

COMUNICACIÓN CORTA

Inducción de enzimas hidrolíticas en una cepa de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams en medio líquido¹

Ivonne González, Yailén Arias, Danay Infante, Benedicto Martínez, Belkis Peteira

Grupo de Fitopatología. Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: marquetti@censa.edu.cu.

RESUMEN: En el presente trabajo se evaluó la inducción de quitinasas y β -1,3-glucanasas en la cepa VI-01 de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams en tres medios de cultivo con diferentes inductores: medio basal, medio basal suplementado con quitina al 0,5% y medio basal suplementado con gelatina al 0,2%. Las actividades enzimáticas se determinaron a las 24, 72, 120 y 168 horas. El medio suplementado con gelatina produjo los niveles más altos de actividades enzimáticas quitinasas y glucanasas.

Palabras clave: *Lecanicillium lecanii*, glucanasas, quitinasas.

Induction of hydrolytic enzymes by a *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams strain in liquid medium

ABSTRACT: In this work, the induction of chitinases and β -1,3-glucanases was evaluated in the strain VI-01 of *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams in three culture media with different inductors: basal medium, basal medium supplemented with 0,5% of chitin, and basal medium supplemented with 0,2% of gelatin. The enzymatic activities were determined at 24, 72, 120, and 168 hours. The higher enzymatic levels of both chitinases and glucanases were obtained in the basal medium supplemented with gelatin.

Key words: *Lecanicillium lecanii*, glucanases, chitinases.

El desarrollo y aplicación de los agentes de control biológico representa una valiosa alternativa a los plaguicidas químicos, debido a que no constituyen una amenaza para la salud humana y al medio ambiente. *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams es un agente de control biológico ampliamente utilizado por ser un enemigo natural de importantes plagas y patógenos en los cultivos. Aunque generalmente se comercializa para controlar áfidos, es efectivo contra los hongos fitopatógenos que ocasionan el mildiu polvoriento, la roya, el moho verde, así como a *Fusarium* sp., *Verticillium dahliae* Klebahn y *Pythium ultimum* Trow (1).

Estos hongos inician su proceso infectivo cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento, donde se forma el tubo germinativo, y

comienza la secreción de enzimas tales como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas. Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, que es una estructura especializada formada en el tubo germinativo (2).

Algunos aislados de *Lecanicillium* pueden actuar como micoparásitos que atacan los micelios y conidios de mildiu, porque producen enzimas como las quitinasas que permiten la penetración de las esporas e hifas de mildiu y provocan la muerte del patógeno (3). Otros agentes de control biológico como *Trichoderma* spp. y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, poseen la misma habilidad de controlar insectos y hongos fitopatógenos, además secretan

¹ Investigación financiada por el proyecto del Programa Nacional de Salud Animal y Vegetal: Diagnóstico y manejo de plagas en granos con énfasis en el desarrollo y uso de productos bioactivos. (2013-2016).

glucanasas que degradan los β -1,3-glucanos presentes en la pared celular de hongos fitopatógenos como *Pythium* spp. lo que explica su capacidad antagonista (4, 5).

El conocimiento del mecanismo de acción es esencial en el proceso de desarrollo de un agente de control biológico como producto, para lo cual es importante estudiar la expresión y comportamiento de las enzimas involucradas en la patogenicidad del mismo. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización bioquímica de la cepa VI-01 de *L. lecanii*, a través de un estudio de dinámica de inducción en diferentes medios de cultivo.

Se empleó la cepa VI-01 de *L. lecanii*, procedente del cepario del Laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), la cual se conservó en medio Agar-Malta (A M, Biocen) a 4°C. La cepa se subcultivó en un medio papa-dextrosa-agua (PDA, Biocen) en placas Petri de 9 cm y se incubó a 25°C en cultivo estático en oscuridad durante tres días, momento en que se tomó el micelio para el desarrollo del experimento de dinámica de inducción de enzimas hidrolíticas.

