



ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE ISOENZIMAS CON ACTIVIDAD DE ESTERASAS EN AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Beauveria Bassiana* (Balsamo) DEL ESTADO DE GUERRERO, MÉXICO

¹Delia Inés Domínguez-García, ²Maria Angélica Soriano-Nuñez, ²Víctor Manuel Domínguez-Márquez, ³Gerardo Edmundo Santana-Huicochea, ²Ulises Martínez Alonso y ¹Rodrigo Rosario-Cruz.¹

Centro de Investigaciones en Biotecnología, Salud y Ambiente de la Unidad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Guerrero, Campus Petaquillas, Rancho el "Shalako". ²Unidad académica de Ciencias Ambientales y Agropecuarias, de la Universidad Autónoma de Guerrero, Periférico S/N Colonia Villa de Guadalupe, Iguala de la Independencia, Gro. C.P. 40033. ³Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. Carretera Morelia-Salamanca km.6.5. Morelia, Mich. Cp.58100.

Correo: deliadomgar@yahoo.com.mx

RESUMEN. El análisis de marcadores moleculares, tiene como objetivo la tipificación de cepas o aislamientos de organismos, en relación con características biológicas de interés tales como, patogenicidad, virulencia, o características geográficas, con el objetivo de formar grupos dentro de una especie o de realizar identificaciones de aislamientos no sólo por su caracterización morfológica. Las técnicas de separación electroforética son las más simples; sin embargo, cuando se trata de isoformas que poseen el mismo peso molecular, la separación no es posible, por esa razón se adaptó un sistema de isoelectroenfo que unidimensional en geles de poliacrilamida para separar las isoformas de esterases. El análisis de los coeficientes de similitud de Jaccard, mostró una asociación significativa entre la presencia-ausencia de las isoformas y el origen geográfico de *Beauveria bassiana* (Bals.). Esta metodología, puede ser una excelente herramienta para la caracterización de los aislamientos y la evaluación del impacto de epizootias artificiales derivadas de programas de control biológico.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, Esterasa, Control Biológico, Hongos Entomopatógenos.

Variability analysis of esterase Isoenzymes of native isolates of *Beauveria Bassiana* (Balsamo) from the state of Guerrero, Mexico

ABSTRACT. Analysis of molecular markers aims to type strains or isolates with regards to biological characteristics such as pathogenicity, virulence, or geographic characteristics, in order to form groups within species or identify isolates not only by its morphological characterization. Electrophoretic techniques for protein separation are easy to perform, however, when isoforms that have the same molecular weight, the separation is not possible given the similarity in molecular weight, for this reason a system of one-dimensional isoelectric focusing was adapted on polyacrylamide gels in order to separate protein isoforms with esterase activity. Analysis of Jaccard's similarity coefficients showed a significant association between the presence-absence of esterase isoforms and the geographical origin of *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates. We conclude that the use of this methodology for functional detection, can be an excellent tool for biochemical characterization of isolates and further impact evaluation of artificial epizootics derived from Biological control programs.

Keywords: *Beauveria bassiana*, Esterase Isozymes, Biological Control, Entomopathogenic Fungi.

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos son una alternativa prometedora para el control biológico de plagas, especialmente en la agricultura. *Beauveria bassiana* (Bals.) es un hongo que crece de forma natural en el suelo, penetra a través de la cutícula del hospedante susceptible hasta alcanzar su aparato digestivo, el insecto muere por inanición, para luego ser colonizado y momificado. Esta especie es utilizada como un insecticida biológico debido a la capacidad que ha demostrado tener al controlar a una gran variedad de insectos y artrópodos que actúan como vectores de enfermedades incluyendo mosquitos (Mnyone *et al* 2009), garrapatas (Kirkland *et al.*, 2004); plagas agrícolas como mosquitas, orugas y saltamontes (De la Rosa *et al.*, 2000; Brownbridge *et al.*, 2001) así como parásitos invasores tales como hormigas y termitas (Culliney y Grace, 2000).

La identificación de hongos entomopatógenos, se realiza usualmente por su morfología, sin embargo, utilizar criterios a nivel molecular basados en estudios de proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, actualmente son herramientas necesarias, para lo cual se requieren tecnologías que permitan la separación electroforética, detección de proteínas con actividad enzimática, hasta la secuenciación de genes asociados con alguna característica fenotípica por lo que es indispensable el empleo de métodos rápidos y confiables que permitan la diferenciación de aislados de los hongos entomopatógenos.

