



# Expresión de $\beta$ -1,3-Glucanasas de *Beauveria bassiana* en cultivo con extracto de los fitopatógenos *Peronospora variabilis* y *Fusarium oxysporu*

$\beta$ -1,3-glucanases expression of *Beauveria bassiana* in culture with extract of the phytopathogenic *Peronospora variabilis* and *Fusarium oxysporum*

W. Jhoel Montoya Espinoza\*; Oscar P. Nolasco Cárdenas; Rosalyn K. Acuña Payano; Ana I. F. Gutiérrez

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Jr. Río Chepen No. 110, 114 y 290, El Agustino, Lima, Perú.

Received May 20, 2016. Accepted July 19, 2016.

### Resumen

El hongo *Beauveria bassiana* Vuill. es muy conocido por su capacidad entomopatógena, pero también existe referencias de ser un hongo antagonista, una de las posibles formas de su antagonismo es la antibiosis debido a la presencia de enzimas hidrolíticas en su genoma. Las principales enzimas expresadas contra fitopatógenos son las  $\beta$ -1,3-glucanasas, ya que la pared celular de los fitopatógenos como hongos y oomicetes está constituida en su mayoría por polímeros de  $\beta$ -1,3-glucanos. Se evaluó por qPCR la expresión de dos genes, el gen exo-beta-1,3-glucanasa [XM\_008597142.1] y el gen de glucósido hidrolasa familia 55 [XP\_008597332.1] de *B. bassiana* en los días 0, 4 y 7, frente a medios líquidos con distintas fuentes de carbono, laminarina 0,1%, pulverizado de *F. oxysporum* 0,1% y pulverizado de hojas infestadas con *P. variabilis* 0,1%. Entre los genes analizados se encontró el ratio más alto en los medios con *F. oxysporum* para el gen glucósido hidrolasa familia 55 (GH55), los medios con *P. variabilis* no tuvieron una expresión significativa. Nosotros postulamos que el aumento de la expresión del gen glucósido hidrolasa familia 55 (GH55), en el día 4, en medios con *F. oxysporum* podría ser importante en el metabolismo de *B. bassiana* frente a este sustratos.

**Palabras clave:** *Beauveria bassiana*, exo- $\beta$ -1,3-glucanasas, fitopatógenos, expresión relativa.

### Abstract

The fungus *Beauveria bassiana* Vuill. is well known for its ability entomopathogenic but there is also referencés to be an antagonist fungus, one of the possible ways of their antagonism it is antibiosis as is known the presence of hydrolytic enzymes in their genome. The main enzymes expressed against phytopathogenic are  $\beta$ -1,3-glucanases, since the cell wall of the phytopathogenic like fungi and oomicetes consists mostly polymers of  $\beta$ -1,3 glucans. The expression of exo-1,3-beta glucanase [XM\_008597142.1] and glycoside hydrolase family 55 [XP\_008597332.1] genes of *B. bassiana* was evaluated by qPCR at days 0, 4 and 7, against liquid culture mediums with different carbon sources, 0.1% laminarin, 0.1% pulverized of *F. oxysporum* and 0.1% pulverized of leaves infested with *P. variabilis*. Among the genes analyzed the highest rate was found in the cultures with *F. oxysporum* to the glycoside hydrolase family 55 (GH55) gene, cultures with *P. variabilis* did not have a significant expression. We postulate that the increased expression of the glycoside hydrolase family 55 (GH55) gene, at day 4, media with *F. oxysporum* may be important in the metabolism of *B. bassiana* against this substrate.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*, exo- $\beta$ -1,3-glucanase, plant pathogens, relative expression.

## 1. Introducción

En la actualidad *Beauveria bassiana* es conocido como un microorganismo de doble control biológico, atacando tanto a plagas de insecto como a fitopatógenos, y

sumándole a esto su amplia distribución mundial, hacen de este microorganismo uno de los referentes más importantes para el control biológico (Ownley *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2009).

\* Corresponding author

E-mail: [montoya\\_wjme@hotmail.com](mailto:montoya_wjme@hotmail.com) (W.J. Montoya).

© 2016 All rights reserved.

