

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 más de la mitad del peso de la cutícula de los insectos está constituida por proteínas (Bidochka y Khachatourians, 1992).

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.

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 (Nucleoplhedrovirus, 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 mas exitoso, produce una serie de toxinas α - y β -exotoxinas y δ -endotoxina, esta ultima 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 amplio.

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 aleyrodidis*, que infecta solamente mosquitas, mientras que otras especies de hongos tienen un espectro de hospederos mas amplio, con aislados individuales que son mas específicos, por ejemplo, *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Fig. 1).

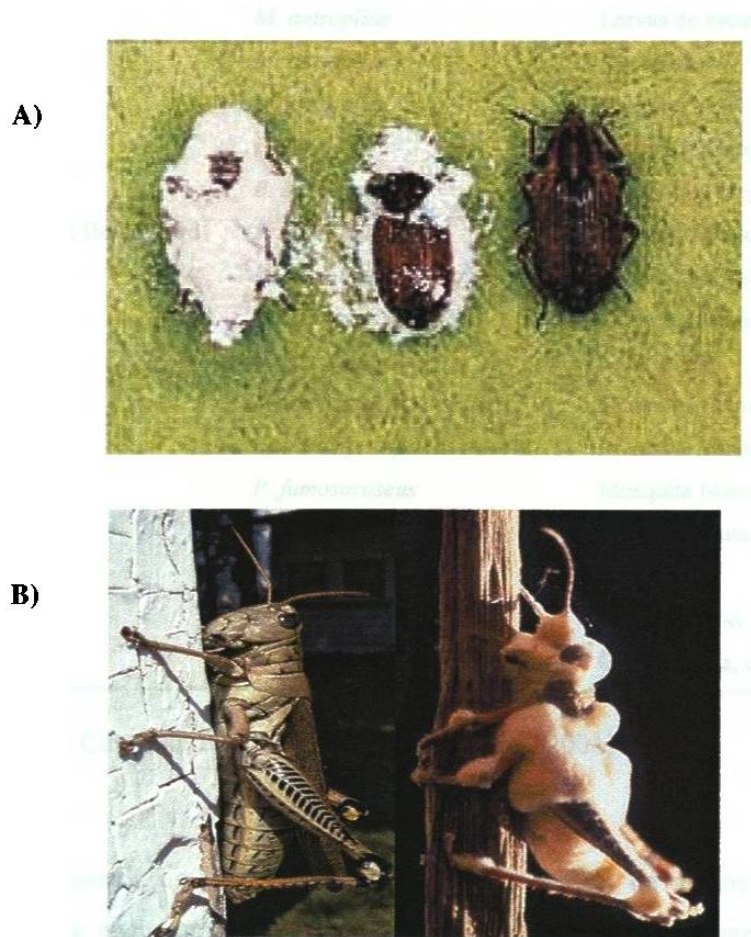


Figura 1. Ejemplos de control biológico de insectos plaga A) Picudo del algodón: Izquierda y centro, insectos adultos muertos por *B. bassiana*. Derecha, insecto adulto sano (control). B) Chapulín: Izquierda insecto adulto sano, derecha insecto infectado por *B. bassiana*.

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
Mycotal	<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 μm (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 hemípteros, 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.