Las técnicas de separación electroforética de proteínas permite visualizar bandas proteicas con base en el peso molecular, sin embargo, cuando se trata de isoformas que poseen el mismo peso la separación no es posible, por esa razón en esta investigación se realizó la caracterización enzimática de los aislados del hongo *B. bassiana* (Bals.) de diferentes orígenes geográficos, adaptando un sistema de isoelectroenfo que unidimensional en geles de poliacrilamida con el fin de separar las isoformas de proteínas con actividad de esterasas (Rosario- Cruz *et al.*, 1997), agrupadas en la familia de las serín-hidrolasas con capacidad de hidrolizar el sustrato alfa-naftil-acetato Así mismo, se determinó la relación filogenética de este grupo de hongos entomopatógenos mediante el análisis de conglomerados y el coeficiente de similitud de Jaccard.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron nueve cepas de *B. bassiana* (Bals.) aisladas de suelos agrícolas. Para reactivar las cepas de *B. bassiana* (Bals.) se utilizaron larvas de *Galleria melonella* de donde se tomaron esporas y se inocularon los medios de cultivos sólidos a base de Agar Dextrosa Sabouraud se incubaron por 21 días.

Extracción de proteínas

Se maceraron 200 mg de micelio de cada una de las cepas en morteros de porcelana previamente esterilizados y congelados a -70°C . La concentración de proteína total de cada uno de los extractos crudos de *B. bassiana* (Bals.) se determinó con el método Bradford (1976) a una longitud de onda de 595 nm utilizando el lector para placas de ELISA (Multiskan Ascent). Las proteínas totales de las cepas de *B. bassiana* (Bals.) se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS) por el método de SDS-PAGE, utilizando un gel de separación del 10% y 50 μg de proteína por carril

Isoelectroenfo que en geles de poliacrilamida en una dimensión

Los extractos proteicos fueron analizados en un gel de poliacrilamida conteniendo anfolinas en un rango de pH 3-6. Se colocaron 10 μg de proteína por carril de cada una de las cepas de *B. bassiana* (Bals.). Los geles fueron teñidos para detectar la actividad de esterasas

utilizando α -naftil acetato como sustrato y Fast Garnet como revelador. Para la evaluación de los resultados se registraron solo bandas nítidas y reproducibles. Cada banda se consideró como un carácter independiente y se contabilizó en forma cualitativa por su presencia (1) o ausencia (0), generando una matriz binaria.

RESULTADOS

El perfil electroforético de las isoformas con actividad de esterasas separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida teñidos por la capacidad de hidrólisis del sustrato sintético alfa-naftil acetato no posee la resolución apropiada para identificar a cada una de las isoformas de esta familia de enzimas, por lo tanto no se puede utilizar esta técnica para identificar o diferenciar las cepas en cuestión. En el Gel de SDS-PAGE se encontraron de 1 a 3 esterasas con un peso molecular entre 40 y 80 Kd, que se separaron en 10 isoformas mediante el Isoelectroenfo que, con puntos isoelectricos entre 4-6 unidades de pH (Fig. 1).

El gel de isoelectroenfoque muestra una mayor capacidad de resolución en relación con los geles de SDS-PAGE, para cada cepa de *Beauveria bassiana*, observándose un total de 10 isoformas de esterasas separadas por su punto isoelectrico, donde cada cepa desplegó entre tres y seis bandas (Fig. 2).

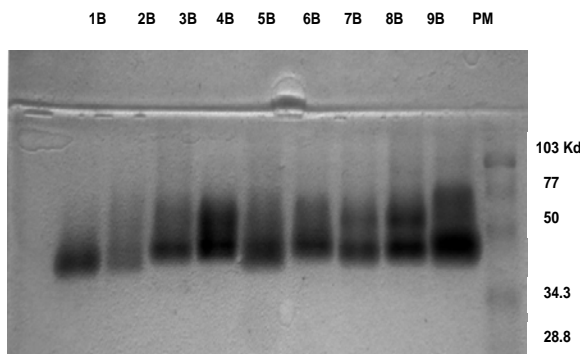


Fig 1. Gel SDS-PAGE teñido para detección de actividad de esterasas.

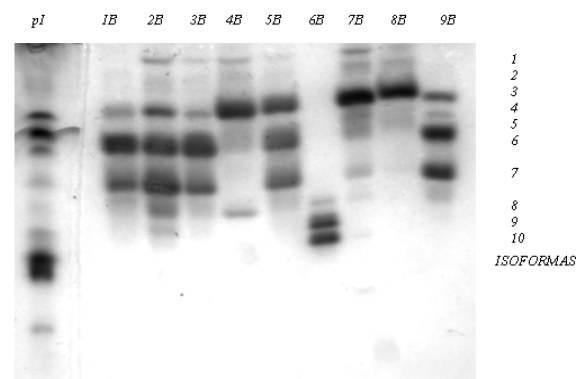


Fig 2. Detección de isoformas en un gel de Isoelectroenfoque usando anfólinas con un pI 4-6.