Para la inducción de proteínas en el medio líquido se utilizaron compuestos con diferente efecto inductor de enzimas hidrolíticas: medio basal líquido que contenía extracto de levadura 1 g.L⁻¹ y peptona 4 g.L⁻¹ (MB), medio basal líquido suplementado con quitina 5 g.L⁻¹ (MBQ) y medio basal líquido suplementado con gelatina al 0,2% (p/v) (MBG). Los dos primeros medios se esterilizaron a 120°C durante 20 minutos, mientras que el medio que contenía gelatina se esterilizó a 115°C durante 15 minutos.

Los medios se alicuotaron en frascos de 100 ml, a razón de 20 ml por frasco, y se inocularon con cuatro discos de micelio de 5 mm de diámetro de la periferia de la colonia pura de la cepa. Posteriormente, se incubaron en cultivo estático a 25°C, en la oscuridad. De cada tratamiento se hicieron nueve repeticiones. Los frascos se retiraron de la incubadora a las 24, 72, 120 y 168 horas de la inoculación. Los sobrenadantes se filtraron con papel de filtro Whatman (3 mm CHR) y los extractos finales se conservaron a -20°C, hasta su utilización en los análisis enzimáticos.

La concentración de las proteínas totales se determinó según el método descrito por Bradford (6). Las lecturas de la absorbancia del complejo proteína-Azul de Coomassie G-250 se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro (T90+ UV/Vis Spectrometer PG Instruments Ltd), tomando como base para el cálculo una curva patrón, a partir de una solución estándar de 1 mg.ml⁻¹ de albúmina de suero bovino (BSA).

Se determinó la actividad quitinasa con 0,2 ml de quitina coloidal 10 mg.ml⁻¹ preparada según Boller et

al. (7), los cuales se mezclaron con 0,5 ml del sobrenadante de los frascos. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora, y luego se añadió 0,1 ml de tetraborato de sodio 0,8 M, pH 8,8. Posteriormente, se centrifugaron a 6708 x g durante cinco minutos. De cada tubo se tomaron 500 μ l del sobrenadante, que se pasaron a tubos de cristal donde se calentaron a 100°C durante tres minutos. Por último, se les adicionó 1 ml de p-dimetilamino benzaldehído y se incubaron con esta solución a 38°C durante 20 minutos. La curva patrón se determinó utilizando N-acetilglucosamina, a partir de una solución madre de 1 mg.ml⁻¹ a la cual se le hizo el mismo procedimiento que a las muestras. La lectura se realizó a 585 nm.

Para la determinación de la actividad enzimática de las β -1,3-glucanasas se utilizó una variante en microplacas de 96 pozos, desarrollada por Zheng y Wozniak (8), a partir del sobrenadante de los cultivos.

La actividad específica se determinó según la expresión:

$$\text{Activ. específica} = \frac{\text{Actividad enzimática}}{\text{Conc. de proteínas totales (mg.ml}^{-1}\text{)}}$$

Se empleó un diseño estadístico completamente aleatorizado. Para determinar cuáles medios de cultivo indujeron los mayores niveles de actividades específicas quitinasas y glucanasas en la cepa estudiada, se utilizó el análisis de varianza simple. Para la comparación entre las medias se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan en los casos donde hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$), mediante el paquete informático estadístico InfoStat versión 2011 (9).

L. lecanii está catalogado como un hongo entomopatógeno. Se conoce que las quitinasas se hallan involucradas en los procesos de infección en los insectos (10, 11). Además, se ha probado que, en su función como controlador de fitopatógenos, este hongo parasita a la diana, a través de una combinación de enzimas que incluyen a las celulasas, proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas (12).

Entre las estrategias sugeridas para lograr la mayor expresión de estas enzimas, se encuentra el cultivo de los hongos en medios sólidos o líquidos en presencia de inductores, que favorecen una eficiente producción de enzimas hidrolíticas y permiten mantener la virulencia de los hongos entomopatógenos (13).

La secreción de las quitinasas *L. lecanii* fue superior en el cultivo con el medio líquido que poseía gelatina como inductor (Fig. A). Para todos los tratamientos la actividad de las quitinasas sufrió una disminución hacia las 72 horas del estudio.

Estas enzimas son estrechamente reguladas por su producto de degradación. Algunas fuentes de carbono como la glucosa, e incluso la N-acetil- β -D-glucosamina, pueden actuar como represores catabólicos de las quitinasas, que en el caso particular de la N-acetil- β -D-glucosamina ocurre debido a un mecanismo de inducción-represión del hongo (14, 15).

