

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**Identificación de nuevas enzimas extracelulares involucradas en la actividad entomopatógena de *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 sobre *Lobesia botrana***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

***Matías Ignacio Arias Aravena***

**Directores de Tesis: Dr. Fabiola Altimira Passalacqua.  
Dr. Eduardo Tapia Rodríguez.  
Dr. Sergio Álvarez Armijo.**

**Santiago-CHILE**

**Agosto 2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**MATÍAS IGNACIO ARIAS ARAVENA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Directores de Tesis:**

**Dr. Fabiola Altimira P.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Eduardo Tapia R.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Sergio Álvarez A.**

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Davor Cotoras T.**

\_\_\_\_\_

**Dra. Lorena García N.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Rubén Polanco O.**

\_\_\_\_\_

*Para mis hermosos sobrinos*

*Luciano, Gabriel y Alonso.*

## AGRADECIMIENTOS

Tras culminar un arduo y extenso proceso, resulta utópico atribuirse este logro. Han sido incontables las almas que, como hilos entrelazados, me han auxiliado en este devenir. No solo desde la esfera académica, sino como apoyo de este corazón sensible.

Deseo iniciar este tributo con gratitud hacia mis progenitores, Claudio y Ana, por depositar en mí su confianza y desentrañar el sentido del amor incondicional. Cada victoria que alumbro es un reflejo del amor que prodigan. A ti, padre, mi gratitud sincera; sin tus sacrificios cotidianos, este umbral no habría sido cruzado. Tus atenciones impagables tornaron mis días más livianos, y tu mirada siempre tierna me acompañó en mi travesía. Cada vez más, veo en mí tus trazos, desafiando lo opuesto que pensábamos ser. A ti, madre, mi guía y mi motor; por tus palabras sinceras y el amor sin límites que fluye de ti. Guiándome con amor infinito, me das el valor para afrontar las cumbres de la vida. Espero ser una fracción de lo que ustedes son y que puedan vislumbrar sus sacrificios manifestados en mí. Los amo con una intensidad que excede los confines del tiempo.

Hermanas del alma, agradezco ante todo su constante brillo y por siempre recibirme en sus hogares, para estudiar con mis compañeros y quedar más cerca de la universidad. Cami, hermana querida, tus preocupaciones y amor incondicional son bálsamos en mi sendero. Tus consejos y abrazos han sido indispensables en este proceso. Tu dulzura suavizó la aspereza que a veces dirigía a mi propio ser. Siempre, al cruzar nuestras miradas, siento el orgullo correspondido. Maca, mi hermana mayor, tu empuje me insta a no cejar y luchar por mis sueños. Sin tu influjo, quizás un camino distinto habría seguido. Agradezco tus consejos, impregnados de autenticidad, y tu genuina preocupación. Eres la encarnación del amor y la comprensión. Mis amadas hermanas, los lazos que compartimos son profundos y, si alguna vez fui breve, me disculpo.

A mis amados sobrinos, motores de mi encomienda. Lucianito mío, eres faro de amor y cuidado constante. Tu ternura endulza mi ser y tus palabras son melodías en mi corazón. Gabrielito, tus abrazos y sonrisas son radiantes pinceladas en mi lienzo. Eres un sol, irradiando la vida de quienes te rodean, y en mi firmamento, eres mi estrella de la mañana. A ti, mi yeye adorado, Alonsito, te agradezco por elegirnos como tu refugio de alegría. Tu presencia son risas y ternura, una sinfonía en cada encuentro. Que sepan que mi amor por ustedes supera las galaxias.

No puedo silenciar el nombre de mi Tía Vero y mi nina Toli en el coro de gratitudes. Tía Verito, eres mi confidente suprema, un segundo arrullo materno en mi vida. Tu apoyo económico y emocional son hilos tejidos con cariño, y tu confianza supera mis propias certezas. En Santos Dumont, donde el tiempo se hizo eterno, siempre me recibiste, en almuerzos y salidas nos acompañamos. Viejita querida, gracias por tanto!. A mi nina, en su amor eterno, desafía distancias y entrelaza el tiempo. En la partitura de la vida, nuestro amor resuena, inquebrantable. Las amo con un infinito que se expande más allá de las palabras y abraza el universo.

Gustavo, mi amor eterno, te agradezco por acompañarme en los remolinos de la locura y la tormenta. Eres sinónimo de incondicionalidad desde el primer aliento compartido. Gracias por ser cómplice en cada conquista y bache. Mi gratitud rebasa las palabras por haber encontrado en ti nobleza sublime. En los silencios, hallamos paz, y en tus abrazos, consuelo para mi corazón agitado.

Mis compañeras de colegio fueron mi constante apoyo en el devenir. Agradezco a mis Constanzas. Mi Coni OM, por tardes de estudio compartidas y experiencias inolvidables. A Coni Morales, hermana de alma en los años escolares y por forjar mi identidad. Mi valiosa Val, agradezco tu lealtad en las sombras y tu luz en las penumbras. A Javita, nuestro reencuentro revivió mi corazoncito. A mi Paulita, por su amor sin tiempo ni fronteras.

A mis amigos universitarios, por ayudarme en las tempestades de estrés y melancolía. Sebita, tu compañía fue mi salvavidas; sin tu apoyo, esta travesía no se habría logrado. Siempre te llevaré en mi corazón por todos los años que compartimos y crecimos. Gloria, amiga entrañable, tu lealtad y amor son luz. Agradezco que nos hayamos acompañado en nuestra adolescencia juvenil, donde pudimos redescubrirnos y hoy en día gran parte de lo que soy es producto de nuestras aventuras.

Amigos de la vida, mis socopoyos (Gloria) Jean y Paula, mil gracias por su cariño y compañía. Jean, tu erudición y ternura fueron mis guías. Paula, nuestra conexión fue rápida e impredecible, gracias por tu amor. Me han acompañado durante este último año, con risas, llantos y juegos. Aprovechar de agradecer al juego Dudo (su ca) por conectar nuestros corazones en el azar.

Al equipo del Laboratorio de Entomología y Biotecnología de INIA-La Platina. Seba, brilla en tu nobleza por siempre. Un ser preocupado, fuiste un ejemplo para mí. Pasar a buscarme, sin pedir interés, dejando rastros de tu inmensa humanidad. Te transformaste en mi hermano mayor, tu gesto jamás se perderá en el tiempo. Naty, abriste las puertas de tu hogar y corazón con todo el cariño. Tu preocupación me ayudó en cada paso en la maraña de la vida. Barbi, cómplice de risas y locuras, nunca olvidaré tus dulcecitos que endulzaron mis mañanas. En tus abrazos encuentro un lazo que jamás enflaquece. Claudita, eres fortaleza hecha mujer, una roca con un corazón como un dulce que compartiste conmigo, gracias. A mis jefes, mi gratitud es desbordada. Eduardo, tu confianza fue el cimiento que sostuvo este proceso, muchas gracias por dejar participar en tu equipo y por tus consejos y apoyo. Fabi, maestra en la senda del conocimiento, eres la balsa en mi mar de dudas. Gracias por ser luz, guía y un ser humano tan generoso. Mi gratitud será eterna, porque en todos los pasos que daré estará tu enseñanza presente.

Además de mis directores Fabiola y Eduardo, me gustaría agradecer al profesor Sergio, por su guía en esta epopeya académica. Gracias por ser uno de los profesores que marcó mi estadía en pregrado, y por su confianza y apoyo que demostró en postgrado.

Finalmente agradecer a mi Tía Gladys, que estuvo conmigo durante toda la carrera, aconsejándome y ayudándome desde el amor. La mejor secre del mundo mundial!

Infinitas gracias a todos y todas!!!!

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Entomología y Biotecnología de INIA-La Platina. Contó con el financiamiento de Bayer-Grants4Biologicals-Novel solutions to increase cropproductivity N° 2019-01-031 dirigido por la Dra. Fabiola Altimira Passalacqua.

## ÍNDICE DE MATERIAS

Página

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>FINANCIAMIENTO</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvvi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Lobesia botrana</i> : Plaga cuarentenaria que afecta a la vid. ....	1
1.2 Hongos entomopatógenos: controladores de plagas. ....	4
1.3 Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos sobre insectos. ....	6
1.4. Factores de virulencia involucrados en la actividad entomopatógena .....	9
1.4.1. Adhesinas. ....	9
1.4.2. Enzimas hidrolíticas. ....	9
1.5. Planteamiento del problema. ....	13
1.6. Hipótesis.....	14
1.7. Objetivos. ....	14
1.7.1. Objetivo general .....	14
1.7.2. Objetivos específicos. ....	14
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
2.1. Reactivos. ....	16
2.2. Material biológico. ....	16
2.3. Medios de cultivo. ....	16
2.4. Predicción de enzimas extracelulares a partir del análisis del genoma de <i>Beauveria pseudobassiana</i> RGM 2184. ....	17
2.5. Análisis de genómica comparativa.....	17
2.6. Obtención de proteínas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184. ....	18
2.7. Evaluación de la presencia de exoenzimas en los extractos de proteína. ....	18
2.7.1. Evaluación de actividad proteolítica semicuantitativa. ....	19
2.7.2. Evaluación de actividad lipolítica semicuantitativa. ....	19
2.7.3. Evaluación actividad quitinolítica preliminar. ....	20
2.7.4 Selección de medios de cultivos .....	20
2.8. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida.....	21

2.9. Zimografía para detección de proteasas .....	21
2.10. Zimografía para detección de lipasas .....	22
2.11. Zimografía para detección de quitinasas .....	23
2.12. Identificación de exoenzimas en los extractos enzimáticos A8 y M2 .....	23
2.13. Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de exoenzimas identificadas .....	24
2.14. Evaluación de actividad proteolítica del extracto enzimático M2 .....	25
2.14.1. Evaluación actividad proteolítica a diferentes unidades de pH .....	25
2.14.2. Evaluación actividad proteolítica a diferentes temperaturas .....	25
2.15. Evaluación de actividad lipolítica en extracto M2 .....	26
2.15.1. Evaluación actividad lipolítica a diferentes unidades de pH .....	26
2.15.2. Evaluación de actividad lipolítica a distintas temperaturas .....	26
2.16. Evaluación de actividad quitinolítica del extracto de proteína A8 .....	27
2.16.1. Evaluación actividad quitinolítica a diferentes unidades de pH .....	27
2.16.2. Evaluación actividad quitinolítica a distintas temperaturas .....	27
2.17. Análisis estadístico .....	28
2.18. Análisis comparativo de la composición de aminoácidos de enzimas termófilas, mesófilas y adaptadas al frío .....	28
2.19. Evaluación de la acción hidrolítica sobre el capullo y pupas de <i>L. botrana</i> .....	29
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
3.1. Análisis bioinformático de genoma de <i>Beauveria pseudobassiana</i> RGM 2184 .....	30
3.2. Selección de medios de cultivos para evaluación de actividad enzimática .....	32
3.3. Detección de proteasas, lipasas y quitinasas mediante zimografía .....	33
3.4. Identificación de exoenzimas mediante LC-MS/MS .....	35
3.5. Análisis filogenético de enzimas identificadas por LC-MS/MS .....	40
3.6. Medición actividad proteolítica en extracto M2 a diferentes pH y temperaturas .....	42
3.7. Medición actividad lipolítica del extracto M2 .....	43
3.8. Medición actividad quitinolítica del extracto A8 .....	45
3.9. Análisis de composición aminoacídica de exoenzimas identificadas, en comparación con enzimas mesofílicas, adaptadas al frío y termofílicas .....	46
3.10. Evaluación de la actividad hidrolítica de las enzimas secretadas por la cepa RGM 2184 en seda y pupas de <i>L. botrana</i> .....	48
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
4.1. Análisis bioinformático establece la presencia de genes que codifican enzimas extracelulares que participarían en la actividad entomopatógena de RGM 2184 .....	52
4.2. Análisis de genómica comparativa establece correlación de enzimas extracelulares compartidas entre HEP y su cercanía filogenética .....	54