El Dendograma que muestran las distancias genéticas entre las diferentes cepas de *B. bassiana* analizados en el presente estudio arrojó 3 grupos: el primero integrado por los aislados 7B, 5B y 3B (100% de similitud) colectadas en la Región de la Costa Grande, el segundo grupo: incluye a las cepas 2B y 4B (71.4% de similitud), colectadas en la Región Norte y la Región de la Costa Grande. El tercer grupo lo forman las cepas 1B y 9B (50% de similitud) colectadas en la Región Centro. El aislado 8B que se colectó en la Región de la Costa Grande presentó 60% de similitud con el primer grupo (7B, 5B y 3B), con el segundo grupo (2B y 4B) tuvo un valor de similitud del 65%. Con respecto a la cepa 6B se obtuvo 0% de similitud con los otros aislados a pesar de tener una relación geográfica con los aislados de la Costa Grande (Fig. 3).

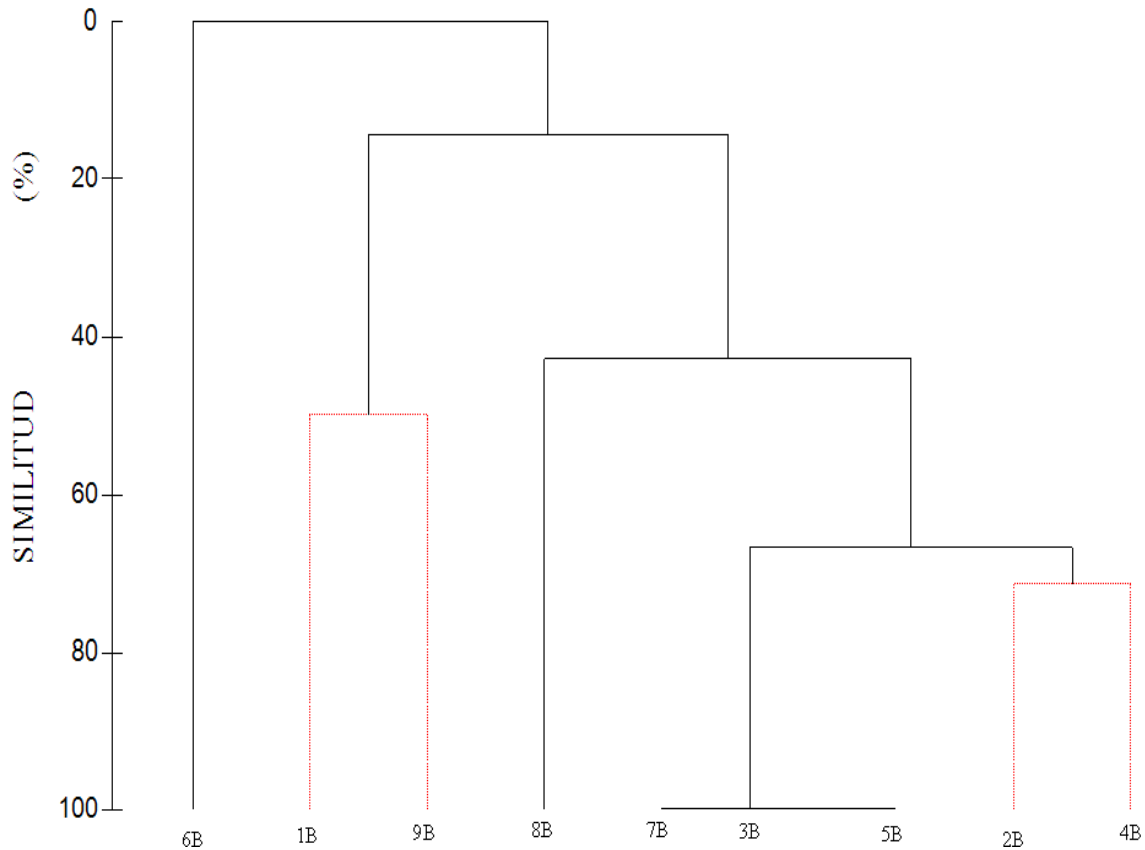


Figura 3. Dendrograma de las nueve cepas de *Beauveria bassiana* (*Bals.*), generado mediante la metodología UPGMA, los coeficientes de disimilitud de Jaccard y el análisis de conglomerados.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los hongos entomopatógenos son importantes para el control biológico de plagas de interés agrícola, por esta razón, los mecanismos de invasividad se han estudiado con el fin de identificar las cepas más entomopatógenas, con capacidad para destruir los componentes del exoesqueleto de quitina los insectos, así como lípidos y ceras asociados al tegumento (Guillespi *et al.*, 1998). La destrucción del tegumento, esta mediado por mecanismos de sobre expresión de enzimas de la familia de las hidrolasas, como quitinasas, proteasas y lipasas, y ha sido previamente estudiado ya que constituyen la maquinaria bioquímica básica de los hongos, para infestar a los insectos (Santini *et al.*, 2010).