DOI: 10.17268/sci.agropecu.2016.03.13

El antagonismo de *B. bassiana* ha sido definido en los últimos años demostrándose la inhibición de enfermedades de plantas causadas por fitopatógenos de origen de suelo como *Rhizoctonia solani* (Lartey y Caesar, 2004) y *Pythium myriotylum* (Clark, 2006). Se ha sugerido la competencia por espacio, el microparasitismo y resistencia inducida como posibles formas de antagonismo (Griffin, 2007; Ownley *et al.*, 2008); sin embargo los resultados varían con los distintos fitopatógenos.

También ha sido sugerido la antibiosis como modo de antagonismo de *B. bassiana*, ya que se ha podido aislar metabolitos secundarios como beauvericina (Leckie *et al.*, 2008) y oosporeina en investigaciones similares a las ya mencionadas, pero no se sabe si estos compuestos juegan un papel en la supresión de enfermedades de las plantas; de igual forma las enzimas son una de las principales moléculas utilizadas en este mecanismo, estas pueden hidrolizar la pared celular del fitopatógeno evitando su normal crecimiento y permitiéndole la introducción de sustancias tóxicas causándole la muerte (Aceves *et al.*, 2005; Ownley *et al.*, 2010).

Los  $\beta$ -1,3-glucanos son polisacáridos que constituye una gran variedad de paredes celulares como la de los hongos filamentosos y Oomycetes (Bowman y Free, 2006; Bacic *et al.*, 2009), muchos de estos microorganismos son fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* y *Peronospora variabilis* responsables de grandes pérdidas agrícolas en el mundo, como el cultivo de *Chenopodium quinoa* que tiene una gran importancia económica en el Perú. Las enzimas capaces de hidrolizar estas estructuras son las  $\beta$ -1,3-glucanasas, las cuales son producidas por una gran variedad de hongos que las utilizan para su desarrollo y en respuesta a las condiciones de agotamiento de fuente de carbono y energía (Pitson *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 2007).

Las investigaciones sobre *Beauveria bassiana* se han centrado generalmente en

explicar su mecanismo de acción a nivel de cultivo y a nivel enzimático estudiando la presencia de enzimas o de su actividad a nivel general, sin embargo son muy pocos los genes identificados en su actividad entomopatógena y antagonista. Aunque existe anotaciones de genes de glucanasas en el genoma de *B. bassiana* no hay referencias de la expresión génica de algún gen  $\beta$ -1,3-glucanasa implicado en su capacidad antagonista.

El objetivo del presente trabajo fue realizar el análisis de la expresión de  $\beta$ -1,3-Glucanasa de *Beauveria bassiana* en medios líquidos suplementados con distintas fuente de carbono los cuales incluye los fitopatógenos *Peronospora variabilis* y *Fusarium oxysporum* y observar variación de la expresión génica.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Lugar de ejecución

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

### 2.2 Métodos de análisis

#### Medios de cultivo

El hongo *Beauveria bassiana* (Cod: CCB-LE 262 - SENASA), fue cultivado en agar de papa y dextrosa (PDA) e incubado a 27 °C por 7 días, el micelio obtenido se traspasó a un medio enriquecido (ME) y se dejó incubar a 28 °C por 4 días, 130 rpm y una humedad relativa de 60%. En la etapa logarítmica de desarrollo el hongo fue centrifugado a 5000 rpm por 20 min y lavado con medio mínimo (MM). El hongo lavado fue repartido a  $6,6 \times 10^7$  conidios por mililitro en cada medio.

Los medios de cultivos líquidos fueron preparados teniendo como base un medio mínimo (MM) para el cultivo de hongos entomopatógenos. Para 100 mL de MM se requiere 0,6 g de NaNO<sub>3</sub>; 0,052 g de KCL; 0,202 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,102 g de MgSO<sub>4</sub>, a esta solución se le agregó 40  $\mu$ L de elementos trazas formulado según Fernandes *et al.* (2012). El ME consistió

en MM más p/v (extracto de levadura 1%, peptona 1% y glucosa 4%); los otros medios consistieron en MM y como única fuente de carbono (p/v) laminarina 0,1% (ML), pulverizado de *Fusarium oxysporum* 0,1% (MF), pulverizado de hojas sanas 0,1% (MH) y pulverizado de hojas con *P. variabilis* 0,1% (MP). Se prepararon 20 mL de medios líquidos en matraces de 50 mL, se incubaron a 28 °C a 130 rpm y con 63% de humedad relativa.

### Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

El hongo de cada uno de los medios de cultivo fue lavado con MM y centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos, al pellet se le agregó 100 µL de lisozima (10 mg/mL) y se dejó incubar a 37 °C por 15 minutos, después se agregó 100 µL de proteinasa K (2 mg/mL) y se dejó incubar a 52 °C por 15 minutos. Luego se colocó en un mortero, se le agregó nitrógeno líquido y se pulverizó hasta que se redujera a un polvo fino.

La extracción del ARN se realizó con el kit High Pure RNA isolation (Cat. No: 11828665001-Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para mejorar la eliminación de ADN, se agregó 9 µL de tampón de reacción ADNasa y 9 µL de ADNasa I, se homogenizó y dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, luego se agregó 9 µL de solución Stop (50 mM EDTA) y se incubó a 70 °C por 10 minutos. Las muestras de ARN fueron cuantificadas con el fluorómetro Qubit® 2.0, con los kits y protocolos de ensayo Qubit™ ARN y ADNc BR (Cod: Q32852 y Q32850 - Lifetechnologies).

Para la síntesis de ADNc se utilizó 100 ng de ARN total empleando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR (Cod: #K1642 - Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante mediante la síntesis con cebadores de secuencias al azar.

### PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real se efectuó con el equipo LightCycler® 96 System mediante el uso del software versión 1.1 y se utilizó el kit FastStart Essential DNA Green

Master (Cat. No: 06402712001 - Roche), el cual incluía SYBR Green I como formato de detección. Los cebadores fueron diseñados con secuencias registradas en la base de datos del NCBI, estos fueron:

BTOF-GATGGCGACGTACTCGATTGTG,  
BTOR-AGGTCCCCATAGGAAGGCTCA  
(XM\_008602115.1); ACTF-  
GCGTACTGGTCCACGCCTTCTC, ACTR-  
GGTGGACTGCGACCATTCATCTC  
(XM\_008596211.1); ExoGF-  
CAACTTTCAGCAGGACAACAACAC,  
ExoGR-CATTGTGCGATTGCATCAGACC  
(XM\_008597142.1); GH55F-  
TGTTGGAATTGCCAGTCGCTACA, GH55R-  
CGAGGATGATGTCGTTGGTCTG  
(XP\_008597332.1).

Para el protocolo de PCR se estableció 40 ciclos, denaturación a 95 °C por 20 s, hibridación 66 °C por 20 s y extensión de 72 °C por 15 s. La secuencia de los productos de amplificación se confirmó por secuenciación estándar en ambas direcciones realizada por la compañía MACROGENE.

### Diseño de evaluación

Cada muestra se examinó en tres tiempos, día 0 (día del inóculo), día 4 y día 7; se utilizó el análisis de la cuantificación relativa descrito por Pfaffl (2004). Para analizar la expresión de los genes exo-beta-1,3-glucanasa putativa (ExoG) y glucósido hidrolasa familia 55 (GH55), se utilizaron como genes de referencia alfa-actinina (ACT) y beta-tubulina (TBO). El MM fue utilizado como calibrador para los medios ML y MF, el medio MH se utilizó como calibrador para el medio MP. Se realizaron tres repeticiones para cada una de las muestras y el análisis fue hecho con el paquete estadístico IBM SPSS versión 20.

### 3. Resultados y discusión

Se observó la expresión relativa de ambos genes desde el día de inoculación obteniéndose un promedio entre los medios de  $1,01 \pm 0,05$  para GH55 y  $0,98 \pm 0,02$  para ExoG. Muchos trabajos destacan a la laminarina como el mayor inductor de enzimas  $\beta$ -1, 3-glucanasas (Donzelli *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2007; Chatterton y

Punja, 2009); sin embargo, también se ha observado una producción baja de  $\beta$ -1, 3-glucanasas en medios con laminarina comparados con sustratos contra las que no tiene actividad enzimática y con la pared celular de otros hongos (De La Cruz *et al.*, 1995; Pitson *et al.*, 1997; El-Katatny *et al.*, 2000; McDougall y Seviour, 2005), nuestros resultados guardan relación con los últimos trabajos mencionados, observándose la menor expresión de ambos genes en el ML comparado con los otros medios de cultivo. Los genes en el MP tienen expresiones diferentes, el gen GH55 disminuye su expresión, mientras que el gen ExoG se mantiene estable con un expresión de  $1,10 \pm 0,06$  y  $1,16 \pm 0,04$  veces más que en el MH en el cuarto y séptimo día, respectivamente (Fig. 1A y B).

