, T.L. 1982. Use of larvae of *Trichoplusia ni* to bioassay conidia of *Beauveria bassiana*. J. Econom. Entomol. 75: 275-276.

72. Jackson, M. A. y R. J. Botahst. 1990. Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. Appl. Environ. Microbiol, 56: 3435-3438.
73. Jarai, G., y F. Buxton. 1994. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. Curr. Genet. 26: 238-244.
74. Jeffs, L.B. y Khachatourians, G.G. 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Meterhizium* y *Tolyposcladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. Can. J. Microbiol. 43: 23-28.
75. Jenkins, N.F.; Prior, C. 1993. Growth and formulation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. Mycology research, 97(12):1489-1494,
76. Jenkins, N.E. y Goettel, M.S. 1997. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological society of Canada. 171:37-48.

---

77. Jenkis, N.E.; Heviefo, G.; Langewald, J.; Cherry, A.J. y Lomer, C.J. 1998. Development of a mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticide. Biocontrol News and Information 19(1):21N-31N. ®

78. Joshi, L., St. Leger, R. J., Bidochka, M. J. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiol. Lett. 125:211-218.
79. Khachatourians, G. G. 1986. Production and use of biological pest control agents. TIBTECH: 120-124.

80. Kim, H.K.; Hyang-Sook, H.; Dong Sang, S.; Sun Chul, K.; Churwon, H. y Suk-Tae, K. 1999. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. *Biotechnology Letters*. 21:777-785.
81. Kucera M. 1971. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture.. *J Invertebr Pathol*. 17:211–215.
82. Kucera, M., y Samsinakova, A. 1968. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol*. 12: 680-685.
83. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-683.
84. Leopold, J. y Samsinakova, S. 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *J. Invertebr. Pathol*. 15: 34.

---

85. Lomer, C.J.; Prior, C. y Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological society of Canada*. 171:265-286.

86. MacCabe, A.P., M. Orejas, J.A. Perez-Gonzalez, y D. Ramon.1998. Opposite patterns of *Aspergillus nidulans* expression of two xylanase genes with respect to ambient pH. *J. Bact*. 180: 1331-1333.

87. Magasanik, B. 1992. Regulation of nitrogen utilization. En E. W. Jones, J. R. Pringle, y J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.



88. Marmaras, V.J. Chacalambidis, N.P. y Zervas, C.G. 1996. Immune response in insects: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 119-133.
89. Messias, C.L.; Daoust, R.A. y Roberts, D.W. 1986. Virulence of natural isolate, auxotrophic mutants, and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 47:231-233.
90. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
91. Milner R.J., Prior C. 1994. Susceptibility of Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*, and the wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*, to the fungi, *Metarhizium* spp. *Biological Control* 4: 132-137.
92. Miranpuri, G.S. y Khachatourians, G.G. 1991. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomol. Exp. Appl.* 59:19-27.

---

93. Okino, L.A.; Silva, J.C.; Santos, A.L.L.; Messias, C.L.; Azevedo, J.L. 1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *O Solo*. 70:32-36. ®

94. Old, R. W. y Primrose, S. B. 1985. Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
95. Pendland, J.C. y Boucias, D.G. 1984. Production and regeneration of protoplasts in the entomogenous hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 43:285-287.

96. Pendland, J.C.; Heat, M.A. y Boucias, D.G. 1988. Function of a galactose-binding lectin from *Spodoptera exigua* larval hemolymph: opsonization of blastospores from entomogenous hyphomycetes. *J. Invertebr. Physiol.* 34:533-540.
97. Pfeifer, T.A. y Khachatourians, G.G. 1992. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:376-381.
98. Phadarate, S.U.; Srinivasab, M.C. y Deshpande, V.V. 1992. Evidence for controlled autoproteolysis of alkaline protease: a mechanism for physiological regulation of conidial discharge in *Conidiobolus coronatus*. *Eur. J. Biochem.* 205:679-686.
99. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge y V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.
100. Rath, A.C.; Guy, P.L. y Webb, W.R. 1995. *Metarhizium* spore surface antigens are correlated with pathogenicity. *Mycol. Res.* 100:57-62.

