

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

ANDEPERBA GUADALUPE ALCAZAR PIZAÑA

TD  
Z5 320  
FCB  
2007  
.A462



1020160690

**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**

1096016



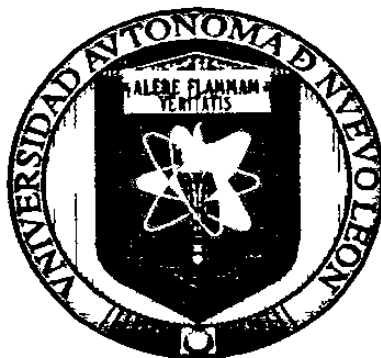
FONDO  
TBSIS  
200808

TD  
Z5320  
FCB  
2007  
.A462

2-sep 2a 15/08 •

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



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

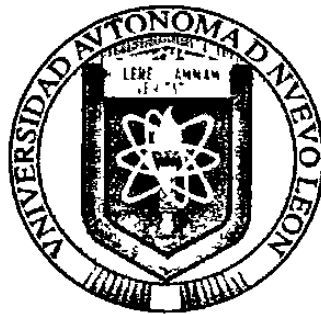
**Por**

**ANDREA GUADALUPE ALCÁZAR PIZAÑA**

**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  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *Beauveria bassiana* SOBREPRODUCTORAS 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**

Tias Trini, Lala, Rosa Ma., Ma. Del Refugio, Tios 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!

### **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

### **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

## 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 quimiotripsina 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



## 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

## RESUMEN

Uno de los factores mas 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 mas de la mitad del peso de la cutícula de los insectos esta constituida por proteínas. En la presente investigaciones 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