En *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, la represión por N-acetil- β -D-glucosamina se ejerce sobre la expresión del gen *chit1* que codifica para una endoquitinasa (Bchit1), la cual a su vez está asociada con el gen *brlA*, un importante regulador de la conidiogénesis. Se ha descrito un gen homólogo a *bchit1* en *Trichoderma harzianum* Rifai (14). Mayorga-Reyes *et al.* (15) observaron que los niveles de expresión del gen *chit1* de *L. lecanii* al crecer en quitina y cutícula de *Sphenarium purpurascens* Charpentier en fermentación en estado sólido, dependieron de la fuente de carbono utilizada.

Por otro lado, el mayor nivel en la actividad β -1,3-glucanasa se obtuvo con el tratamiento suplementado con gelatina a las 24 horas de evaluación (Fig. B). Hacia las 72 horas esta actividad decayó para luego sufrir un nuevo incremento a las 168 horas. Un excelente trabajo de revisión de Martin *et al.* (16), reflejó que la actividad de las β -glucanasas exocelulares puede ser regulada mediante mecanismos de inducción/represión, desactivación e inhibición cuando en el medio se encuentran catabolitos como la glucosa.

Por su parte, en el medio suplementado con quitina se alcanzó la mayor expresión de las β -1,3-glucanasas a las 120 horas, mientras que en el medio basal la mayor actividad se alcanzó a las 168 horas. Se ha

observado que las β -1,3-glucanasas son inducidas por la presencia de β -1,3-glucanos de paredes celulares de *Rhizoctonia solani* (Kühn); sin embargo, sustratos diferentes como la quitina, quitosanos y N-acetil- β -D-glucosamina también pueden ser inductores de glucanasas (13).

Una publicación reciente demostró que *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas es un eficiente productor de proteínas y enzimas hidrolíticas como amilasas, proteasas y lipasas, lo que indicó la versatilidad de los mecanismos bioquímicos de esta especie (17).

Algunos estudios han demostrado que las quitinasas y glucanasas pueden ser inducidas por sustratos complejos como la cutícula de insectos o la pared celular de los hongos, o a partir de sustratos simples. Entre los ejemplos que se pueden mencionar de estos casos se cuentan los siguientes: la *exo*- α -1,3-glucanasa, inducida por quitina en *T. harzianum* (18), la expresión de β -1,3-glucanasas en *B. bassiana* y *Trichoderma asperellum* (Samuels) cuando las cepas fueron cultivadas utilizando la gelatina como inductor (4, 5) y las quitinasas que sintetiza *M. anisopliae* en presencia de cutícula de *Spodoptera litura* (Fabricius) y *Helicoverpa armigera* (Hübner) (19).

Los resultados demostraron la utilidad del medio suplementado con gelatina para detectar la expresión inducida de quitinasas y β -1,3-glucanasas en la cepa VI-01. El estudio de nuevas cepas de *L. lecanii*, así como la adición de este parámetro a los criterios usualmente empleados para la selección de hongos agentes de control biológico, junto a otros relacionados con la actividad biológica de hongos sobre diferentes diurnas, pueden ser objetos de investigaciones futuras.