---

101. Romanowski, V. 2002. Engineered baculovirus insecticides. The 35th annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Foz Do Iguassu, Brazil. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

102. Samsinakova, A y Kalalova, S. 1983. The influence of a single spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. 42:156-161.
103. Samsinakova, A.; Misikova, S. y Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *J. Invertebr. Pathol.* 18, 322-330.

104. Samuels, K.D.Z.; Heale, J.B. y Llewellyn, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Niaparvata lugens*. J. Invertebr. Pathol. 53:25-31.
105. Samuels, R.I., Charnley, A.K. y Reynolds, S.E. 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Mycopathologia 104: 51-58.
106. Saul, S.J. y Sugumaran, M. 1987. Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 5:1-11.
107. Saunders, V.A. y Saunders, J.R. 1987. In vivo and in vitro mutagenesis in Microbial Genetics Applied to Biotechnology (Saunders, V.A. and Saunders, J.R., eds.) pp. 163–218, MacMillan, New York
108. Schmit AR, Ratcliffe NA. 1977. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. J Insect Physiol.23:175–184.

---

109. Schmith, A.R.; Rowley, A.F. y Ratcliffe, N.A. 1977, The role of *Galleria mellonella* hemocytes in melanin formation. J. Invertebr. Pathol. 29: 232-234. ®

- DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
110. Secades, P. y Guijarro, J.A. 1999. Characterization and purification of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Applied and Environmental Microbiology. 65:3969-3975.
111. Shah, P.A. y Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:413-423.

112. Shah, P.A.; Godonou, I.; Gbongboui, C y Lomer, C.J. 1994. Natural leaves fungal infections in grasshoppers in northern Benin. *Biocontrol Science and Technology*, 4:331-341.
113. Shimizu, S. y Hayata, C. 1990. Cryopreservation of protoplast of an entomogenous fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invertebr. Pathol.* 56:283-285.
114. Shortle D, DiMaio D. y Nathans D. 1981. Directed mutagenesis. *Annu Rev Genet.* 15:265-294.
115. Siebeneicher, S.R.; Vinson, S.B. y Kenerly, C.M. 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *J. Invertebr. Pathol.* 59:280-285.
116. Smith, R.J. y Gula, E.A. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 42:319-326.
117. Smith, R.J.; Pekrul, S. y Gula, E.A. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* 38: 335-344.
118. Soderhall, K. y Smith, V.S. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition and defense system in arthropods. En: "Humoral and cellular immunity in arthropods". (P. Gupta, Ed.). pp. 251-285. Wiley, New York.
119. St Leger, R. J. y D. W. Roberts. 1991. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol* 57: 299-310.
120. St Leger, R. J., Frank, D.C.; Roberts, D.W. y Staples, R.C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading- protease structural gene

from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Eur J Biochem 204(3): 991-1001.

121. St Leger, R., Joshi, L.; Bidochka, M.J. y Roberts, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proc Natl Acad Sci USA 93:6349-6354

122. St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W. y Roberts, D. W. 1996a. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 62: 907-912.

123. St. Leger, R.J. 1991. Integument as a barrier to microbial infections. In The physiology of insect epidermis. Ed. A. Retnakaran, K. Binnington. pp. 286-308. Australia CSIRO.

124. St. Leger, R.J., Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. J. Invertebr. Pathol. 48: 85-95.

125. St. Leger, R.J., Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. J. Invertebr. Pathol. 47: 167-177.

126. St. Leger, R.J., Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 198c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. . J. Invertebr. Pathol. 47: 295-302.

127. St. Leger, R.J., Durrands, P.K., Charnley, A.K. y Cooper, R.M. 1988 Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 52: 285-293.

128. St. Leger, R.J.; Cooper, R.M. y Charnley, A.K. 1987. Production of cuticle degrading enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. J. Gen. Microbiol. 133: 1371-1382.
129. St. Leger, R.J.; Nelson, J.D. y Screen, S.E. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. Microbiology. 145:2691-2699.
130. St. Leger, R.J.; Staples, R.C. y Roberts, D.W. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. J. Invertebr. Pathol. 61:81-84.
131. Tamez-Guerra, P., L. J. Galán-Wong, H. Medrano-Roldán, C. García-Gutiérrez, C. Rodríguez-Padilla, R. A. Gómez-Flores y R. S. Tamez-Guerra. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*. 4: 143-152.