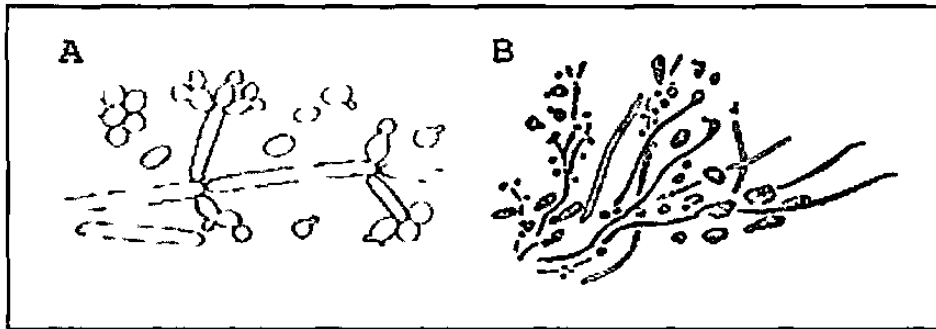


Figura 2. Modo de crecimiento dimórfico de *B. bassiana*. (A) Fase parasítica en forma de levadura cuando infecta a la especie susceptible. (B) Fase saprofita muestra hifas filamentosas.

Cuando 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.

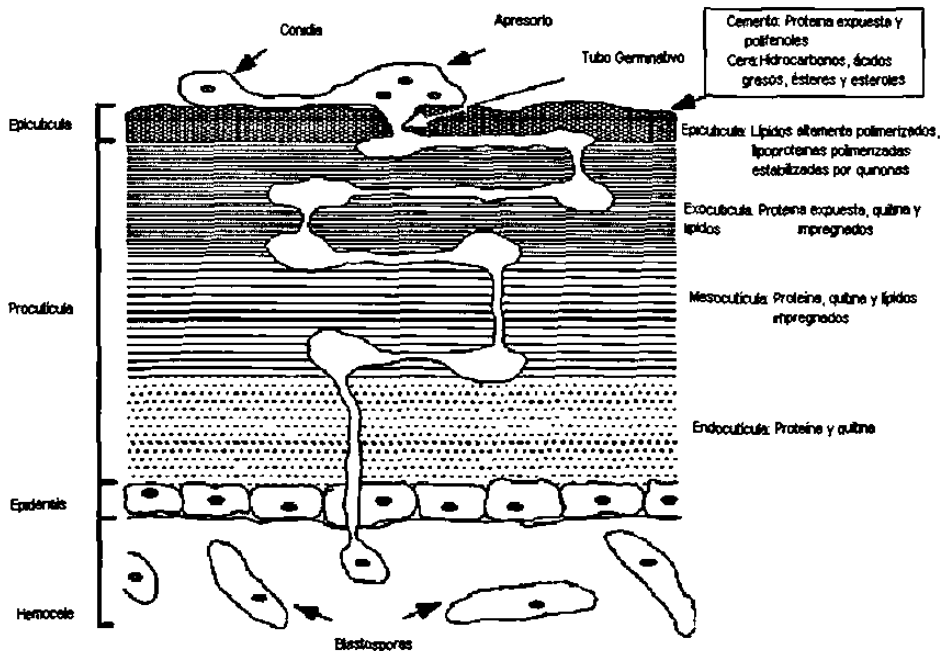


Figura 3. Modo de acción de los hongos entomopatógenos.

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 spora; b) penetración en el hemocele y c) desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del hospedero (Charnley, 1992; Goettel y Johnson, 1992).

4.4.1 Adhesión y germinación

El contacto spora-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 grasosos, 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 cuniculares
- 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 café, 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) Expandiendo 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 Vilcinskas, 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 α -L-arabinofuranosidasa (Gielkens *et al.*, 1999), y otros más, que preferentemente se expresan bajo condiciones ácidas. Otro gen es, por ejemplo, *prtA* 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 Níger* (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>	Maíz	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 1×10^7 , 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 (1×10^7 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 1×10^4 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 μ 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 μ 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 μ l de enzima se agregan a 480 μ l de azocaseína (1% p/v) en buffer Tris 25 Mm con $MgCl_2$ (concentración final 5 mM), la mezcla incubada a 30 °C por 30 minutos. La reacción fue detenida al adicionar 600 μ 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 μ l, fueron neutralizados con 200 μ 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 Coomassie. 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°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°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	ATAAGGTCGGTTTTTGATGCG	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 μ l, el volumen total de la reacción fue de 50 μ 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 μ M; 2.0 μ 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.