4.3. Medios de cultivos como inductores de actividad enzimática proteolítica, lipolítica y quitinolítica. ....	54
4.4. Precipitación por acetona y obtención de enzimas adaptadas al frío. ....	57
4.5. Detección e identificación de enzimas potencialmente involucradas en la actividad entomopatógena de la cepa RGM 2184. ....	59
4.6. Los extractos proteicos denotan catalizar sustratos de proteasas, lipasas y quitinasas en un amplio rango de pH y temperatura. ....	63
4.7. La composición aminoacídica de las enzimas identificadas mediante LC-MS/MS, es similar a la de enzimas adaptadas al frío. ....	66
4.8. Los extractos demostraron ser activos en la degradación sobre pupas y seda de <i>L. botrana</i> a bajas temperaturas. ....	68
<b>5. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>70</b>
<b>6. PROYECCIONES. ....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERENCIAS. ....</b>	<b>72</b>
<b>8. ANEXOS. ....</b>	<b>83</b>
8.1. Proteasas, lipasas y quitinasas extracelulares predichas en el genoma de <i>B. pseudobassiana</i> RGM 2184. ....	83
8.2. Genomas de hongos entomopatógenos utilizados para Blast score ratio y porcentaje de genes presentes en cada HEP. ....	84
8.3. Curvas de calibración. ....	85
8.4. Gráficos de cinética proteolítica a los diferentes pHs. ....	86
8.5. Gráficos de cinética proteolítica a diferentes temperaturas a pH 7. ....	87
8.6. Actividad proteolítica de extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2. ....	88
8.7. Gráficos de cinética lipolítica a los diferentes pHs. ....	89
8.8. Gráficos de Cinética lipolítica a diferentes temperaturas a pH 2 constante. ....	90
8.9. Gráficos de Cinética lipolítica a diferentes temperaturas a pH 8 constante. ....	90
8.10. Actividad lipolítica de extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2. ....	91
8.11. Gráficos de cinética quitinolítica a los diferentes pHs. ....	92
8.12. Gráficos de cinética quitinolítica a diferentes temperaturas a pH 3. ....	93
8.13. Actividad quitinolítica de extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio A8. ....	94
8.14. Listado de enzimas utilizadas para análisis de composición aminoacídica. ....	95
8.15. Composición aminoacídica de las enzimas y análisis estadístico. ....	96
8.16. Mapa de calor comparativo de identidades de las lipasas predichas <i>in silico</i> en RGM 2184. ....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BPPD</b>	División de Biopesticidas y Prevención de Contaminación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.
<b>CYP52</b>	Citocromo P450 familia 52.
<b>DGAC</b>	Dirección General de Aeronáutica Civil.
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.
<b>FDF</b>	Fundación para el Desarrollo Frutícola.
<b>GlcNAc</b>	N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina.
<b>HEP</b>	Hongo entomopatógeno.
<b>INIA</b>	Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem.
<b>MIP</b>	Manejo integrado de plagas.
<b>MM</b>	Marcador de masa molecular
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica de Estados Unidos.
<b>PDA</b>	Agar papa dextrosa.
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PMCP</b>	Productos microbianos de control de plagas.
<b>PI</b>	Punto isoelectrico.
<b>p-NFD</b>	p-nitrofenildodecanoato.
<b>pNG</b>	p-nitrofenil- $\beta$ -d-acetilglucosaminida.
<b>SAG</b>	Servicio Agrícola y Ganadero de Chile.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico.
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido.
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano.
<b>USD</b>	Dólar estadounidense.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>L. botrana</i> .....	2
<b>Figura 2.</b> Composición de la seda de capullo de lepidópteros .....	3
<b>Figura 3.</b> Diferentes estructuras celulares de los hongos entomopatógenos .....	6
<b>Figura 4.</b> Ciclo de infección y desarrollo de un hongo entomopatógeno (HEP) sobre una pupa de insecto .....	7
<b>Figura 5.</b> Imágenes representativas de colonización de una cepa de <i>Beauveria pseudobassiana</i> en pupas con capullo de <i>L. botrana</i> .....	13
<b>Figura 6.</b> Esquema ilustrativo de la estrategia de estudio empleada en este proyecto de tesis. ....	15
<b>Figura 7.</b> Mapa de calor que muestran los niveles de similitud entre los genes que codifican exoenzimas de <i>B. pseudobassiana</i> RGM 2184 en comparación con otros hongos entomopatógenos .....	31
<b>Figura 8.</b> Evaluación de exoenzimas en cultivos de la cepa RGM 2184 .....	33
<b>Figura 9.</b> Zimografía de extractos de proteínas del sobrenadante del cultivo de la cepa RGM 2184 en medio M2 y A8 .....	34
<b>Figura 10.</b> Proteasas extracelulares encontradas en el extracto de proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en el medio M2.....	37
<b>Figura 11.</b> Lipasas extracelulares encontradas en el extracto de proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en el medio M2 y A8.....	38
<b>Figura 12.</b> Quitinasas extracelulares encontradas en el extracto de proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en el medio M2 y A8.....	39
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético de exoproteasas, exolipasas y exochitinasas descritas y/o predichas en hongos entomopatógenos .....	41
<b>Figura 14.</b> Actividad proteolítica del extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2.. .....	42
<b>Figura 15.</b> Actividad lipolítica del extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2 .....	44
<b>Figura 16.</b> Actividad quitinolítica del extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio A8.....	46
<b>Figura 17.</b> Diagrama de dispersión tridimensional según composición aminoacídica .....	47
<b>Figura 18.</b> Micrografías SEM de sedas de <i>L. botrana</i> expuestas a los extractos proteicos de la cepa RGM 2184.....	54
<b>Figura 19.</b> Micrografías SEM de pupas de <i>L. botrana</i> expuestas a los extractos proteicos de RGM 2184.....	51

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Métodos de concentración de enzimas adaptadas al frío .....	58
<b>Tabla 2.</b> Temperatura óptima de enzimas descritas como adaptadas al frío. ....	65

## RESUMEN

La polilla de la vid, *Lobesia botrana*, es una plaga cuarentenaria que afecta la exportación de uva de mesa nacional. Este insecto se encuentra en estado de pupa, cubierto de un denso capullo durante la época de otoño-invierno. Actualmente, no existen métodos de control comercial para *L. botrana* durante este periodo. Sin embargo, el hongo entomopatógeno (HEP) *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 demostró un nivel máximo de eficacia del 80% contra esta plaga en ensayos de campo realizados en dos regiones de Chile, durante dos temporadas de otoño-invierno. Se ha descrito que la acción biocontroladora de los HEPs está dada por la secreción de enzimas hidrolíticas (lipasas/proteasas/quitinasas) que degradan los distintos componentes de la cutícula del artrópodo. En base a estos antecedentes, se postula la siguiente hipótesis: El hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 secreta enzimas hidrolíticas adaptadas al frío, capaces de degradar la seda del capullo y la cutícula de la pupa de *Lobesia botrana*. Para abordar esta hipótesis se realizó una predicción de exoenzimas con actividad lipolítica/quitinolítica/proteolítica en el genoma de la cepa RGM 2184, por el cual se detectaron 45 proteasas, 11 lipasas y 3 quitinasas. Se cultivó el HEP en medios líquidos para inducir la secreción de proteasas, lipasas y quitinasas. Por medio de una precipitación por acetona, se obtuvieron los extractos proteicos del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en cada uno de los medios de cultivo. Mediante zimografía se logró visualizar tres proteasas y una lipasa, que presentaron masas moleculares de 32, 105, 133 y 52 kDa, respectivamente. Los extractos proteicos fueron analizados por medio de espectrometría de masas logrando identificar 2 proteasas (P1 y P2), 2 lipasas (Lip1 y Lip2) y 3 quitinasas (Chi1, Chi2 y Chi3). A través de ensayos de actividad enzimática realizados a distintos pHs y temperaturas, se evaluó la actividad de los extractos proteicos. En el caso de las proteasas, la mayor actividad se registró a pH 7 y a 50°C. Por otro lado, la actividad lipolítica registró dos picos de actividad, a pH ácido (pH 2) y a pH básico (pH 8). En el caso de pH ácido, la mayor actividad se registró a 25°C. Mientras que a pH 8 se visualizaron dos picos, a 10 y 25°C. La actividad quitinolítica presentó mayor actividad a pHs ácidos (entre 2 y 5). Las quitinasas del

extracto presentaron en conjunto mayor actividad a 45°C. Adicionalmente, la exposición de pupas y seda a los extractos proteicos obtenidos tanto a 10 como a 25°C, evidenciaron daños estructurales debido a la acción de enzimas extracelulares de la cepa RGM 2184.

En base a estos resultados se concluye que la cepa *B. pseudobassiana* RGM 2184 secreta una batería enzimática que presenta actividad catalítica en un amplio rango de temperaturas y pHs. Estas enzimas son capaces de degradar matrices complejas de tejidos de insectos a bajas temperaturas, otorgándole al HEP una ventaja competitiva sobre otras estrategias de control, como los insecticidas químicos, que no pueden penetrar en el capullo de insectos.

## ABSTRACT

### **Identification of new extracellular enzymes involved in the entomopathogenic activity of *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 on *Lobesia botrana*.**

The grapevine moth, *Lobesia botrana*, is a quarantine pest that affects domestic table grape exports. This insect is in the pupal stage, covered with a dense cocoon during the autumn-winter season. Currently, there are no commercial control methods for *L. botrana* for this period. However, the entomopathogenic fungus (HEP) *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 demonstrated a maximum efficacy level of 80% against this pest in field trials conducted in two regions of Chile, during two autumn-winter seasons. It has been described that the biocontrol action of HEPs is due to the secretion of hydrolytic enzymes (lipases/proteases/chitinases) that degrade the different components of the arthropod cuticle. Based on this background, it is postulated that the entomopathogenic fungus *B. pseudobassiana* RGM 2184 secretes cold-adapted hydrolytic enzymes capable of degrading the cocoon and cuticle silk of the moth *L. botrana*.

To address this hypothesis, a prediction of exoenzymes with lipolytic/chitinolytic/proteolytic activity was performed on the genome of strain RGM 2184, whereby 45 proteases, 11 lipases and 3 chitinases were detected. HEP was cultured in liquid media to induce secretion of proteases, lipases and chitinases. By acetone precipitation, protein extracts were obtained from the supernatant of the RGM 2184 culture in each of the culture media. By zymography, three proteases and one lipase were visualized with molecular masses of 32, 105, 133 and 52 kDa, respectively. The protein extracts were analyzed by mass spectrometry, identifying 2 proteases (P1 and P2), 2 lipases (Lip1 and Lip2) and 3 chitinases (Chi1, Chi2 and Chi3). The activity of the protein extracts was evaluated by means of enzyme activity assays performed at different pHs and temperatures. In the case of proteases, the highest activity was recorded at pH 7 and at 50°C. On the other hand, lipolytic activity registered two peaks of activity, at acidic pH (pH 2) and at basic pH (pH 8). In the case of acid pH, the highest activity was recorded at 25°C. While

at pH 8, two peaks were visualized, at 10 and 25°C. The chitinolytic activity presented higher activity at acidic pHs (between 2 and 5). The chitinases of the extract showed overall higher activity at 45°C. Additionally, the exposure of pupae and silk to the protein extracts obtained at 10 and 25°C showed structural damage due to the action of extracellular enzymes of strain RGM 2184.

Based on these results, it is concluded that strain *B. pseudobassiana* RGM 2184 secretes an enzyme battery that exhibits catalytic activity over a wide range of temperatures and pHs. These enzymes can degrade complex insect tissue matrices at low temperatures, giving HEP a competitive advantage over other control strategies, such as chemical insecticides, which cannot penetrate the insect cocoon.

## 1. INTRODUCCIÓN

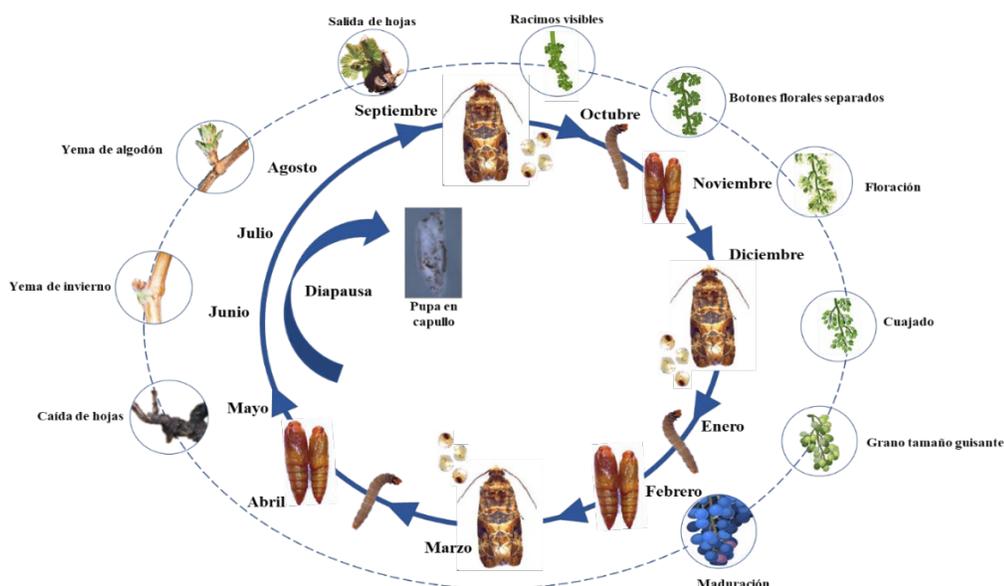
### 1.1 *Lobesia botrana*: Plaga cuarentenaria que afecta a la vid.

Chile lidera la exportación de uva de mesa a nivel mundial, exportando cerca de 604.900 toneladas en la temporada 2022. Lo que se tradujo en USD 951,2 millones de retorno económico (ASOEX, 2022). Dado a que la uva de mesa es cultivada primordialmente para su exportación, la sanidad vegetal es uno de los desafíos imperativos para su producción y venta.

Una de las principales plagas que afecta la oferta exportadora de uva de mesa en Chile es la polilla del racimo de vid, *Lobesia botrana* (Lepidóptero: Tortricidae). Este es un insecto del orden de los lepidópteros, que fue detectado por primera vez en el territorio nacional el año 2008, en la zona de Linderos, Región Metropolitana. Debido al gran daño producido en cultivos de uvas, el SAG la declaró bajo control obligatorio mediante la Resolución N°5.916/2016 modificada por las Resoluciones N°3.213/2017 y N°6.810/2019. *L. botrana* es una de las seis plagas cuarentenarias presentes en Chile, lo que en la práctica significa que basta con un individuo de esta especie en la fruta para que se rechace el lote completo de exportación a China, Japón y Estados Unidos (principales importadores de la uva de mesa chilena; SAG, 2021a). Actualmente, la región que presenta el mayor número de predios con la plaga es la Región de O'Higgins (SAG, 2021b).

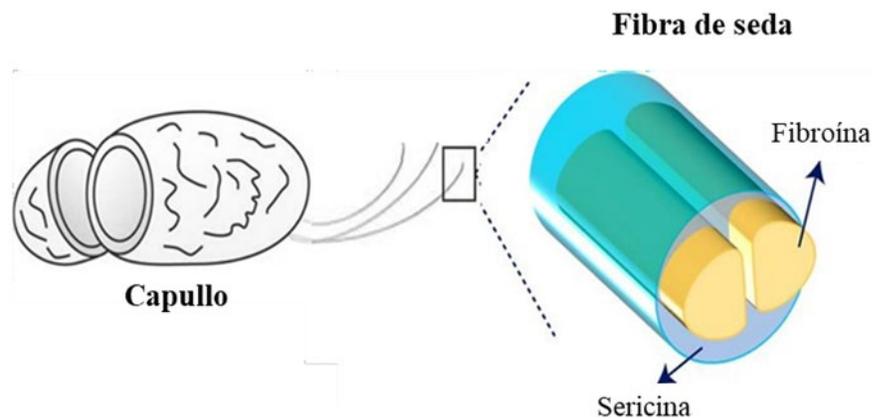
Los daños provocados por esta polilla en la vid se deben a que las larvas de esta especie se alimentan exclusivamente de las flores, brotes y frutos de la parra (Vitta, 2020a). Las perforaciones ocasionadas para poder penetrar la baya, produce la liberación de jugos azucarados que propician la proliferación de hongos fitopatógenos causando la podredumbre del racimo (Altimira, 2020). Esto se traduce en pérdidas económicas, tanto por la disminución del rendimiento y calidad de la uva, como por el costo de la aplicación de fungicidas para controlar a los hongos oportunistas.