---

132. Tanada, Y. y Kaya, H.K. 1993. Insect pathology. Academic Press. San Diego, CA, U.S.A. pp 666. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

133. Urtz, B.E. y Rice, W.C. 2000. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. Mycol Res 104, 180-186.
134. Vasseur, V., Arigoni, F., Andersen, H., Defago, G., Bompeix, G. y Seng, J. M. 1990. Isolation and characterization of *Aphanocladium album* chitinase-overproducing mutants. J. Gen. Microbiol. 136: 2561-2567.
135. Veen, K. H. 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 9: 276-278.

136. Vinokurov, K. S., B. Oppert y E. N. Elpidina. 2005. An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates. *Anal. Biochem.* 337:164-166.
137. Waldschmidt, A., Salomao, y Barros, T.E. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apiadae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.* 20, no.3. ISSN 0100-8455
138. Williams, T. 2002. Development of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus as a bioinsecticide in Mexico and Central America. The 35th annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Foz Do Iguassu, Brazil.
139. Yanagita, T. 1987. Studies on oral infection of larvae of the silkworm *Bombyx mori*, with *Beauveria bassiana*. *J. Sci. Jpn.* 56: 279-284
140. Yeo, H.; Pell, J.K.; Alderson, P.G.; Clark, S.J. y Pye, B.J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphids species. *Pest Manage Sci.* 59: 156-165.
141. Zacharuk, R.Y. 1981. Fungal diseases of terrestrial insects. In: Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Ed. EW Davidson. Pp: 367-402. New Jersey: Alanheld, Osmun.
142. Zhong, C. y D. J. Ellar. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J Invertebr Pathol* 76(2): 131-9.

**APÉNDICE A**  
**SOLUCIONES Y MEDIOS**

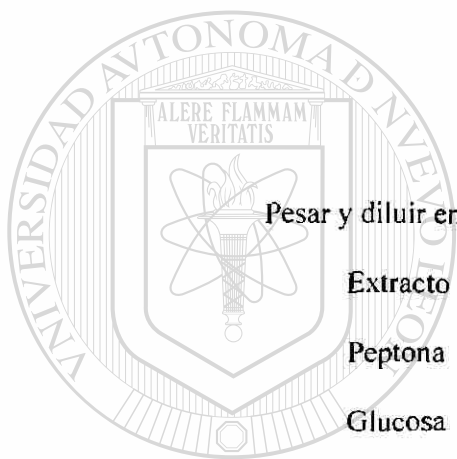
**Tween 80 1%**

- Disolver 1% (vol/vol) de Tween 80 en agua bidestilada.

**Medio YPD**

Pesar y diluir en agua bidestilada:

Extracto de levadura	3 g/l
Peptona	10 g/l
Glucosa	20 g/l



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Medio Inductor**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Pesar y diluir en agua bidestilada:

NaCl	0.3 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 g/l
Gelatina	10 g/l



## Medio Represor

Pesar y diluir en agua bidestilada:

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	3 g/l
Glucosa	10 g/l
Gelatina	10 g/l
NaCl	0.3 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.3 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/l

DNS

### Solución A:

Mezclar 150 g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua bidestilada.

### Solución B:

Calentar y diluir 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 100 ml de NaOH 2N.

Mezclar la solución A y B y aforar a 500 ml.

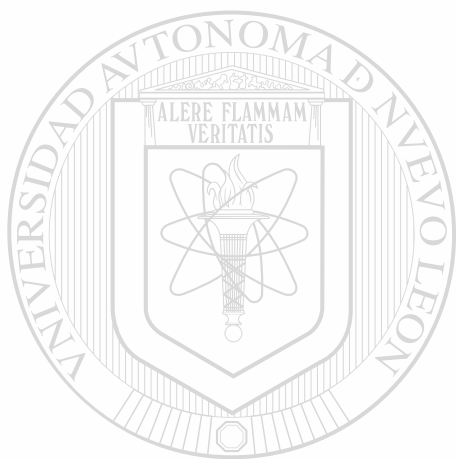
## Caseína 1% para zimogramas

Disolver 10 g/l de caseína en buffer Tris 0.1M.