El papel de las esterasas y lipasas ha sido documentado en parásitos intracelulares, como un mecanismo de invasión a las células hospedadoras. En *Beauveria bassiana* (*Bals.*), se ha documentado la presencia de proteasas, quitinasas, esterasas y lipasas asociadas con la invasividad del hongo y su capacidad de penetración al través de la cutícula, para acceder a la hemolinfa como fuente de nutrientes (De la Rosa *et al.*, 2000).

Los resultados muestran diferencias en la estructura estereoquímica de las esterasas que se pueden detectar por el cambio en las propiedades isoelectricas de las proteínas, mediante la técnica de isoelectroenfoque. Estudios previos sobre la renaturalización de enzimas con actividad de esterasas por Rosario-Cruz *et al.*, 1997, se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida, sin embargo la técnica tiene limitaciones en la resolución, ya que no discrimina las diferencias asociadas con el punto nioelectrico de las proteínas. La técnica combinada de IEF-PAGE se llevó a cabo en un formato de una sola dimensión y mostró una

alta resolución para discriminar las diferentes isoformas de enzimas con actividad de esterases con base en los cambios a nivel del punto isoeléctrico.

Con base en esto podemos decir que la técnica de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida renaturalizados, son una gran herramienta técnica que puede ser de gran trascendencia en el análisis, identificación y tipificación de diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos y de los mecanismos de patogenicidad de los mismos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran, que a pesar de que es posible recuperar la conformación estereoquímica de las proteínas con actividad de esterases, aun después de ser separadas por un sistema de electroforesis en condiciones desnaturizantes que contienen SDS, las proteínas no pueden ser separadas por que poseen pesos moleculares iguales o dentro de un rango muy estrecho, lo cual imposibilita la separación de estas isoformas. Sin embargo, a pesar de que los pesos moleculares están dentro de un rango muy estrecho, las variaciones de las diferentes isoformas, en la secuencia de aminoácidos, le confieren a la proteína, puntos isoeléctricos, diferentes, por lo que los sistemas de isoelectroenfoque, pueden discriminar cada una de las proteínas por su punto isoeléctrico.

El análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante los coeficientes de similitud de Jaccard, nos permite establecer las diferencias o similitudes fenotípicas entre los aislados sin embargo, se requiere una mayor información respecto de las características fenotípicas de patogenicidad de cada una de las cepas, como son, las concentraciones letales que afectan a las poblaciones de insectos, con la finalidad de observar la relación que existe entre la presencia o ausencia de esterases, con la capacidad invasiva de las cepas de hongos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Autónoma de Guerrero el apoyo brindado a la Dra. Delia Inés Domínguez García, y al CENID PAVET DEL INIFAP, las facilidades brindadas a la MC. Ma. Angélica Soriano Nuñez, y al Laboratorio de Control Biológico por la donación de las cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.).

LITERATURA CITADA

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.

Brownbridge, M., S., Costa, y S. T. Jaronski. 2001. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *J. Invertebr. Pathol.* 77:280-283.

Culliney, T. W., y J. K. Grace. 2000. Prospects for the biological control of subterranean termites (*Isoptera: Rhinotermitidae*), with special reference to *Coptotermes formosanus*. *Bull. Entomol. Res.* 90:9-21.

De la Rosa, W., R., Alatorre, J. F., Barrera, y C. Toreillo. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *J. Econ. Entomol.* 93:1409-1414.

Gillespie, J. P., Bateman, R., Charnley, A. K. (1998). Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 128-137-

Kirkland, B. H., Westwood, G. S. y Keyhani, N. O. 2004. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *J. Med. Entomol.* 41, 705-711.

Mnyone LL, Kirby MJ, Lwetoijera DW, Mpingwa MW, Knols BG, Takken W, Russell TL. 2009. Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malar Journal*. 8:309.

Rosario-Cruz R., Miranda M.E, Garcia V.Z., Ortiz E.M. 1997. Detection of esterase activity in susceptible and resistant *Boophilus microplus* tick strains. *Bull Entomol Res*. 87:197-202.

Santi, L., Silva, W. O. B., Pinto, A. F. M., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* hostpathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection. *Fungal Biology*. 114, 312e319.