Los tratamientos para el control de *L. botrana* consisten principalmente en impedir la reproducción de polillas adultas mediante el método de confusión sexual; y el empleo de agroquímicos para el control de larvas y huevos (Vitta, 2020b). Sin embargo, durante la temporada otoño-invierno, los individuos de esta especie se encuentran en estado de pupa, envueltos por un denso capullo que impide la penetración de agroquímicos (Altimira, 2020). Durante este periodo de su ciclo de vida, el estadio de pupa se prolonga por aproximadamente 3 meses, debido a que las temperaturas bajas amenazan la supervivencia de la polilla (Figura 1). Este trimestre la pupa se mantiene inmóvil dentro del capullo en un estado fisiológico de inactividad (diapausa). Las polillas emergen en septiembre y los huevos de esta generación eclosionan en octubre. Estas larvas se alimentan de los brotes florales de la vid (Figura 1). Afectando de esta forma el rendimiento y calidad de la uva.



**Figura 1. Ciclo de vida de *L. botrana*.** En temporada de otoño invierno *L. botrana* inverte en estado pupa cubierta con un capullo que es refractario a la penetración de los agroquímicos. Este estado fisiológico de inactividad se denomina diapausa. El círculo compuesto por flechas, indica los estados de desarrollo de la especie para cada mes del año. La elipse segmentada señala los estados fenológicos de la uva de mesa asociado a cada estado de desarrollo y mes. (Adaptado de Vitta, 2020).

En el proceso de pupar, las glándulas labiales de la larva secretan fibras proteicas que forman la seda de un capullo de hibernación. En el orden de los lepidópteros, se ha descrito que la seda se compone mayoritariamente por dos glicoproteínas (Fedic *et al*, 2002). El exterior, la fibra se recubre por sericina (Figura 2), la cual está compuesta en un 32% por serina. La alta presencia de este aminoácido permite unir las fibras entre sí mediante enlaces de hidrógeno (Huang *et al.*, 2003). Su interior en cambio se conforma por la glicoproteína denominada fibroína. Este polipéptido presenta una naturaleza hidrofóbica, debido a que está constituido por secuencias repetidas de aminoácidos hidrofóbicos (G-X, X=A, S, T o V) (Gaviria *et al*, 2015). La alta presencia de glicina permite la compactación de las láminas beta, debido al pequeño tamaño de este aminoácido. Por su parte, la alanina, debido a su radical metilo (-CH<sub>3</sub>), le confiere rigidez a cada una de las capas de láminas beta (Carrazcosa *et al.*, 2015). Las propiedades descritas del capullo le permiten a la pupa ser resistente a la tracción junto con evadir a depredadores y agroquímicos, ya que no se pueden adherir o penetrar el capullo (Ho *et al.*, 2012).



**Figura 2. Composición de la seda de capullo de lepidópteros.** Las fibras de seda se componen por dos núcleos de fibroína en el centro, envueltos por la glicoproteína sericina (Adaptada de Jie *et al.*, 2020).

Para lograr controlar a la polilla durante este estadio, el empleo de microorganismos entomopatógenos, es decir, microorganismos que causan enfermedad en insectos, surge como una solución sustentable y eficiente. Esta estrategia permite disminuir la población de polillas adultas

en primavera, lo que se traduce en una futura menor aplicación de agroquímicos y menos daños por parte de sus larvas descendientes (Altimira, 2022). Esto beneficia directamente la inocuidad de los alimentos, disminuye los costos asociados al control de la plaga y a la posibilidad de que genere resistencia frente a los insecticidas (Abbey, 2019). La reducción de los niveles de plaguicidas utilizados en el control de plagas es relevante en el contexto ambiental actual. Dado que el uso de plaguicida incrementa los riesgos ecotoxicológicos hacia organismos no objetivo, fauna silvestre terrestre y acuática (Sánchez-Bayo, 2012). Adicionalmente, la biodegradación de estos compuestos produce gases invernadero que agravan el cambio climático (Altimira, 2020).

## **1.2 Hongos entomopatógenos: controladores de plagas.**

Los hongos entomopatógenos (HEP) son microorganismos capaces de infectar y controlar la población de insectos de forma natural. Esto los convierte en una alternativa sustentable para el control de plagas (Singh *et al.*, 2017). Alrededor de 800 especies de hongos han sido descritas como HEP, siendo las pertenecientes al orden Hypocreales las mayormente estudiadas. Esto debido a que presentan un amplio rango de hospedero y son fáciles de producir a gran escala (Quesada-Moraga *et al.*, 2022). Diversas formulaciones comerciales con HEP han sido utilizadas para el control de plagas en cultivos. Cerca de un 80% de los productos disponibles en el mercado se basan en los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, particularmente en las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Butt *et al.*, 2016).

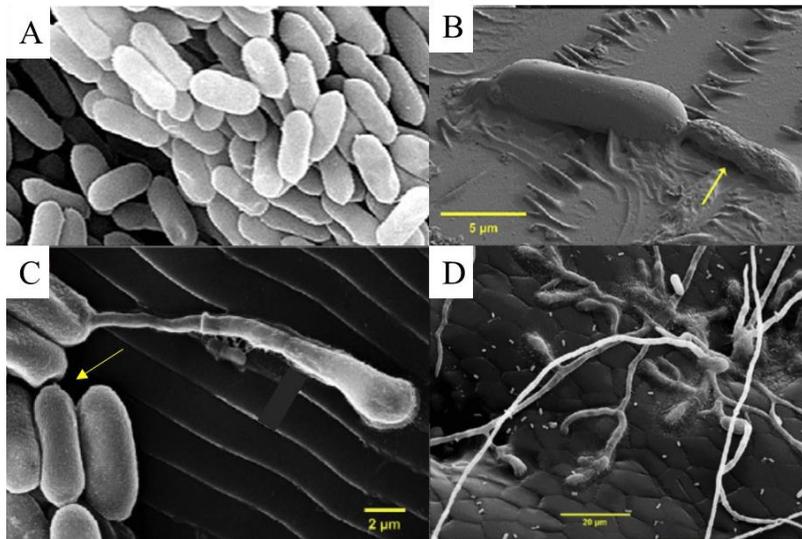
A nivel global las distintas jurisdicciones internacionales han incentivado el registro y uso de biopesticidas. Por ejemplo, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) formó en 1994 la División de Prevención de Contaminación y Biopesticidas (BPPD), la que facilita el registro de productos microbianos controladores de plagas (PMCP), y promueve su uso en los programas de manejo integrado de plagas (MIP) (Leahy, 2014). Actualmente se han registrado 25

PMCP en base de hongos entomopatógenos en la EPA. Algunos de estos son Biogard® y Mycotrol®, ambos basados en *B. bassiana*. Biogard® demostró un 86% de eficacia en cultivos de repollo (Familia: Brassicaceae) infestados con pulgón verde (Prince y Chandler, 2020) y Mycotrol® registró un 65% contra *Diuraphis noxia* en un cultivo de trigo (Familia: Poaceae (Hatting, 2010). En el contexto nacional se han registrado 4 PMCP basados en HEPs para el control de plagas: Naturalis L®, Botanigard 22 WP®, Micosplag WP® y Nofly WP® (SAG, 2022c). El principio activo del primero y segundo corresponde a *B. bassiana* y se utilizan para el biocontrol de pulgones y trips respectivamente. Mientras que el tercero se compone de *Metarhizium anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*, y se emplea para el control de nemátodos. El cuarto utiliza como principio activo a una cepa de *Paecilomyces fumosoroseus* para la mitigación de las poblaciones de nematodo. Los cuatro productos se pueden aplicar en una diversidad de cultivos de interés económico, como carozos, vid y berries (SAG, 2022c).

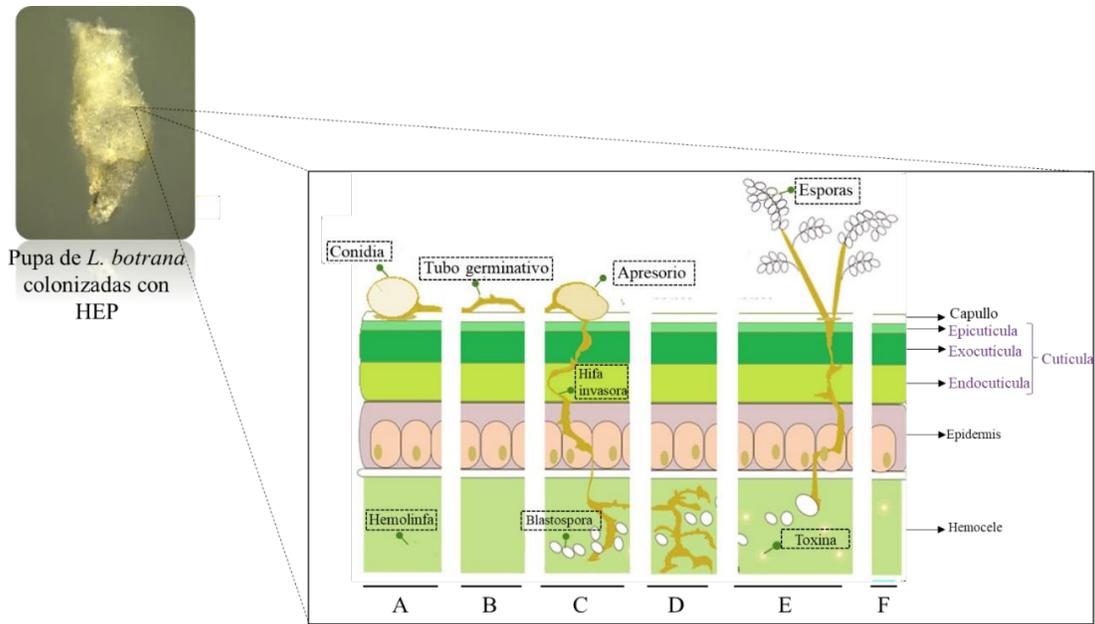
Con respecto al control de *L. botrana* mediante HEP, el Laboratorio de Entomología y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) se adjudicó el proyecto “Desarrollo de un biopesticida en base a hongos entomopatógenos para biocontrol y/o manejo integrado de *L. botrana* en vides como una alternativa sustentable en el cambio climático PYT-2017-0182” (Tapia, 2020). En el marco de esta investigación se evaluaron distintas cepas de HEPs y formulaciones en las regiones de O’Higgins y Metropolitana. La cepa *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 registró una eficacia máxima de 80% contra la plaga de *L. botrana* en las temporadas de otoño-invierno 2018-2019 (Altimira *et al.*, 2019). Las temperaturas promedio de ambas temporadas oscilaron entre los 4 y 15°C (DGAC, 2021). Estos antecedentes sugieren que *B. pseudobassiana* RGM 2184 es eficaz para el control de *L. botrana* y su actividad entomopatógena se encuentra activa a bajas temperaturas.

### 1.3 Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos sobre insectos.

A diferencia de virus y bacterias, los hongos entomopatógenos no requieren ser ingeridos para colonizar el insecto; estos penetran directamente la cutícula (Esparza, 2017). La cutícula, que corresponde al exoesqueleto de este tipo de artrópodo, corresponde a una matriz rígida compuesta por macromoléculas de distinta naturaleza (lípidos, proteínas y quitina principalmente; Balabanidou *et al.*, 2018). Para poder desintegrar esta barrera protectora, los HEP se diferencian en estructuras celulares que son morfológicamente diferentes entre sí. Estas estructuras son: conidias, tubo germinativo, apresorio, blastosporas e hifas (Figura 3). Cada una de ellas cumplirá un rol importante en el proceso de infección del insecto.



**Figura 3. Diferentes estructuras celulares de los hongos entomopatógenos.** (A) conidias; (B), apresorio (flecha en amarillo); (C), blastosporas (flecha en amarillo) en el interior del hemocele (cavidad llena de sangre o hemolinfa que poseen los insectos); (D), hifas (Adaptado de Butt *et al.*, 2016).



**Figura 4. Ciclo de infección y desarrollo de un hongo entomopatógeno (HEP) sobre una pupa de insecto.** Panel A: Adhesión de la conidia; Panel B: Germinación de la espora; Panel C: Diferenciación de apresorio y penetración de la cutícula; Panel D: Colonización; Panel E: Emergencia de las hifas y esporulación; Panel F: Estratos que debe atravesar el HEP para colonizar la hemolinfa (Adaptada de Anatis bioprotection, 2017).

La primera etapa del proceso de infección corresponde a la adhesión de las conidias (esporas) del HEP a la cutícula del hospedero (Butt *et al.*, 2016) (Figura 4, panel A). Para ello, los HEP presentan en su superficie proteínas hidrofóbicas denominada hidrofobinas y adhesinas que participan en la adhesión a la cutícula del insecto (Wang y Leger, 2007; Zhou *et al.*, 2021). Subsecuentemente a la etapa de adhesión, el HEP debe penetrar la compleja matriz que representa la cutícula. Para que esto ocurra las conidias cuentan con enzimas adosadas a su pared celular (Safavi *et al.*, 2011; Mondal *et al.*, 2016), las que degradan la superficie del hospedero y liberan nutrientes que inducen su germinación (Santi *et al.*, 2010; Ortiz Urquiza y Keyhani, 2013). Adicionalmente, la degradación de lípidos en la cutícula incrementa la hidrofobicidad y la adherencia de la conidia. Una vez que germina la espora, se forma el tubo germinativo (Figura 4, panel B). Esta estructura es una extensión citoplasmática con geometría cilíndrica, a través de la cual se movilizan lípidos desde la espora hacia el extremo opuesto del tubo germinativo. Estos se

metabolizan liberando como productos glicerol y polioles. La propiedad hidrofílica de estos compuestos comienza a aumentar la presión hidrostática en el extremo, formando una protuberancia conocida como apresorio (Figura 4, panel C; Butt *et al.*, 2016). La función de esta estructura morfológica es ejercer presión sobre la superficie de la cutícula del insecto, para generar la ruptura mecánica de la matriz (Santi *et al.*, 2010). Sin embargo, este proceso es insuficiente por sí solo para que el HEP penetre la cutícula del artrópodo. Complementariamente, el hongo secreta un cóctel enzimático capaz de degradar los componentes de la cutícula (Alves *et al.*, 2020). A medida que el HEP invade la matriz del exoesqueleto, desde el apresorio emerge la hifa invasora (Figura 4, panel C). Esta estructura es un filamento multicelular que secreta enzimas hidrolíticas que degradan los diferentes estratos de la cutícula (ver estratos en Figura 4, panel F). Posteriormente, la hifa se extiende hacia la hemolinfa (Butt *et al.*, 2022). La hemolinfa es el tejido conectivo líquido por donde se distribuyen los nutrientes hacia las células del organismo artrópodo. Una vez que la hifa entra en contacto con la hemolinfa, el HEP inicia una multiplicación tipo levadura, dando lugar a las blastosporas (Figura 4, panel C). Las blastosporas poseen una membrana delgada, que presenta una alta relación superficie/volumen, lo que optimiza la absorción de nutrientes (Esparza *et al.*, 2017). A diferencia de las conidias, la superficie de las blastosporas es mayormente hidrofílica, lo cual evita la formación de aglomerados en la hemolinfa (Holder y Keyhani, 2005; Esparza *et al.*, 2017). Adicionalmente, la pared de esta estructura celular presenta menor número de epítopes de carbohidratos reconocidos por el sistema inmunológico del artrópodo, en comparación a la pared de las conidias e hifas (Butt *et al.*, 2016). Conjuntamente, las blastosporas son capaces de regular negativamente la respuesta inmune por medio de la síntesis y secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, denominados metabolitos secundarios (Zhang *et al.*, 2020). El daño mecánico producido por la colonización de los tejidos (Figura 4, panel D) y la captación de nutrientes de la hemolinfa por el HEP conlleva la muerte del insecto. Una vez que se agotan los recursos nutritivos del insecto, las blastosporas se diferencian en hifas que emergen hacia el exterior, donde desarrollan la capacidad conidiógena y comienzan un nuevo

ciclo de esporulación (Figura 4, panel E; Baron *et al.*, 2019).