### Solución de Tinción

Metanol	20 ml
Ácido acético	3.6 ml
Agua bidestilada	26 ml

Agregar y mezclar colorante Coomasie 0.012 g



### Solución de Destinción

Metanol	100 ml
Ácido acético	20 ml
Agua bidestilada	80 ml

### Buffer de Carga no desnaturalizante

Buffer Tris 1M (pH 6.8)	0.31 ml
SDS	2.0 ml
Glicerol	1.0 ml
Agua bidestilada	1.34 ml

### Buffer de Electroforésis de Proteínas 1X

Tris	3.75 g/l
Glicina	18 g/l
SDS	1.25 g/l

### Azocaseína

Pesar y diluir azocaseína al 15 % p/v en buffer de reacción.

Buffer de reacción:

Pesar y diluir  $MgCl_2$  en buffer Tris 25 mM pH 7.6; concentración final 5mM

### Poliacrilamida 10%

Geles de Tris Glicina SDS-poliacrilamida

	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H <sub>2</sub> O	2.0	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	19.8
Acrilamida 30% <sup>a</sup>	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 10% <sup>b</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 10% <sup>c</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Comúnmente: <sup>a</sup>Acrilamida 29.2%, N,N-metil-bis-acrilamida 0.8%; <sup>b</sup>Dodecil Sulfato de Sodio; <sup>c</sup>Persulfato de amonio; <sup>d</sup>N,N,N,N-Tetrametilendiamina.

## APENDICE B

### BUFFERS

#### Buffer Tris 1.5 M (pH 8.8)

Tris

181.5 g/L

Ajustar el pH con HCl

#### Buffer Tris 1.0 M (pH 6.8)

Tris

121.1 g/L

Ajustar el pH con HCl

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Persulfato de amonio 10 % APS  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Disolver 1 gramo en 9 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada

#### SDS 10%

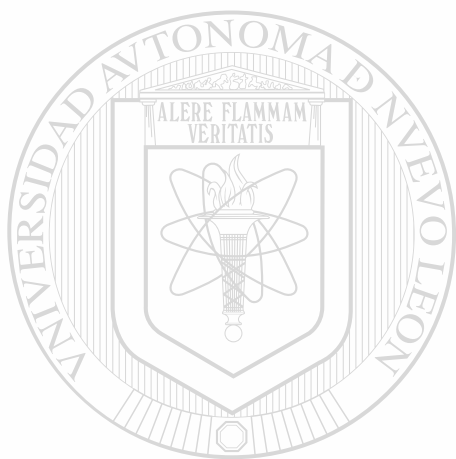
Disolver 10 gramos de SDS en 90 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada

**Buffer Tris 25 mM**

Tris 30.2 g/L

**Buffer Tris 0.1 M**

Tris 12.1 g/L



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## APENDICE C

Desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas mutantes obtenidas por medio de luz ultravioleta. Observación en medio de agar caseína.