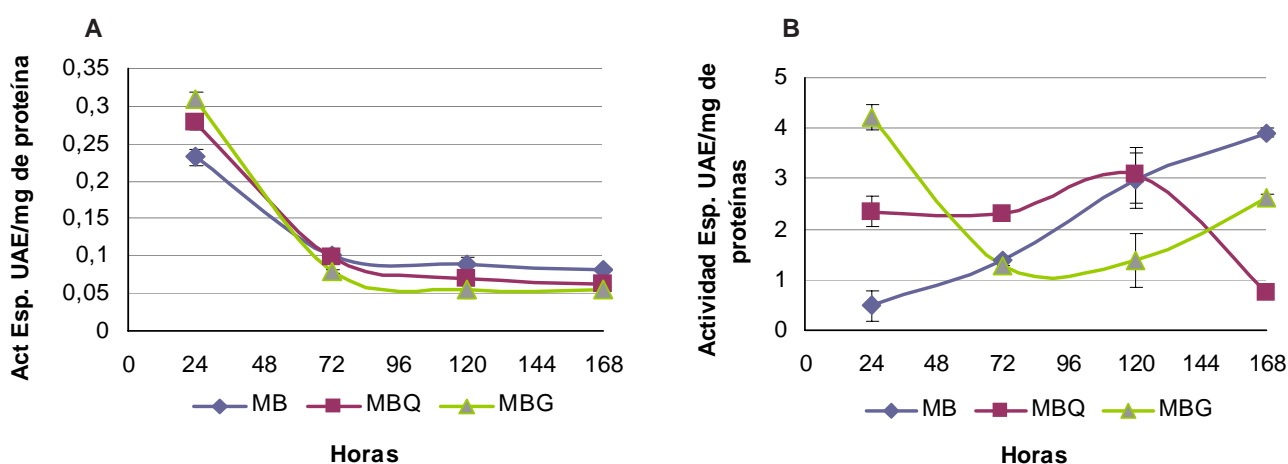


FIGURA. Dinámica de la inducción de enzimas quitinasas (A) y β -1,3-glucanasas (B) en la cepa VI-01 de *L. lecanii* a las 24, 72, 120 y 168 horas. / Time course of enzyme induction of chitinases (A) and β -1,3-glucanasas (B) in the strain VI-01 by *L. lecanii* at 24, 72, 120 and 168 hours.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean agradecer a Yusely Hernández Milián por el excelente trabajo técnico realizado para la obtención de los resultados presentados, al MSc. Esteban González por proporcionarnos la cepa de *L. lecanii* empleada en este trabajo, así como a la Dra. Mayra G. Rodríguez por la minuciosa revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

- Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M, Qiu D. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding*. 2012;3(7):63-79.
- Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, de la Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 2006;31(12):856-860.
- Goettel MS, Koike M, Kim JJ, Aiuchi D, Shinya R, Brodeur J. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *J Invertebr Pathol*. 2008;98:256-261.
- Peteira B, González I, Arias Y, Fernández-Turro A, Miranda I, Martínez B. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Rev Protección Veg*. 2011;26(1):16-22.
- González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, Miranda I, *et al*. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Bioteología Aplicada*. 2012;29(1):7-11.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;73:248-250.
- Boller T, Ghri A, Mauch F, Vogeli U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Plant*. 1983;157:22-31.
- Zheng Y, Wozniak CA. Adaptation of a 1,3 β -glucanase assay to microplate format. *Biotechniques*. 1997;22:922-926.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat* versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- González-Castillo M, Aguilar CN, Rodríguez-Herrera R. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Acta Química Mexicana*. 2012;4(8):42-55.
- Dhar P, Kaur G. Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. *Afr J Biochem Res*. 2010;4(3):65-72.
- Ownley BH, Guinn KD, Vega FE. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol*. 2010;55:113-128.
- Franco KG, Rodríguez S, Cervantes JF, Barranco JE. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades Rurales, Producción y Medioambiente*. 2011;11(2):143-160.
- Rocha-Pino Z. Estudio de la producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* en cultivos líquido y sólido utilizando diversas fuentes de carbono. [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de México, México. 2009.
- Mayorga-Reyes L, Calderón-Garza E, Gutiérrez-Nava A, González-Cervantes R, Azaola-Espinosa A, Barranco-Florido E. Characterization and expression of the chitinase *chitII* gene from *Lecanicillium lecanii* in solid-state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2012;11(1):97-104.
- Martin K, McDougall BM, McIlroy S, Jayus, Chen J, Seviour RJ. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -1,3- and β -1,6-glucanases. *FEMS Microbiol Rev*. 2007;31:168-192.
- Hasan S, Ahmad A, Purwar A, Khan N, Kundan R, Gupta G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*. 2013;9(5):238-242.
- Ait-Lahsen H, Soler A, Rey M, de la Cruz J, Monte E, Llobell A. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:5833-5839.
- Bhanu Prakash GVS, Padmaja V, Jami SK, Kirti PB. Expression of chitinase genes of *Metarhizium anisopliae* isolates in lepidopteran pests and on synthetic media. *J Basic Microbiol*. 2012;52:628-635.

Recibido: 14-5-2014.

Aceptado: 16-6-2014.