#### **1.4. Factores de virulencia involucrados en la actividad entomopatógena**

##### **1.4.1. Adhesinas.**

Como se mencionó anteriormente, la primera etapa del mecanismo entomopatógeno fúngico es la adhesión de las esporas a la superficie del capullo o cutícula del insecto. Para optimizar este proceso, la superficie de la espora del HEP presenta dos tipos de proteínas: hidrofobinas y adhesinas (MAD 1). Las hidrofobinas son proteínas hidrofóbicas de bajo peso molecular ricas en cisteína. Dada la naturaleza hidrofóbica de la capa externa de la cutícula, la presencia de estas proteínas aumenta las interacciones entre espora-cutícula (Cruz-Avalos *et al.*, 2018). La adhesina MAD 1 reconoce la cutícula del hospedero y aumenta la adhesión de la conidia a la superficie (Wang y Leger, 2007; Zhou *et al.*, 2021).

##### **1.4.2. Enzimas hidrolíticas.**

Los hongos entomopatógenos producen un cóctel de enzimas hidrolíticas para lograr penetrar la cutícula y epidermis del insecto, que incluye lipasas, proteasas, quitinasas y fosfolipasas (Vidhate *et al.*, 2022). Algunas de las enzimas degradadoras de cutícula determinan la virulencia de cepas de HEP, denotando su relevancia en la actividad entomopatógena (Fan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2020; Umaru y Simarani, 2022).

Dada la composición heterogénea y estratificada de la cutícula del insecto, la acción de los distintos tipos de enzimas es temporalmente coordinada. Las primeras en actuar son las lipasas (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). La importancia de estas enzimas es hidrolizar los enlaces ésteres de las lipoproteínas, grasas y ceras presentes principalmente en la epicutícula del insecto (Ali *et al.*,

2014). La temprana acción de las lipasas libera nutrientes que inducen la germinación de la espora (Butt *et al.*, 2016). Por ejemplo, el HEP *Nomureae rileyi* aumentó considerablemente la germinación de sus conidias en un medio que contenía una lipasa extracelular del mismo HEP (Supakdamrongkul *et al.*, 2010). Se ha descrito en *B. bassiana* que lipasas pertenecientes a la familia del citocromo monooxigenasa P450 (CYP52) tienen un rol importante en la degradación de la epicutícula y alquenos presentes en ella (Mondal *et al.*, 2016). Se descubrió que las distintas isoformas de las enzimas fúngicas CYP52 muestran actividades y especificidades diferentes en relación con el tipo de alqueno y/o ácido graso. Lo que les confiere una gran ventaja a los HEP para utilizar estos sustratos como nutrientes y degradarlos en la penetración de la cutícula del insecto (Mondal *et al.*, 2016). En esta misma especie de HEP se caracterizó una lipasa de esta familia denominada CYP52X1. Se comprobó que además de hidrolizar enlaces ésteres, tiene actividad  $\omega$ -hidroxilasa, lo que le permite agregar un grupo -OH en el metilo terminal de ácidos grasos, actividad que está involucrada en la asimilación de lípidos como nutrientes (Zhang *et al.*, 2012). Conidias de cepas mutantes con el gen deleciónado para este complejo enzimático, disminuyeron su tasa de germinación y su virulencia frente al insecto *Galleria mellonella* cuando se aplicaron de manera tópica. Sin embargo, al ser administradas directamente en la hemolinfa no había cambios en la mortalidad del insecto en comparación con las cepas silvestres (Zhang *et al.*, 2012). Por lo tanto, los distintos estudios apuntan a que la acción de lipasas secretadas por parte del HEP son esenciales en las etapas de germinación y penetración de la cutícula.

Posterior a la degradación de la epicutícula por parte de las lipasas, la acción de proteasas se hace relevante. Las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, liberando péptidos más pequeños o aminoácidos. En el contexto de penetración de cutícula, estas degradan los componentes peptídicos que conforman la arquitectura del exoesqueleto del insecto e inactivan a péptidos antifúngicos secretados por el hospedero (Mukherjee y Vilcinskas, 2017). Su acción es esencial para la degradación de la exocutícula (Figura 4, panel F), debido a que esta se

compone principalmente por proteínas esclerotizadas. Las enzimas proteolíticas mayormente estudiadas en HEP son las proteasas tipo subtilisina Pr1 y tipo tripsina Pr2. Pr1 es una serín proteasa, que hidroliza enlaces peptídicos no terminales (endopeptidasa), con una mayor afinidad por aminoácidos hidrofóbicos (Leger *et al.*, 1994; Semenova *et al.*, 2020). Se ha demostrado que las conidias presentan enzimas Pr1 unidas a su membrana, las cuales modifican la superficie de la cutícula del insecto, aumentando la adhesión de las esporas (Leger *et al.*, 1996; Safavi, 2011). Estas endoproteasas se han descrito en *M. anisopliae* (Shah *et al.*, 2005), *Cordyceps sinensis* (Zhang *et al.*, 2008) y *B. bassiana* (Donatti *et al.*, 2008). Los HEP presentan múltiples isoformas de Pr1. Estas isoenzimas difieren en su especificidad de sustrato, propiedades de adsorción a la cutícula y estabilidad alcalina, indicativas de diferencias funcionales. Estas diferencias físicas y bioquímicas le permiten a un mismo hongo entomopatógeno infectar insectos de distinto orden (Mondal *et al.*, 2016). Existe una correlación entre la cantidad de isoformas que posee el HEP con su rango de hospedero. Por ejemplo, la especie generalistas *M. anisopliae* (amplio espectro de hospederos) poseen 11 genes Pr1 (Pr1AeK), en cambio las especies especialistas (acotado espectro de hospedero) poseen 7 copias (Bagga *et al.*, 2004). Las proteasas tipo-tripsina Pr2 también son serín proteasa, sin embargo, presentan mayor afinidad por aminoácidos catiónicos (Arg/Lys; Rosas-García *et al.*, 2014). Su actividad es menor a la de Pr1, por lo que se su acción se considera complementaria en la degradación de la cutícula. En aislados de *B. bassiana* se compararon los parámetros cinéticos de ambas serín proteasas (Firouzbakht *et al.*, 2015): la velocidad máxima fue mayor en Pr1, mientras que la Km fue menor en Pr2. Estas observaciones permiten inferir una mayor eficiencia de Pr1 en la degradación de la cutícula y una mayor estabilidad del complejo enzima-sustrato de Pr2. Recientemente, se analizaron las 11 isoformas de Pr1 presentes en *B. bassiana*. Se hizo una delección de cada uno de estos genes, de los cuales 5 afectaron notoriamente la virulencia de la cepa, aumentando el LT50 (tiempo en que se produce la muerte de la mitad de los individuos) entre un 19% y 29% en el insecto *Galleria mellonella*. No obstante, en ninguna de las mutantes se afectó la virulencia cuando se administró el hongo directamente a la hemolinfa

(Gao *et al.*, 2020). Dada la relevancia de la actividad tipo-subtilisina de Pr1, esta actividad proteolítica se cataloga como el factor de virulencia más importante para la penetración de la cutícula de los insectos (Butt *et al.*, 2016).

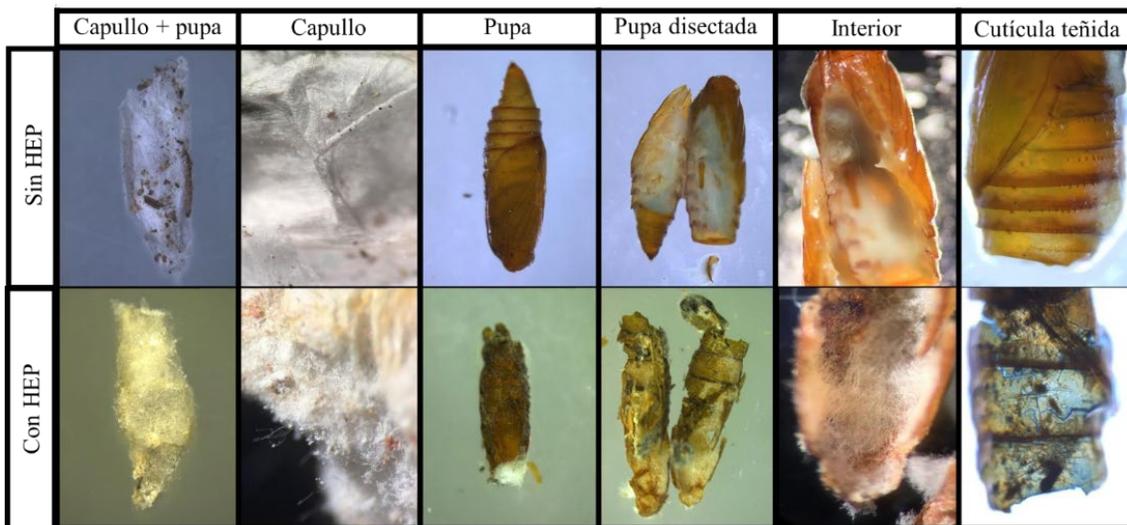
Debido a que la endocutícula está compuesta principalmente por quitina, la actividad de quitinasas es necesaria durante la infección (Figura 4, panel F). Las quitinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta(1-4)$  de los polímeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Según los patrones de corte, las quitinasas pueden agruparse en endo y exoquitinasas. Las endoquitinasas degradan la quitina en cualquier punto de la cadena polimérica, formando cadenas de monómeros de tamaño aleatorio, mientras que las exoquitinasas escinden en el extremo de la cadena no reductora y liberan monómeros (GlcNAc)<sub>2</sub> (Miranda-Calixto *et al.*, 2016). Se ha reportado que cepas de HEP con mayor actividad quitinolítica presentan más virulencia (Castellanos-Moguel *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2016). Mediante ingeniería genética se ha logrado que cepas de HEP sobreexpresen Bbchit1 (endoquitinasa de *B. bassiana*) obteniéndose una mayor actividad insecticida (Fang *et al.*, 2009).

Finalmente, las fosfolipasas de los HEP degradan los enlaces fosfodiéster de los fosfolípidos de las membranas de las células epiteliales de la epidermis del insecto (Figura 4, panel F).

Identificar y caracterizar las enzimas extracelulares de los HEPs, permite conocer las condiciones fisicoquímicas en que la batería enzimática ejerce una mayor actividad. Esta información es valiosa para considerar las condiciones ambientales en que el o las cepas de HEP actuaría eficazmente como bioplaguicida microbiano.

### 1.5. Planteamiento del problema.

Se ha demostrado que una formulación en polvo mojable de *B. pseudobassiana* RGM 2184 alcanza un nivel de eficacia máximo del 80% contra las pupas de *L. botrana* en ensayos de campo realizados en la Región Metropolitana y Región de O'Higgins durante dos temporadas (Altimira *et al.*, 2019; Altimira *et al.*, 2022). Para comprobar la capacidad de penetrar la seda del capullo y la cutícula de la pupa, se inocularon pupas de *L. botrana* con esporas de RGM 2184. En este ensayo se verificó la capacidad de RGM 2184 de colonizar pupas de *L. botrana* envueltas en su capullo (Figura 5). Estos resultados permitieron conjeturar que RGM 2184 cuenta con herramientas enzimáticas adaptadas a bajas temperaturas, capaces de catalizar la degradación del capullo y cutícula de pupas de *L. botrana* entre los 4°C y 15°C (promedios de temperatura mínima y máxima de mayo 2021 en Región de O'Higgins; DGAC, 2021). La actividad catalítica en este rango de temperatura ha sido descrita en enzimas adaptadas al frío, las cuales presentan actividad entre los 4 y 20°C de temperatura.



**Figura 5. Imágenes representativas de colonización de una cepa de *Beauveria pseudobassiana* en pupas con capullo de *L. botrana*.** En la primera fila, se muestran imágenes de una pupa del tratamiento control y en la fila inferior es de una pupa tratada con HEP. Se observan teñidas de azul las hifas que penetraron la cutícula, luego de la disección de las pupas y tinción con lactofenol. (Adaptado de Altimira *et al.*, 2019).

La predicción de los factores enzimáticos secretados por la cepa RGM 2184 mediante el análisis de su genoma, junto con la caracterización y evaluación de la actividad enzimática sobre la seda y cutícula de *L. botrana* a bajas temperaturas permitirá abordar la siguiente hipótesis:

## **1.6. Hipótesis**

El hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 secreta enzimas hidrolíticas adaptadas al frío, capaces de degradar la seda del capullo y la cutícula de la pupa de *Lobesia botrana*.

## **1.7. Objetivos.**

### **1.7.1. Objetivo general**

Determinar las enzimas extracelulares implicadas en la actividad insecticida del hongo *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 sobre el estado de pupa de *Lobesia botrana*.

### **1.7.2. Objetivos específicos.**

1. Predecir genes y/o agrupamientos genéticos del genoma de *B. pseudobassiana* RGM 2184 que codifiquen enzimas extracelulares que puedan estar involucradas en su actividad entomopatógena.
2. Identificar y caracterizar las enzimas extracelulares con actividad quitinolítica, proteolítica y lipolítica expresadas por *B. pseudobassiana* RGM 2184 que potencialmente participen en su actividad entomopatógena a bajas temperaturas.
3. Evaluar la actividad hidrolítica de las enzimas extracelulares previamente identificadas en la degradación del capullo y cutícula en pupas *L. botrana*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

La estrategia metodológica empleada en este estudio con el fin de validar la hipótesis se resume en la Figura 6.