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
Paterna	6	0.5	D	9	1	D	14	1.5	D	19	4	C
1	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
2	5	1	D	8	1	D	14	1	D	28	1.5	C
3	5	0.5	D	6	1	D	13	1	D	27	1.5	C
4	4	1.5	C	7	1.5	D	12	1.5	C	27	1	C
5	5	1	D	8	1	D	14	1	D	22	2.5	C
6	6	1	C	10	1.5	C	14	1.5	C	26	4	C
7	6	1	C	9	1	C	12	1	C	27	3.5	C
8	5	0	-	5	0	-	6	0.5	D	17	2	C
9	4	1	D	7	1.5	C	13	1	C	27	1.5	C
10	5	1	C	9	1	C	13	1.5	C	29	1.5	C
11	6	1	C	9	1	C	13	1	C	23	2	C
12	4	1.4	C	8	1.5	C	13	1	C	23	2.5	C
13	4	1	D	6	1.5	D	11	1	D	25	1	C
14	5	1	D	9	1.5	D	14	1.5	C	27	2	C
15	5	1.5	D	9	1	D	14	0.5	D	26	1.5	C
16	4	0.5	D	5	1	D	7	1.5	C	22	1	C
17	4	1	C	9	0.5	D	13	1	C	30	1.5	C
18	4	0	-	6	1	C	11	1.5	D	25	2.5	C
19	5	1.5	C	10	2	C	16	1	C	28	2.5	C
20	5	1	C	7	1.5	C	15	1	C	28	1	C
21	6.5	1	C	10	0.5	C	15	1	C	22	2	C
22	6	0	-	9	1.5	C	14	2	C	25	3	C
23	5	0.5	C	7	1.5	C	15	1	C	24	1	C
24	5	1	C	8	2	C	13	1.5	C	25	3	C
25	4	2.5	C	8	2	C	15	2	C	23	4	C
26	5	1	C	8	1.5	C	12	2.5	C	25	3.5	C
27	5	1	C	9	0.5	C	13	0.5	C	29	1	C
28	4	0	-	6	1	C	7	0.5	C	26	1	C
29	6	0	-	9	1	D	11	1	D	29	1	C
30	6	0	-	8	1	D	12	1	D	24	2.5	C
31	7	2	C	11	1.5	C	15	2	C	29	2.5	C
32	6	1	D	9	1	D	14	1	D	28	1.5	C
33	4	0.5	D	7	1.5	C	13	1	C	21	3	C
34	4	0.5	D	7	0.5	D	12	1	D	23	1	C
35	5	0	-	7	1	D	12	1	D	28	1.5	C
36	6	0	-	9	1	C	13	1.5	C	25	3	C
37	4	1	D	7	1	D	13	1	C	27	1	C
38	4	1	D	9	1.5	C	14	1.5	C	27	2	C
39	4	2	C	9	1.5	C	13	1.5	C	26	2	C

(Continuación)

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
40	4	0	-	7	1	D	12	1	C	26	1	C
41	5	2.5	C	10	1.5	C	15	1	C	28	2.5	C
42	5	1.5	C	8	1.5	C	13	2	C	28	3	C
43	6	0	-	8	1	C	14	1	C	29	1	C
44	5	1	D	9	1	D	13	1	C	26	1	C
45	4	2.5	C	9	1	C	12	1	C	25	1.5	C
46	5	1	D	10	0.5	D	14	1	D	29	1	C
47	4	0	-	7	1	C	11	2	C	22	3	C
48	5	2	C	9	1.5	C	14	1	C	26	2	C
49	4	1	D	9	1.5	C	15	0.5	C	30	1.5	C
50	5	0.5	D	9	1.5	C	14	0.5	C	28	1	C
51	5	1	C	10	1	C	14	1	C	29	1	C
52	4	1.5	C	7	1	C	13	1	C	28	1	C
53	4	0.5	D	8	1	D	11	2	C	23	2.5	C
54	5	1	D	10	1	C	12	1.5	C	27	1.5	C
55	5	1	C	9	1	C	16	1	C	31	1	C
56	5	1	C	9	1	D	16	1	C	31	1	C
57	4	1	C	8	0.5	D	13	0.5	C	26	1.5	C
58	4	0	-	7	1	D	12	1	C	26	1.5	C
59	4	1	C	5	1	C	15	1.5	C	29	2	C
60	7	1.5	C	10	1.5	C	14	1	C	27	1	C
61	4	0	-	6	1	D	9	1	D	20	1.5	D
62	4	0	-	5	0	-	9	0	-	22	1	D
63	5	0	-	7	0	-	11	1	D	25	1.5	D
64	6	0	-	7	0	-	9	1	D	24	1	D
65	6	0.5	D	7	0.5	D	11	1	D	25	1	C
66	6	0	-	9	1	D	14	1.5	D	27	2.5	C
67	6	1.5	C	9	1.5	C	16	1	C	30	1.5	C
68	6	1	D	9	1	D	4	1	D	29	1	C
69	6	1	D	8	1	D	14	1	D	28	1	C
70	4	1	D	9	1	D	13	1	D	29	1	C
71	6	1	C	10	0.5	C	14	1	C	30	1.5	C
72	5	0.7	D	7	1	C	10	1	C	25	1	C
73	4	1	C	8	1.5	C	13	1.5	C	30	1	C
74	5	1	C	8	1.5	C	13	1.5	C	26	2	C
75	5	1	C	10	1	C	14	1.5	C	31	1.5	C
76	6	1.5	D	10	1	C	15	1	C	30	1	C
77	5	0	-	8	0.5	C	12	1	C	25	2	C
78	5	1	D	9	0.5	C	14	1	C	27	3	C
79	5	1	D	10	1	C	16	1	C	30	1	C
80	6	1	D	10	1	C	16	1	C	29	2	C
81	6	0.5	C	9	1	C	14	1	C	29	1	C
82	6	0.5	C	8	1	C	10	2	C	18	4	C
83	6.5	0.5	C	9	1	C	15	1	C	29	1	C
84	7	1	C	10	1	C	15	1	C	28	1.5	C