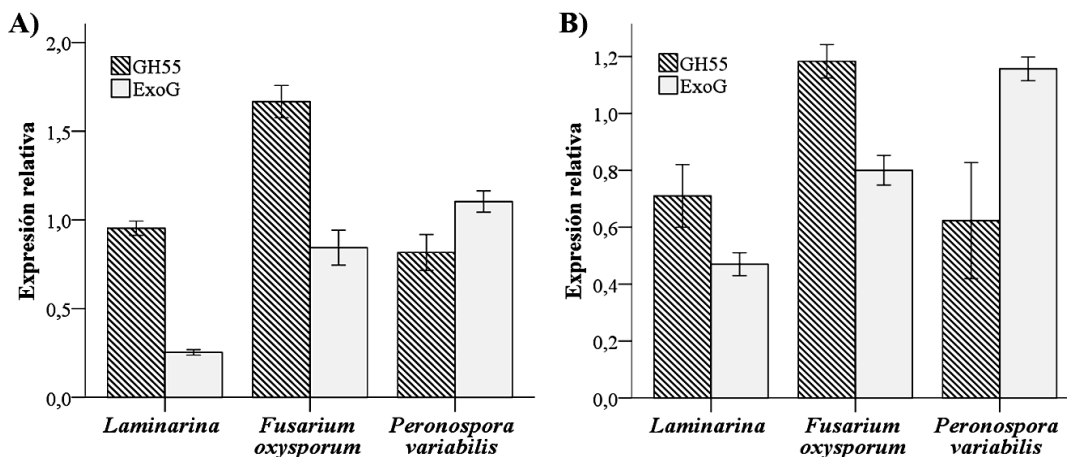
Existe evidencia de que la pared celular de fitopatógenos induce la expresión de enzimas como la  $\beta$ -1,3-glucanasas en ensayos de laboratorio, como la  $\beta$ -1,3-glucanasa Glu1 de *Clonostachys rosea* y exo- $\beta$ -1,3-glucanasa de *Trichoderma asperellum* tag83 (Chatterton y Punja, 2009; Marcello *et al.*, 2010) por mencionar algunos; sin embargo, muchos de estos trabajos no analizan la expresión en base a un medio calibrador u olvidan el factor tiempo en ensayos de medio sólido arrojando en algunos casos resultados altos. Nuestros resultados resaltan un aumento en la expresión del gen GH55 inducida por el pulverizado de *F.*

*oxysporum*, con  $1,67 \pm 0,09$  y  $1,18 \pm 0,06$  veces más que en el MM para el cuarto y séptimo día respectivamente (Fig. 1A y B), este ligero aumento es coherente con los resultados de Giczey *et al.* (2001) que observaron la expresión de la exo- $\beta$ -1, 3-glucanasa cmg1 de *Coniothyrium minitans* frente a *sclerotial parasitism*; sin embargo ninguno de los trabajos mencionados utilizan el método de cuantificación de Pfaffl limitando así las comparaciones.

Muchos hongos producen múltiples  $\beta$ -1,3-glucanasas extracelulares, de 3 o más isoenzimas siendo algunas enzimas constitutivas y otras expresadas según el sustrato, teniendo cada una de estas enzimas diferentes modos de acción (De La Cruz *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2006), esto destaca el hecho de una posible acción cooperativa y la baja expresión de algunas de estas enzimas frente a determinados sustratos, por lo cual es necesario identificar y observar cuál de las isoenzimas tiene una expresión preferencial a su sustrato específico.

#### 4. Conclusiones

La expresión relativa de los ExoG y GH55 de *B. bassiana* en el medio con laminarina disminuye en el cuarto y séptimo día, mientras el aumento de la expresión del gen GH55 en el medio con *F. oxysporum* sugeriría que este gen participa en el metabolismo del hongo en medios de cultivo con fuentes limitadas de carbono.



**Figura 1.** Expresión relativa de los genes exo-beta-1,3-glucanasa putativa (ExoG) y glucósido hidrolasa familia 55 (GH55) de *B. bassiana* en el cuarto día (A) y séptimo día (B).

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (PNICP) y al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal por el Convenio N°189-FINCYT-IB-2013.