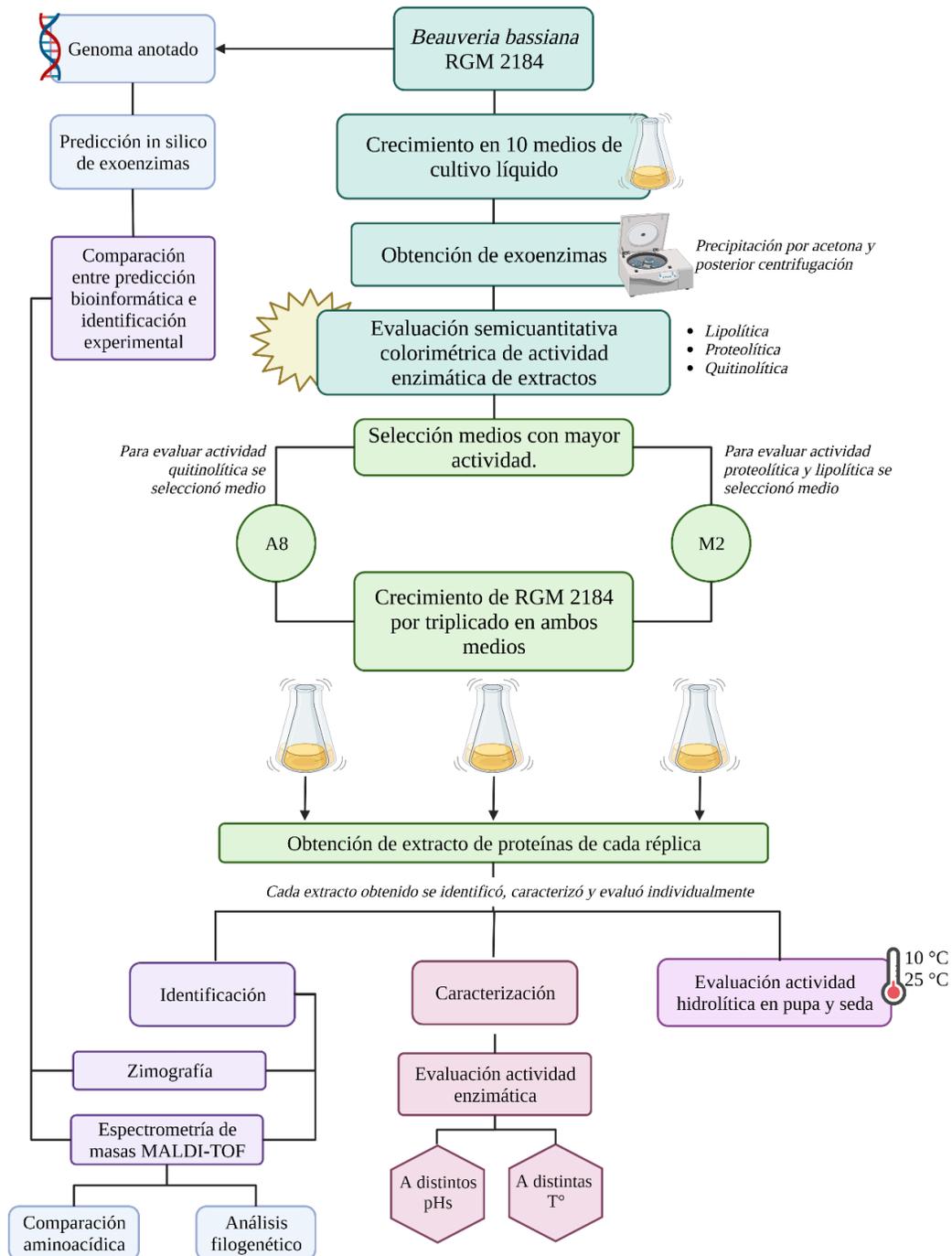


Figura 6. Esquema ilustrativo de la estrategia metodológica empleada en este proyecto de tesis.

## **2.1. Reactivos.**

Los sustratos utilizados para evaluar actividad proteolítica, lipolítica y quitinolítica en solución fueron, azocaseína, 4-nitrofenil dodecanoato y p-nitrofenil- $\beta$ -d-acetilglucosaminida respectivamente. Para la detección de proteasas, lipasas y quitinasas por zimografía, se utilizaron los sustratos gelatina, tributirina y *chitin azure*, respectivamente. Estos reactivos fueron adquiridos desde la empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, San Luis, MI, EE.UU.).

## **2.2. Material biológico.**

La cepa empleada en este estudio corresponde a *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 aislada desde suelo de San Fabián de Alicó, Región del Ñuble, localidad que presenta bajas temperaturas y alta humedad (humedad relativa >65% y temperatura media de 11°C; Santibáñez, 2017). La cepa RGM 2184 se encuentra depositada en el Banco de Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos de INIA. Dado el interés de la cepa por su eficacia insecticida, se dispone de su genoma ensamblado y anotado (Número de acceso NCBI: JAKJXD000000000). Las pupas y capullos de *Lobesia botrana*, se obtuvieron de la Fundación para el Desarrollo Frutícola (FDF).

## **2.3. Medios de cultivo.**

Los medios de cultivo utilizados en este estudio fueron los siguientes: PDA (Agar de dextrosa de papa; BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU), M1 (4,9 g/L de dextrosa, 2,30 g/L de extracto de levadura); M2 (M1 suplementado con sales minerales; Altimira *et al.*, 2022); PDB (caldo de dextrosa de patata; BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.); G55 y G8 (medio a base de glucosa, 30 g/L de dextrosa, 10 g/L de peptona bacteriológica, 2 g/L de triptona, 2 g/L de extracto de levadura, 6 g/L de cloruro de sodio, 0,5 g/L de cloruro de magnesio y 0,7 g/L de L-metionina ajustado a pH 5,5 para G55 y a pH 8 para G8; Cheong *et al.*, 2020); A55 y A8 (medio a base de almidón, 10 g/L de

almidón, 10 g/L de extracto de levadura ajustado a pH 5,5 para A55 y a pH 8 para A8; Cheong *et al.*, 2020); CN55 y CN8 (40 g/L de dextrosa, 10 g/L de triptona bacteriológica ajustado a pH 5,5 para CN55 y a pH 8 para A8; Safavi *et al.*, 2007); P (medio a base de pupas de *Lobesia botrana*, 7,5 g/L de pupas trituradas de *L. botrana*, 2 g/L de NaCl, 20 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado a pH 7); e YSM (20 g/L de sacarosa, 5 g/L de extracto de levadura, 1,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 0,00003 g/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,00004 g/L de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,000025 g/L de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,00008 g/L de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,0004 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,0005 g/L de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,0004 g/L de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, ajustado a pH 5; Lohse *et al.*, 2014). Todos los medios se suplementaron con 1,2% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).

#### **2.4. Predicción de enzimas extracelulares a partir del análisis del genoma de *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184.**

A partir del genoma secuenciado, ensamblado y anotado de la cepa RGM 2184 se seleccionaron los genes que codifican a enzimas extracelulares (exoenzimas) empleando las herramientas bioinformáticas pSORT (<http://www.psort.org/psortb/>) (Yu *et al.*, 2010) y signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen *et al.*, 2004). Estos servidores permitieron encontrar en las enzimas predichas los dominios de secreción y péptido señal, respectivamente. Las proteasas, lipasas y quitinasas predichas se enlistan en Anexo 8.1.

#### **2.5. Análisis de genómica comparativa.**

Las secuencias nucleotídicas de las enzimas extracelulares predichas presentes en el genoma de la cepa RGM 2184, se compararon con el genoma de otros hongos entomopatógenos secuenciados (enlistados en Anexo 8.2). Para dicho análisis se empleó el programa de *Blast Score Ratio* (BSR) (Sahl *et al.*, 2014). El *software* BSR entrega valores entre 0 y 1. En donde 0 indica ausencia del gen y 1 la presencia de un gen idéntico entre el predicho desde el genoma de RGM

2184 y el genoma del hongo entomopatígeno con el cual se compara. Valores superiores a 0,4 establecen la presencia de una secuencia homóloga (Sahl *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos de este análisis se graficaron en un mapa de calor usando el software R (ver. 4.0.4).

## **2.6. Obtención de proteínas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184.**

Se inocularon placas PDA con la cepa *B. pseudobassiana* RGM 2184 y se incubaron a 25°C. Al séptimo día de incubación, se suspendieron las conidias ( $10^6$  conidias/mL) en una solución de NaCl estéril al 0,9% suplementado con Tween 80 al 0,05%. Los medios de cultivo se inocularon con dicha resuspensión al 1% v/v. Posteriormente, se incubaron a 200 rpm,  $25\pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días y se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos a 20°C. Los sobrenadantes se filtraron con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore, Burlington, MA, EE. UU) y se les adicionó tres volúmenes de acetona fría durante 1 hora a  $-20^\circ\text{C}$  para precipitar las proteínas. El sobrenadante se eliminó luego de realizar una centrifugación a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C. Los *pellets* correspondientes se resuspendieron en 1 mL de Tris-HCl 25mM (pH 7,5) y NaCl 150 mM (Canchignia *et al.*, 2017). La cantidad de proteínas de los extractos obtenidos se determinó mediante cuantificación por el kit Qubit (Thermo Fisher, California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.7. Evaluación de la presencia de exoenzimas en los extractos de proteína.**

Para determinar la presencia de proteasas, lipasas y quitinasas extracelulares en los extractos enzimáticos obtenidos desde el sobrenadante del crecimiento de *B. pseudobassiana* RGM 2184 en los distintos medios de cultivo (sección 2.3), se realizaron ensayos enzimáticos colorimétricos semicuantitativos. De cada extracto se tomaron 20  $\mu\text{g}$  de proteínas y se evaluó la actividad proteolítica, lipolítica y quitinolítica.

### **2.7.1. Evaluación de actividad proteolítica semicuantitativa.**

Se determinó la actividad proteolítica de los extractos obtenidos de los distintos medios (sección 2.3) mediante el protocolo descrito por Secades & Guijarro (1999). Se incubaron 40  $\mu\text{L}$  de extracto proteico con 160  $\mu\text{L}$  de azocaseína (3,125% p/v) y 300  $\mu\text{L}$  de tampón (25 mM Tris, pH 7,4, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , ajustado con una solución 1M HCl) en un volumen de reacción de 500  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó a 25°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la incubación con 600  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10% (v/v) en hielo, por 5 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 15.000 g por 10 min. Ochocientos microlitros del sobrenadante se neutralizaron mediante la adición de 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 1,8 N (Secades & Guijarro, 1999). La absorbancia de la reacción se midió a 420 nm en el espectrofotómetro DLAB SP-UV1000 (DLAB Scientific Co., Ltd, Beijing, China) y se le restó la absorbancia del blanco (tampón de reacción sin extracto proteico). La digestión en solución de azocaseína libera un grupo cromogénico soluble en ácido tricloroacético, presentando un color anaranjado rojizo. La intensidad de esta coloración se correlacionó con la actividad proteolítica del extracto (Coelho *et al.*, 2016).

### **2.7.2. Evaluación de actividad lipolítica semicuantitativa.**

Se determinó la actividad lipolítica de los extractos en fase acuosa, mediante el protocolo de Zivkovic-Izrael *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Para ello, se realizó una solución madre de 3 mg/mL de sustrato p-nitrofenildodecanoato (p-NFD) disuelto en isopropanol y una solución tampón (Tris/HCl 20 mM pH 8, Triton X-100 4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL). La solución madre con p-NFD y la solución tampón se mezclaron en una proporción 1:9 respectivamente. Posteriormente, a 225  $\mu\text{L}$  de solución sustrato/tampón se le adicionaron 25  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y se incubó a 25°C durante 30 minutos. Finalmente, La actividad enzimática se detuvo mediante la adición de una mezcla de etanol:acetona (1:1) fría. La actividad lipolítica se

visualizó por el cambio colorimétrico de la reacción debido a la liberación p-nitrofenol por la hidrólisis de p-NFD. La evaluación del cambio colorimétrico de la reacción respecto a un blanco (sin extracto enzimático) se determinó espectrofotométricamente a 405 nm.

### **2.7.3. Evaluación actividad quitinolítica preliminar.**

La actividad N-acetil- $\beta$  glucosaminidasa se determinó según el protocolo descrito por Kim *et al.* (2010). Se preparó una solución 10 mM del sustrato p-nitrofenil- $\beta$ -d-acetilglucosaminida (pNG) y una solución tampón de fosfato de sodio 25 mM, pH 7,2. Posteriormente, se mezclaron 100  $\mu$ L de los extractos enzimáticos, 400  $\mu$ L del tampón y 250  $\mu$ L de la solución de pNG. La reacción se incubó durante 30 minutos a 25°C. Finalmente, se detuvo la actividad quitinolítica mediante la adición de un tampón básico (glicina 1M, pH 11). La actividad enzimática se visualizó por el cambio colorimétrico de la reacción debido a la liberación p-nitrofenol por la hidrólisis de pNG. La evaluación del cambio colorimétrico de la reacción respecto a un blanco (sin extracto enzimático) se determinó espectrofotométricamente a 405 nm.

### **2.7.4 Selección de medios de cultivos**

Para seleccionar los medios de cultivo, se compararon las absorbancias obtenidas de los ensayos de actividad preliminares (Sección 2.7). Dado que, a mayor absorbancia, mayor actividad enzimática, se escogieron los medios de cultivo en los que su extracto proteico registraron las más altas absorbancias. El medio seleccionado para evaluar proteasas y lipasas fue M2, y para el estudio de quitinasas se eligió el medio A8. Para facilitar la comprensión y redacción, los extractos proteicos obtenidos desde los sobrenadantes del cultivo de RGM 2184 crecido en M2 y A8 serán señalados como extracto M2 y extracto A8, respectivamente. Para los ensayos ulteriores, la cepa RGM 2184 se creció en los medios M2 y A8 en triplicado y, a partir de los sobrenadantes de estos

cultivos, se obtuvieron los extractos proteicos que se utilizaron en los experimentos descritos más adelante.