(Continuación)

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
85	7	1.5	C	10	2	C	15	2	C	27	4.5	C
86	7	0	-	9	0.5	D	15	1	D	30	1.5	C
87	7	0.5	D	10	0.5	D	14	1	D	28	1	C
88	7	0	-	9	1	D	15	1	D	28	1.5	C
89	6	1	C	10	1	C	15	1.5	C	30	1.5	C
90	6	0.5	C	10	1	C	15	1	C	29	1.5	C
91	6	1	C	9	2	C	10	3.5	C	19	4	C
92	7	1.5	C	10	1	C	15	1.5	C	30	1.5	C
93	6	1	D	10	2	C	17	3	C	28	3	C
94	6	1.5	D	10	2.5	C	15	3	C	29	3	C
95	6	1	D	10	2.5	C	18	3	C	27	3	C
96	6	1	D	9	2	D	15	5	C	31	3	C
97	6	1	C	10	2.5	C	17	5	C	26	3	C
98	6	2	D	7	2.5	D	18	5	C	25	2.5	C
99	7	1	D	8	2	D	18	7	C	25	3	C
100	7	1.5	D	10	2	D	19	5	C	26	4	C
101	7	1	D	9	1	D	18	5	C	24	3	C
102	6	1	C	9	2.5	C	14	6	C	24	3.5	C
103	6	1.5	D	9	1.5	D	16	6	C	29	3	C
104	6	1.5	C	10	2	C	21	6	C	27	3	C
105	6	2	C	9	3	C	19	5	C	28	3	C
106	5	1	D	9	2	D	17	6	C	28	3.5	C
107	7	1.5	D	8	2.5	C	18	6	C	23	4	C
108	7	1	D	6	2	C	19	5.6	C	23	3	C
109	7	2	C	9	3	D	19	5	C	26	3	C
110	7	1	C	9	2	D	15	6	C	22	4	C
111	6	2.5	C	5	3	C	12	5	C	23	2	C
112	5	1	D	9	2	D	17	5	C	26	3.5	C
113	6	1	D	6	2.5	D	13	6	C	26	3	C
114	6	1.5	C	10	2	C	20	5	C	26	3	C
115	6	1	D	7	2	D	14	5	C	26	3	C
116	7	1.5	D	10	2	C	18	5	C	28	4	C
117	6	1.5	C	9	3	C	16	5	C	29	3.5	C
118	5	1	D	7	2.2	D	15	5	C	23	3.5	C
119	5	1	D	8	2.2	C	12	6	C	22	2	C
120	5	1	D	8	3.3	C	11	5	C	23	3	C
121	6	0	-	8	1.1	D	11	1	D	29	1	C
122	6	1	D	9	2.5	C	13	5	C	30	5	C
123	7	1	D	6	1.5	D	10	4	C	22	4	C
124	7	1	D	9	1.5	D	15	4	C	29	4	C
125	7	1	D	8	2.5	C	13	5	C	28	5	C
126	6	1	D	11	2	C	19	5	C	25	5	C
127	6	2	C	9	3	C	18	6	C	26	6	C
128	6	1	C	7	3	C	12	5	C	28	5	C
129	5	1.5	D	7	2	D	10	4	C	22	3	D



(Continuación)

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
130	6	1	C	7	2	C	11	3	C	25	3	C
131	5	2	C	9	1.5	C	13	1.5	C	26	2	C
132	6	1	D	9	2	D	12	5	C	27	5	C
133	6	2.5	C	10	1.5	C	15	1	C	28	2.5	C
134	6	1	D	10	3	C	13	4	C	28	4	C
135	6	1	D	10	2.5	C	12	6	C	25	4	C
136	5	2	C	8	3	C	11	6	C	27	5	C



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