## Referencias

- Aceves, M.; Otero-Sánchez, M.A.; Rebolledo-Domínguez, O.; Lezama-Gutiérrez, R.; Ochoa-Moreno, M.E. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma spp.*, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium Oxysporum* in vitro. Revista Chapingo Serie Horticultura 11: 273-278.
- Bowman, S.M.; Free, S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays 28: 799-808.
- Bacic, A.; Fincher, G. B.; Stone, B. A. 2009. Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides. Academic Press. Oxford, UK. 750 pp.
- Chatterton, S.; Punja, Z.K. 2009. Chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. Canadian Journal of Microbiology 55: 356-367.
- Clark, M.M. 2006. Biological control methods for damping-off of tomato seedlings caused by *Pythium myriotylum*. Tesis de maestría, Universidad de Tennessee, Knoxville, USA.
- De La Cruz, J.; Pintor-Toro, J.A.; Benitez, T.; Llobell, A.; Romero, L.C. 1995. A novel endo-beta-1, 3-glucanase, BGN13. 1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology 177: 6937-6945.
- Donzelli, B.G.G.; Lorito, M.; Scala, F.; Harman, G.E. 2001. Cloning, sequence and structure of a gene encoding an antifungal glucan 1, 3- $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*). Gene 277: 199-208.
- El-Katatny, M.H.; Somitsch, W.; Robra, K.H.; El-Katatny, M.S.; Gübitz, G.M. 2000. Production of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technology and Biotechnology 38: 173-180.
- Fernandes, E.G.; Valério, H.M.; Feltrin, T.; Sand, S.T.V. D. 2012. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. Brazilian Journal of Microbiology 43: 827-833.
- Giczey, G.; Kerényi, Z.; Fülöp, L.; Hornok, L. 2001. Expression of *cmg1*, an exo- $\beta$ -1, 3-glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. Applied and environmental microbiology 67: 865-871.
- Griffin, M.R. 2007. *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. Tesis de Ph.D., Universidad de Tennessee, Knoxville, USA.
- Marcello, C.M.; Steindorff, A.S.; da Silva, S.P.; do Nascimento-Silva, R.; Bataus, L.A.M.; Ulhoa, C.J. 2010. Expression analysis of the exo- $\beta$ -1, 3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiological Research 165: 75-81.
- Martin, K.L.; McDougall, B.M.; Unkles, S.E.; Seviour, R.J. 2006. The three  $\beta$ -1, 3-glucanases from *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. Mycological research 110: 66-74.
- Martin, K.; McDougall, B.M.; McIlroy, S.; Chen, J.; Seviour, R.J. 2007. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal  $\beta$ -(1, 3)- and  $\beta$ -(1, 6)-glucanases. FEMS microbiology reviews 31: 168-192.
- McDougall, B.M.; Seviour, R.J. 2005. The effect of dissolved oxygen concentrations on (1 $\rightarrow$ 3)- and (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanase production by *Acremonium sp.* IMI 383068 in batch culture. Enzyme and Microbial Technology 36: 176-181.
- Lartey R.T.; Caesar, A.J. 2004. Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost. Trivandrum, India. 298 pp.
- Leckie, B.M.; Ownley, B.H.; Pereira, R.M.; Klingeman, W.E.; Jones, C.J.; Gwinn, K.D. 2008. Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Biocontrol Science and Technology 18: 697-710.
- Ownley, B.H.; Griffin, M.R.; Klingeman, W.E.; Gwinn, K.D.; Moulton, J.K.; Pereira, R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. Journal of invertebrate pathology 98: 267-270.
- Ownley, B.H.; Gwinn, K.D.; Vega, F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. BioControl 55: 113-128.
- Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin, S.A. (Editor), A-Z of Quantitative PCR, pp. 87-112. Biotechnology Series, International University Line. La Jolla, CA, USA. 882 pp.
- Pitson, S.M.; Seviour, R.J.; McDougall, B.M. 1993. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. Enzyme and Microbial Technology 15: 178-192.
- Pitson, S.M.; Seviour, R.J.; McDougall, B.M. 1997. Effect of carbon source on extracellular (1 $\rightarrow$ 3)- and (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanase production by *Acremonium persicinum*. Canadian Journal of Microbiology 43: 432-439.
- Vega, F.E.; Goettel, M.S.; Blackwell, M.; Chandler, D.; Jackson, M.A.; Keller, S.; Roy, H.E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology 2: 149-159.