## **2.8. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida.**

La electroforesis de los extractos proteicos obtenidos de cada réplica se realizó en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los extractos M2 y A8 (25 µg) se mezclaron con tampón de carga 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, y azul de bromofenol 0,1% p/v, pH 6,8). Posteriormente, se cargaron 25 µL de la solución resultante en un gel de poliacrilamida (gel concentrador al 6% y gel separador al 12%) a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida de 29:1 (Laemmli, 1970). La electroforesis se realizó a 90V constante durante 3 horas, con tampón de corrida Tris-Gli-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1% p/v). Luego, el gel se tiñó mediante una incubación con una solución de tinción de azul de Coomassie (1 g/L de azul de Coomassie, 45% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético) durante 3 h. Finalmente, el gel se destiñó mediante su inmersión en una solución de desteñimiento (30% metanol, 10% ácido acético glacial) por 2 horas. Los geles resultantes se utilizaron como geles testigo para todas las actividades enzimáticas reveladas por zimografía.

## **2.9. Zimografía para detección de proteasas.**

Una vez separadas las proteínas mediante la electroforesis (sección 2.8), se realizó una zimografía para la detección y posterior identificación de proteasas en el extracto enzimático (Canchignia *et al.*, 2016). Para renaturar las proteínas, el gel se incubó en una solución tampón con Triton X100 (Triton X100 al 2,5% en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) durante 1 h. Cada 15 minutos se recambió el tampón. Para lograr el traspaso de las proteínas, el gel se sumergió en un tampón básico de transferencia durante 30 minutos (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3). Posteriormente, el gel se enfrentó a un gel copolimerizado con gelatina (12% poliacrilamida y 0.2%

gelatina) y la transferencia se realizó mediante la exposición de los geles a una corriente eléctrica. La electrotransferencia se realizó a 15V por 20 min en una cámara de electrotransferencia semihúmeda (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.). Luego, el gel copolimerizado se incubó en una solución tampón de desarrollo (6,055 g/L Tris-HCl; 11,69 g/L NaCl; 0,07 g/L ZnCl<sub>2</sub>; 0,74 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0,2 g/L de NaN<sub>3</sub>; pH 7,4) durante 12 h a 25°C. Para la detección de la actividad proteolítica se tiñó el gel con azul de Coomassie durante 1 h (Choi *et al.*, 2009; Canchignia *et al.*, 2016). Posteriormente, se destiñó el gel mediante la incubación de una solución de desteñimiento (sección 2.8) por 2,5 h. Se evidenció la presencia de proteasas debido a la aparición de zonas blanquecinas en el gel azul.

#### **2.10. Zimografía para detección de lipasas.**

Una vez sometidas las muestras a una electroforesis SDS-PAGE (sección 2.8), se procedió a renaturar las proteínas con una solución renaturante (Triton X100 al 2,5% en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) durante 1 h. Posteriormente, el gel se enfrentó a un gel copolimerizado con tributirina (12% poliacrilamida y 2% tributirina). La transferencia se realizó por capilaridad usando el tampón de desarrollo (6,055 g/L Tris-HCl; 11,69 g/L NaCl; 0,74 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0,2 g/L de NaN<sub>3</sub>; pH 7,4). La presencia de lipasas se evaluó mediante la visualización de una banda clara en el gel debido a la degradación de tributirina (Choi *et al.*, 2009).

### **2.11. Zimografía para detección de quitinasas.**

Se realizó una zimografía *in situ* con un gel concentrador al 4%, con la salvedad de que se incorporó 1 mg/mL de quitina azul termodenaturada en el gel de separación al 10% (Laribi-Habchi *et al.*, 2014). La electroforesis se ejecutó con una corriente constante de 25 mA. Después de la electroforesis, el gel se sumergió en 100 mL de tampón renaturante (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, con 1% Tritón X-100) durante 16 h a 37° C. Luego se tiñó el gel mediante una incubación en una solución de tinción de calcoflúor blanco M2R al 0,01% p/v (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) por 5 minutos. Posteriormente se eliminó la solución abrillantadora y se lavó el gel con agua destilada. Las zonas líticas se visualizaron colocando los geles en un transiluminador UV.

### **2.12. Identificación de exoenzimas en los extractos enzimáticos A8 y M2.**

Los extractos proteicos fueron sometidos a la técnica analítica cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para su ejecución primero se añadió un inhibidor de proteasa/fosfatasa a una concentración de 1X a 500 µg de proteína de los extractos A8 y M2. Posteriormente, las muestras se liofilizaron y se solubilizaron en 8 M de urea y 25 mM de bicarbonato de amonio a pH 8 para su cuantificación mediante Qubit 4TM utilizando el kit Qubit Protein Assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU). Luego de la cuantificación, las muestras se redujeron con DTT y se alquilaron añadiendo yodoacetamida a una concentración final de 20 mM en 25 mM de bicarbonato de amonio y se incubaron durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 100 µg de proteína para el proceso de digestión. La digestión se realizó con tripsina 1:50 (#V5071; Promega, Madison, WI, EE. UU.) y se incubó durante 16 h a 37°C. La reacción de digestión se detuvo añadiendo ácido fórmico al 10%. A continuación, las muestras se limpiaron mediante extracción en fase sólida con una columna SepPak Vac C-18 (Waters™, Milford, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los péptidos resultantes se solubilizaron en agua ultrapura con ácido fórmico al 0,1% de calidad

LC-MS/MS y se cuantificaron mediante el sistema Direct Detect (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.). Se inyectaron 200 ng de los péptidos obtenidos en el paso anterior en un nano UHPLC nanoElute (Bruker Daltonics, GmbH, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (espectrometría de movilidad de iones atrapados-tiempo de vuelo cuadrupolar; Bruker Daltonics) utilizando una columna UHPLC de la serie Aurora de IonOpticks (75  $\mu\text{m}$   $\times$  100 mm, C18, 1,9 A). Los resultados se adquirieron con el software timsControl 2.0 (Bruker Daltonics) y se analizaron con el software PEAKS Studio X+ (Bioinformatics Solutions, Columbia, Waterloo, CA). Las secuencias de los péptidos obtenidos por el análisis de espectrometría de masa se contrastó con la base de datos de las proteínas predichas del genoma de *B. pseudobassiana* RGM 2184 (JAKJXD000000000.1). La secuenciación de extractos de proteínas se realizó en el Laboratorio MELISA Institute. Este análisis de espectrometría de masas permitió la identificación de lipasas, proteasas y quitinasas secretadas por la cepa RGM 2184 en los medios de cultivo A8 y M2. Las secuencias de las enzimas detectadas se depositaron en la base de datos Genbank con los números de acceso OP328424, OP328429, OP328425, OP328426, OP328430, OP328427 y OP328428, para P1, P2, Lip1, Lip2, Chi1, Chi2 y Chi3, respectivamente.

### **2.13. Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de exoenzimas identificadas.**

Las secuencias de las proteasas, lipasas y quitinasas extracelulares de *B. pseudobassiana* RGM 2184 identificadas por espectrometría de masas se alinearon con exoenzimas caracterizadas y/o predichas de otras cepas de HEP utilizando el método MUSCLE (Edgar, 2004). El parentesco de las exoenzimas se evaluó mediante un análisis filogenético realizado con el método de unión de vecinos implementado en el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Las distancias evolutivas se calcularon mediante el método de la distancia p, utilizando como unidad el número de diferencias de aminoácidos por sitio. El sustento de la hipótesis de las relaciones filogenéticas se evaluó utilizando 1000 réplicas bootstrap (Saitou y Nei, 1987).

## **2.14. Evaluación de actividad proteolítica del extracto enzimático M2.**

### **2.14.1. Evaluación actividad proteolítica a diferentes unidades de pH.**

Para determinar la actividad proteolítica en el extracto M2 se utilizó la metodología descrita en la sección 2.7.1, con modificaciones. La actividad enzimática se evaluó en un rango de pH 4 a pH 9 por cada réplica de extracto M2. Se utilizó un tampón de citrato 0,02 M para medir actividad a las unidades de pH 4, 5 y 6; tampón fosfato 0,04 M para determinar la actividad de lipasas a pH 7 y 8; tampón Tris-HCl 50 mM para pH 9. Se utilizaron 7  $\mu\text{g}$  de proteínas del extracto M2, y se ajustaron los volúmenes de reacción a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Para establecer la actividad enzimática, se detuvo la reacción cada 5 minutos, desde 0 a 35 minutos. Posteriormente, se registró la absorbancia utilizando el equipo nanodrop BioSpec-nano (Shimatzu, Tokio, Japón). Debido a que una molécula de azocaseína, puede contener más de un grupo Azo en su estructura, no es posible estandarizar una curva con distintas concentraciones del grupo cromógeno Azo. Se determinó la curva de calibración según Cohêlo *et al.* (2016) (Anexo 8.3A). Una vez traducido estos valores de absorbancia en mg/mL de Azocaseína digerida, se realizó una regresión lineal (Tiempo (min) vs. Azocaseína (mg/mL)) para determinar la actividad del extracto, donde la pendiente del modelo lineal corresponde a la actividad. Se definió una unidad de actividad proteolítica (U) como la capacidad para digerir 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de azocaseína por minuto (Anexo 8.4; Anexo 8.6).

### **2.14.2. Evaluación actividad proteolítica a diferentes temperaturas.**

Se midió la actividad proteolítica a distintas temperaturas, manteniendo la solución tampón a pH 7 (mayor actividad registrada). La actividad se evaluó variando la temperatura en 5°C, desde los 5°C hasta los 60°C. La actividad proteolítica se realizó en las réplicas de los extractos M2. Las reacciones se realizaron en tubos Eppendorf de 0,6  $\mu\text{L}$  dispuestos en un termociclador Eppendorf

6331 Nexus Gradient MasterCycler Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) ajustado a la temperatura de medición de la actividad catalítica correspondiente (Anexo 8.5; Anexo 8.6).

## **2.15. Evaluación de actividad lipolítica en extracto M2.**

### **2.15.1. Evaluación actividad lipolítica a diferentes unidades de pH.**

Para llevar a cabo la actividad lipolítica se utilizó el sustrato p-NFD y metodología descrita en la sección 2.7.2. La actividad lipolítica se determinó en el rango de pH 2 a pH 9 en las réplicas de los extractos M2 y A8. 7 µg de extracto de proteínas se añadieron a un volumen de reacción de 25 µL (enzima + tampón de reacción). Se utilizó el tampón ácido clorhídrico-cloruro de potasio 0,1 M, para determinar actividad a pH 2; solución tampón de citrato 0,02 M para medir actividad a las unidades de pH 3, 4, 5 y 6; tampón fosfato 0,04 M para determinar la actividad de lipasas a pH 7 y 8; tampón Tris-HCl 50 mM para pH 9. Todos los tampones fueron suplementados con Tritón X-100 4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL. La actividad se determinó deteniendo la reacción cada 5 minutos, desde 0 a 35 minutos. Posteriormente, se registró la absorbancia utilizando el lector de absorbancias de microplacas Multiskan (Labsystems, Vantaa, Finlandia). Para la conversión de unidades de absorbancia a µM de p-nitrofenol (producto de la reacción), se realizó una curva de calibración (Anexo 8.3B). Esta se determinó midiendo la absorbancia de diluciones de p-nitrofenol a distintas concentraciones, en el lector de absorbancia de microplacas. Una unidad de actividad lipolítica (U) se estableció como la capacidad del extracto enzimático para producir 1 µM de p-nitrofenol por minuto (Anexo 8.7; Anexo 8.10).

### **2.15.2. Evaluación de actividad lipolítica a distintas temperaturas.**

Debido a que se registró la mayor actividad lipolítica en dos valores de pH diferentes, el barrido de temperatura se realizó a los pH 2 y 8. El rango de temperatura abarcó desde los 5°C

hasta los 25°C, evaluándose la actividad enzimática cada 5 unidades de temperatura. Las reacciones se realizaron en tubos Eppendorf de 0,6 µL y se incubaron en un termociclador a las respectivas temperaturas por un periodo de 0 a 30 min (Anexo 8.8; Anexo 8.9; Anexo 8.10).

## **2.16. Evaluación de actividad quitinolítica del extracto de proteína A8.**

### **2.16.1. Evaluación actividad quitinolítica a diferentes unidades de pH.**

Para determinar la actividad quitinolítica en el extracto M2 se utilizó el sustrato pNG y la metodología descrita en sección 2.7.3. La reacción enzimática estuvo constituida por 7 µg de extracto de proteínas en un volumen final de reacción de 25 µL. La medición de actividad se realizó en un rango de 2 a 9 unidades de pH. La reacción quitinolítica se realizó en cada una de las réplicas de extracto A8. Las soluciones tampones para establecer los diferentes pH, fueron los mismos descritos en sección 2.13.1, sin adición de Tritón X-100 y goma arábica. La actividad se determinó deteniendo la reacción cada 5 minutos, desde 0 a 35 minutos y las absorbancias se midieron con Nanodrop. Se realizó una curva de calibración para convertir las unidades de absorbancias en unidades de p-nitrofenol (Anexo 8.3C). Esta se constituyó midiendo la absorbancia de distintas diluciones de p-nitrofenol en el instrumento Nanodrop. Una unidad de actividad quitinolítica (U) se estableció como la capacidad del extracto enzimático para producir 1 µM de p-nitrofenol por minuto (Anexo 8.11; Anexo 8.13).

### **2.16.2. Evaluación actividad quitinolítica a distintas temperaturas.**

Dado que se registró la mayor actividad quitinolítica a pH 3, el barrido de temperatura se realizó con la solución tampón a dicho pH. El rango de evaluación de la actividad abarcó desde los 5 hasta los 45°C, midiéndose cada 5 unidades de temperatura. Debido a que la actividad de quitinolítica continuaba aumentando a 45°C y el sustrato se agotó, adicionalmente se determinó la

actividad a 70°C. Las reacciones se realizaron en tubos Eppendorf de 0,6 µL y se incubaron en el termociclador (Anexo 8.12; Anexo 8.13).

### **2.17. Análisis estadístico.**

Para obtener las actividades, las mediciones de absorbancias se realizaron en cada una de las 3 réplicas de los extractos obtenidos del crecimiento de la cepa RGM 2184 en los medios M2 y A8. Para determinar las diferencias estadísticas de la actividad enzimática a diferentes pH y temperaturas, primeramente, se determinó si los puntos que conformaban cada una de las curvas presentaban una distribución normal y homocedasticidad, empleando la prueba de Shapiro y la prueba de Breusch-Pagan, respectivamente (Dufour *et al.*, 1998; Breusch y Pagan, 1979). Debido a que los puntos se comportaban de forma normal y presentaban homocedasticidad, se determinaron los intervalos de confianza con un nivel de significancia del 95% considerando una distribución t-Student. Para inferir si es que las actividades son diferentes estadísticamente, se compararon los intervalos de confianza de cada una de las actividades. El solapamiento de los intervalos de confianza indica que **no existía diferencia significativa** entre tales actividades. Las diferentes pruebas y determinación de los intervalos se llevaron a cabo utilizando el software R v4.0.4.

### **2.18. Análisis comparativo de la composición de aminoácidos de enzimas termófilas, mesófilas y adaptadas al frío**

La composición aminoacídica de enzimas termófilas, mesófilas y adaptadas al frío descritas en la literatura se determinó utilizando el servidor Composition-Based Protein Identification (COPid) ([https://webs.iiitd.edu.in/raghava/COPid/whole\\_comp.html](https://webs.iiitd.edu.in/raghava/COPid/whole_comp.html)) (Anexo 8.14). Para cada grupo de enzimas (termófilas, mesófilas o adaptadas al frío), se calculó el promedio y la desviación estándar de los porcentajes para cada uno de los aminoácidos (Cantidad de aminoácido/N° total de residuos de proteína \*100). Posteriormente, se realizó una prueba t para determinar las diferencias

estadísticamente significativas entre los tres grupos de enzimas para cada aminoácido, seguida del procedimiento de step-up lineal en dos etapas de Benjamini, Krieger y Yekutieli, con  $Q = 1\%$  (Benjamini *et al.*, 2006) (Anexo 8.15). Los aminoácidos que mostraron diferencias estadísticas se utilizaron como eje para la construcción de dos gráficos de dispersión 3D utilizando la versión 4.2.1 de R con los paquetes *car* y *rgl*. Los promedios de porcentajes de aminoácidos de las exoenzimas identificadas de la cepa RGM 2184 se incorporaron a este análisis para determinar con que tipo de enzimas se agrupaban.

### **2.19. Evaluación de la acción hidrolítica sobre el capullo y pupas de *L. botrana*.**

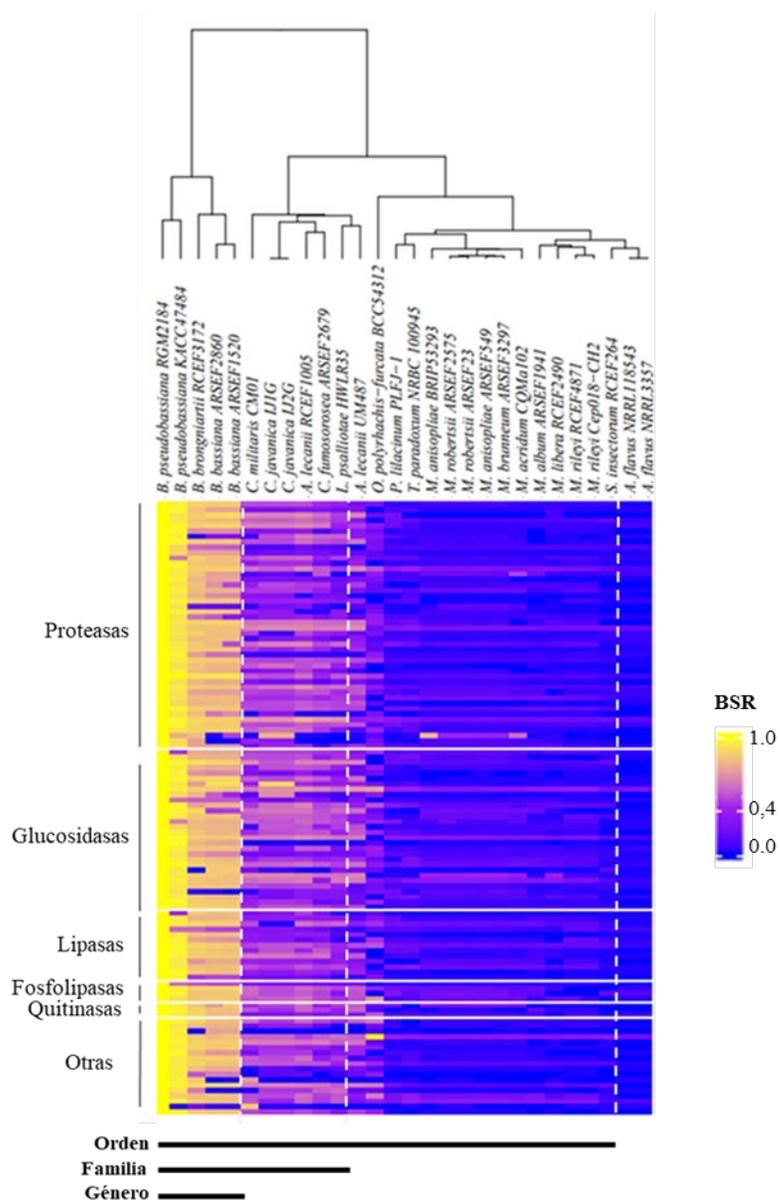
Se añadieron 138  $\mu\text{g}$  de extracto A8 y M2 por separado, y una mezcla de ambos extractos (69  $\mu\text{g}$  de proteína de cada extracto) sobre pupas de *L. botrana* y cuadrados de seda de su capullo (aproximadamente 5 mm  $\times$  5 mm, recortados con tijeras de disección) en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. El tratamiento control consistió en exponer las pupas y seda de *L. botrana* a 60  $\mu\text{L}$  de tampón de resuspensión del extracto de proteínas (25 mM Tris con 150 mM NaCl, pH 7,0) sin las exoenzimas. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se incubaron a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días. Tras la incubación, las muestras se fijaron con glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato de sodio 0,268 M (pH = 7,0), seguido de deshidratación, secado en punto crítico y recubrimiento de oro en una membrana de policarbonato de 0,22 mm. Las muestras se visualizaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM) TM 3000 (Hitachi, Tokio, Japón). El análisis de microscopía se llevó a cabo en la Unidad de Microscopía Avanzada de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

### 3. RESULTADOS.

#### 3.1. Análisis bioinformático de genoma de *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184.

Las enzimas que secretan los hongos entomopatógenos durante la penetración de la cutícula del insecto, se considera el factor más relevante para que estos microorganismos logren ejercer su acción insecticida. Por esto, es imperativo dilucidar con qué herramientas enzimáticas cuenta la cepa RGM 2184 para penetrar seda y capullo de la plaga *L. botrana*. En el análisis *in silico* del genoma anotado de *B. pseudobassiana* RGM 2184, se predijo un total de 116 genes que codifican exoenzimas, de los cuales 45 (39%) codifican proteasas, 13 lipasas (11%) y 3 quitinasas (3%) (Anexo 8.1). El mapa de calor (Figura 7) se construyó a partir de los puntajes de similitud obtenidos mediante LS-BSR, para cada una de las exoenzimas predichas en RGM 2184 con respecto a otros HEP secuenciados. El dendograma presente en las columnas, permite establecer qué cepas de HEP presentan una mayor cantidad de exoenzimas homólogas con respecto a las que posee la cepa RGM 2184 en su genoma. Aquellas cepas de HEP que se encuentran más cercana a RGM 2184 (primera columna), presentan una mayor cantidad de las exoenzimas de RGM 2184 en su genoma. Se visualiza entonces, que la cepa *B. pseudobassiana* KACC 47484, es el genoma que presenta más exoenzimas de la cepa en estudio RGM 2184. Contrariamente a lo que sucede con las cepas de *Aspergillus flavus* (NRRL118543 y NRRL3357), que son las que codifican menos exoenzimas presentes en RGM 2184. Se puede observar en la figura 7, que *A. flavus* NRRL118543 y NRRL3357 son los únicos HEP analizados que no comparten el mismo Orden taxonómico que RGM 2184. A partir de estos resultados se determinó el porcentaje de enzimas presentes de RGM 2184 según el nivel taxonómico que comparten con los HEP. Estableciéndose que, de estos genes, el 98%, el 93-95% y el 38-65% está presente en cepas que comparten los niveles taxonómicos con RGM 2184 a nivel de especie, género y familia, respectivamente (Anexo 8.2). Estos resultados

permiten inferir que la similitud de los genes que codifican las enzimas secretadas por los hongos entomopatógenos se relaciona directamente con la distancia filogenética entre ellos.

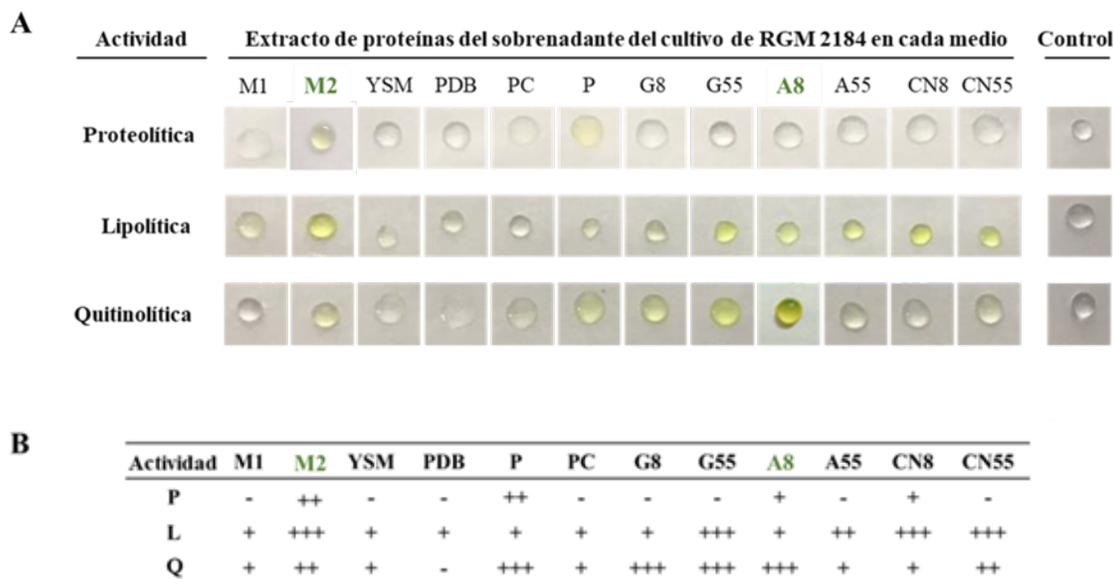


**Figura 7.** Mapa de calor que muestran los niveles de similitud entre los genes que codifican exoenzimas de *B. pseudobassiana* RGM 2184 en comparación con otros hongos entomopatógenos. Una puntuación de 1 indica una similitud de 100% (color amarillo) entre el gen que codifica la exoenzima y el gen del HEP con que se le compara, mientras que una puntuación de 0 indica que no hay similitud (color azul) entre dichas secuencias. Los valores superiores a 0,4 indican la presencia del gen de RGM 2184 en el genoma de HEP. Las líneas verticales segmentadas se correlacionan con los niveles taxonómicos que comparten las cepas de HEP con respecto a RGM 2184. Los niveles taxonómicos se indican con líneas ennegrecidas en la parte inferior del mapa de calor.

### 3.2. Selección de medios de cultivos para evaluación de actividad enzimática.

Debido a que los microorganismos secretan distintos compuestos según los macro y micronutrientes disponibles en su entorno, se cultivó *B. pseudobassiana* RGM 2184 en una batería de 10 medios de cultivo líquido. Se evaluó mediante ensayos colorimétricos la actividad proteolítica, lipolítica y quitinolítica en extractos de proteínas obtenidas desde los sobrenadantes de los cultivos de la cepa RGM 2184 crecida en estos medios. Se detectó mayor actividad proteolítica en el medio M2 (en base a glucosa, extracto de levadura y sales, pH 5,5) y P (extracto de pupa del insecto *Lobesia botrana*) (Figura 8). Este último (P) se descartó, debido a que el control estéril del medio a base de pupa de *L. botrana* (PC) presentó actividad proteolítica y quitinolítica, lo cual indica que el medio presenta quitinasas y proteasas provenientes de la pupa del insecto, por lo tanto, es una matriz muy compleja para la detección e identificación de las enzimas secretadas por la cepa RGM 2184.

En cuanto a la actividad lipolítica, esta se encontró en los extractos de proteínas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en cada uno de los medios evaluados. Cabe señalar que los extractos de proteínas provenientes de los cultivos en M2 y G55 fueron los que registraron mayor actividad lipolítica (Figura 8). Por otra parte, el medio A8 registró la mayor actividad quitinolítica (en base almidón, pH = 8,0) (Figura 8). Esta primera aproximación permitió seleccionar para los experimentos posteriores el medio de cultivo M2, debido a que inducen la secreción de proteasas y lipasas en la cepa RGM 2184 y el medio A8, debido a que induce la secreción de quitinasas.

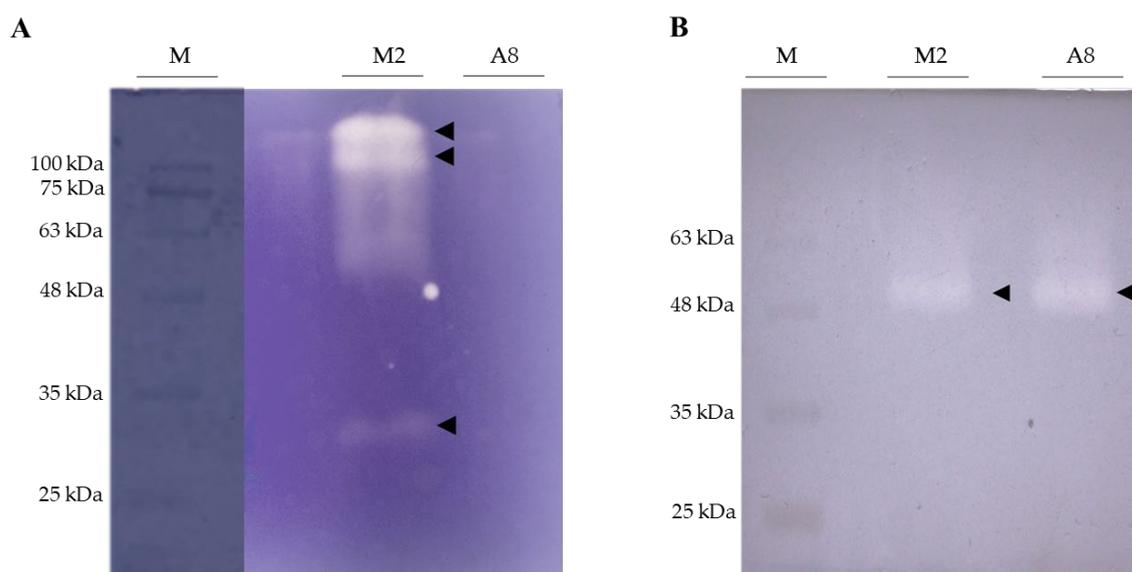


**Figura 8. Evaluación de exoenzimas en cultivos de la cepa RGM 2184.** (A) El color amarillo indica la acción hidrolítica de exoenzimas debido a la liberación de p-nitrofenol (en el caso de la actividad lipolítica y quitinolítica) o del grupo azo (para proteasas). (B) Tabla de puntuación que indica los valores semicuantitativos de actividad enzimática. Absorbancia: -, [0 - 0,1]; +, ]0,1-1]; ++, ]1-2]; +++, > 2.

### 3.3. Detección de proteasas, lipasas y quitinasas mediante zimografía.

Los extractos M2 y A8 se sometieron inicialmente a una electroforesis para separar las proteínas presentes según su masa molecular. Debido a que los dos extractos enzimáticos (A8 y M2) registraron actividad enzimática proteolítica, lipolítica y quitinolítica, ambos extractos fueron utilizados para la detección de enzimas por zimografía. Se detectaron tres proteasas en el extracto proteico M2, mientras que en el extracto proveniente del cultivo de RGM 2184 en medio A8 no se lograron detectar proteasas mediante esta técnica electroforética (Figura 9A). Las masas moleculares de las proteasas fueron de aproximadamente 32, 105 y 133 kDa, respectivamente. En el caso de la zimografía para detectar actividad lipolítica, se visualizó una banda de degradación en ambos extractos enzimáticos (M2 y A8), sugiriendo que en ambos extractos se encuentra la misma lipasa presente (Figura 9B). Esta enzima muestra una masa molecular cercana a 52 kDa. Con esta técnica se pudo establecer que el medio M2 induce la secreción de proteasas y lipasas por parte del

hongo *B. pseudobassiana* RGM 2184, mientras que el medio A8 induce la presencia de lipasas. No se pudieron detectar quitinasas mediante zimografía debido a que el sustrato utilizado estaba defectuoso.



**Figura 9. Zimografía de extractos de proteínas del sobrenadante del cultivo de la cepa RGM 2184 en medio M2 y A8.** (A) Gel de poliacrilamida co-polimerizado con gelatina. Las zonas blanquecinas muestran la presencia de proteasas. (B) Gel de poliacrilamida co-polimerizado con tributirina. Las bandas claras demuestran la presencia de lipasas. M: Marcador de masa molecular de proteínas; M2: extracto proteico obtenido desde sobrenadante del cultivo de la cepa RGM 2184 en medio M2; A8: extracto proteico obtenido desde sobrenadante del cultivo de la cepa RGM 2184 en medio A8.

### **3.4. Identificación de exoenzimas mediante LC-MS/MS.**

Los extractos proteicos obtenidos desde los sobrenadantes del cultivo de la cepa RGM 2184 en los medios A8 y M2 se analizaron mediante LC-MS/MS. Los fragmentos peptídicos secuenciados mediante esta técnica se contrastaron con las secuencias de proteínas del genoma anotado de la cepa RGM 2184. Esto permitió la identificación de 2 proteasas (Figura 10), 2 lipasas (Figura 11) y 3 quitinasas (Figura 12). Adicionalmente, el análisis de las secuencias de estas enzimas con bases de datos de dominios conservados permitió predecir dominios y motivos catalíticos relevantes en su actividad enzimática.

Las proteasas identificadas se denominaron P1 y P2 (Figuras 10A y 10B, respectivamente). Estas enzimas se lograron identificar solo desde el extracto de proteínas del sobrenadante del cultivo de RMG 2184 en el medio M2. Los péptidos secuenciados de P1 y P2 constituyeron el 12,7 y 7,4% de la estructura primaria, respectivamente (Figura 10; paneles izquierdos). Estas enzimas difieren sustancialmente en sus masas moleculares: P1 presenta una masa molecular aproximada de 38,7 kDa con un total de 378 residuos (Figura 10A), mientras que P2 presenta una masa molecular de 93,4 kDa con un total de 886 residuos en su estructura (Figura 10B), de acuerdo con la predicción bioinformática. Estructuralmente ambas proteasas presentan un dominio catalítico perteneciente a la familia de Peptidasas S8 (Figuras 10A y 10B).

Con respecto a las lipasas, estas se dominaron Lip1 y Lip2 (Figuras 11A y 11B, respectivamente). Se identificaron péptidos de estas enzimas tanto en el extracto M2 como en A8. Conjuntamente se logró cubrir el 56 y 16,3% de las estructuras primarias de Lip1 y Lip2, respectivamente (Figura 11; paneles izquierdos). Ambas enzimas poseen una masa molecular similar, Lip1 de 51,5 kDa y Lip2 de 48,1 kDa. En su estructura, estas lipasas presentan un dominio LIP, presente en enzimas lipolíticas extracelulares. En ambas enzimas se logró identificar el motivo

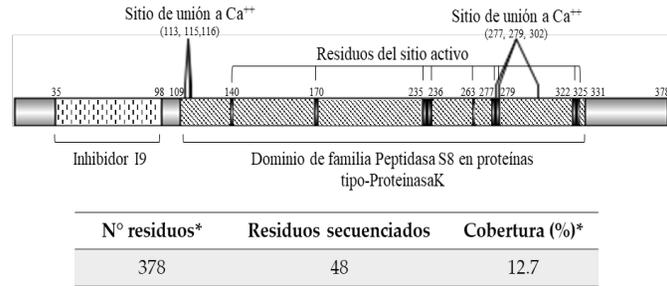
GXSXG (donde X puede ser cualquier aminoácido; Kim y Suh, 2016), motivo esencial para actividad catalítica, junto con la tríada catalítica Ser, Asn e His: Ser<sup>226</sup>, Asn<sup>372</sup> e His<sup>404</sup> en P1, y Ser<sup>214</sup>, Asn<sup>399</sup> e His<sup>431</sup> en P2 (Figuras 11A y 11B, respectivamente).

En cuanto a las quitinasas, las enzimas identificadas en el extracto A8 se denominaron Chi1 (~71 kDa), Chi2 (~34 kDa) y Chi3 (~37 kDa), mientras que en el extracto M2 se logró identificar solo Chi1 y Chi2 (Figura 12). Chi2 y Chi3 pertenecen a la familia de las quitinasas 18, y tienen dominios catalíticos y de unión presentes en quitinasas GH18 (SXGG y DXXDXDXE) (Figuras 12B y 12C, respectivamente).

A

```

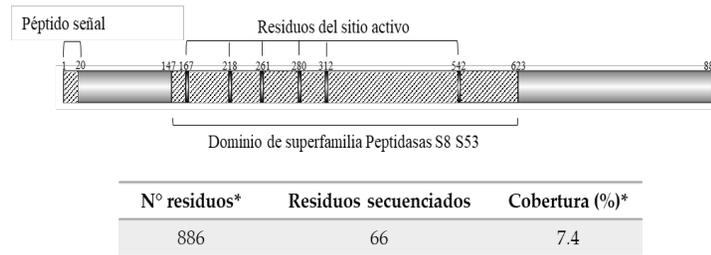
1      MRLSIIAAAL PLAI AAPVVE PALLEARGQ TIAGKIVKL KDTATIGIMD
51     AASKVPNTEH VYENVIKGFS ASINQEQLDR LRHDPVVETI EQDAIVSINA
101    IVRQTGAPWG LGRISHRAKG DTTYVYDSNA GAGTCVYVID TGVAAEHPEF
151    QGRAVQLKTF VSGTKDGHGH GTHCAGTIGS AKYGVARKTS IFGVKVLEDS
201    GSGSLSGVIA GMDVFATDFR KQSKCSKGAV ASMSLGGGFS ATVNQAAARL
251    QSAGVFVAVA AGNDNSDAGQ TSPASEPSVC TVGATDSSDR RSTFSNYGKV
301    VDIFAPGTGI LSTWLNGGTT ISGTSMATPH IAGLGAYLLG LRGGSADGIC
351    KIIQISTKNV LTGVPAGTFN YLAFNGAT
  
```



B

```

1      MVRTSALLTL LATAATAVVG QDAEIGKEQP AIPGAFIIEF KEGSNKAAV
51     DAVAQDATIR VDLDFELFKG VSIQLNDVNS ADEKAKTLAS LPAVKNIWPV
101    KLVPRPDPNI EWVATEGLQA LVDKSGASNI NSRDTAEPIS SAQRMGQIDK
151    MRAKGYKGRG IKVAVVDTGI DYKHPALGRC FEGECLVGYG YDLVGDAYGS
201    NGNYRFPVFN DMDCGGHGS HVAGIIAAQP NEYNTFTGTAP DVTLGAYKVF
251    GCSGSTGTDV LISSFNKAYQ AGSDIITASI GSSSGWVDEP WALSIARIVA
301    RGVPCTIAAG NEGTEGLLFA SSGSTAKGSV AVASFDNDT PTLANVNYYS
351    VDGDKQQLL TTGSKDAWD GVTLDLWAGS YDTTKADDGC KAYPADTPDL
401    SDKIVLIHRG TCSFNKVNF ATAKGAKYVI IYNNAPAPLS MDVTNTPLAK
451    GITLISQDDG VTLINLKDG KKVTASMNSS AKTAKVLSYK QNSVTGGGLS
501    SFTTWGPSWE LFVKPDVGAP GGNILSTYPT AKGSWAVLSG TSMATPFVAA
551    SVALLLEVRG KKLPPATITN LLSANANFQL FNDNTKFLGK LAPVPQQGAG
601    LVQVYDAAFA TTILEPSNLA FNDTANFVKK LTFKVSNTGK ESVSYDISQV
651    SAYTMYALGT STHVKAFPN EAVDAYAKLS FSQDKLTIAA GSSASVDVTV
701    SPPEGVDTKR LPIWSGYVTI NGTDGTALSM PYQGVSGSLK EHVVDPTGA
751    SWISWSNDKE LKELPVNMTF SLPAPGKATG QTRLPMFVIN MSLGSKNITG
801    HLQPMTTCPP KGAYEYKGYK TIGQPFDFPL LFSSRGPVTS PWDGQLESGN
851    YAPPGKYRLI IRALRVFGDP NNEKPWDTSV GNRFVI
  
```

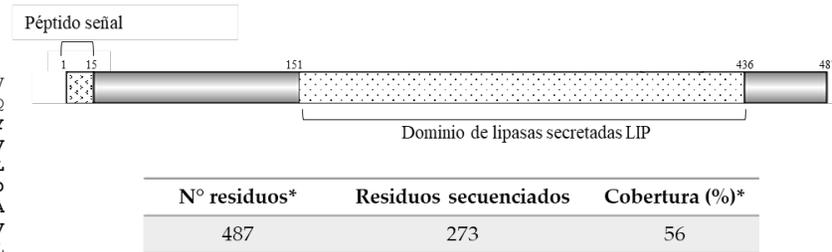


**Figura 10. Proteasas extracelulares encontradas en el extracto de proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en el medio M2.** (A, B) Secuencias aminoácidas y esquemas de las exoproteasas P1 (OP328424) y P2 (OP328429), respectivamente. Las proteínas corresponden a secuencias de aminoácidos deducidas del genoma de *B. pseudobassiana* RGM 2184 (JAKJXD000000000.1). Los esquemas funcionales de estas proteínas (paneles de la derecha) se construyeron utilizando la información disponible en la base de datos de dominios conservados del NCBI. Los péptidos secuenciados están resaltados en negrita en el panel izquierdo. El péptido señal (en cursiva) y los residuos del sitio activo (subrayados) se denotan en la secuencia aminoacídica de la exoenzima en el panel izquierdo y se esquematiza en el panel derecho. Los dominios relevantes están demarcados en el panel derecho. Los asteriscos indican que la información fue predicha por análisis bioinformático.

**A**

```

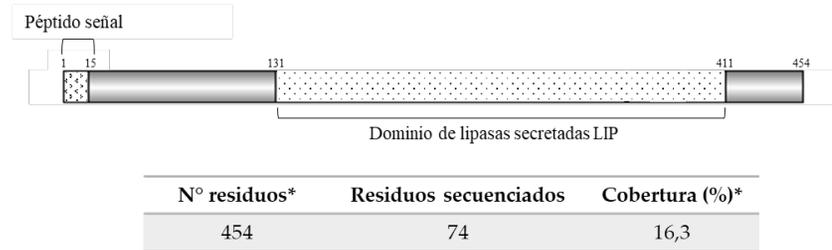
1      MKFLSLVAAV  LPLASALTIP  EKRIITSVND  PFYVPPSGLE  SVEDSSALTV
51     PEKRITTPAN  DPFYVPPSGF  ESAKPGTVLR  ERPIVVSFFG  LIPAPIDSRQ
101    LLYRTTAIDG  SPIATVTTVF  KPLFAKRDRF  ISFNTAYDSS  ASICNPSYNY
151    RLGALQTDLI  SSAEFLIIQA  YLLSGYTVAS  ADYEGPDVAF  SAGRLSGMGV
201    LDGIRAVVNY  SPKIGLDKNP  MVVNGYSGG  AIASGWAASL  HPTYAPDLNL
251    KGFIAGGTPA  NLTQVLLYVD  GTLEAGFLPG  ALAGQIMPSA  YGARLKPVLD
301    RVITPRGKEA  LALGTSQCAP  VNLIAFAGKS  IFDTSFQTLG  KDLLYDKDVA
351    WVLNESTLGL  KKNETPTVPV  MLYHSPDEV  IPFAGAESLR  KRWCDNGANV
401    RFVNYAAGGH  VTAEVVAVID  ALKFAGDAFS  GSVPGGCASR  IVLDDKLNPL
451    ALGLSLEPVL  AGLVNILLSL  GKKDANWVSG  LSQGKQI
  
```



**B**

```

1      MLAKGLLSAA  LVVAHALVAS  AAPMPHDP  TAPILPSQDP  FYSVPDSISA
51     AASGTILRHR  KTPSSIAAFA  LDSVNLAEY  QLQYRTADNP  GNATAAVLTV
101    LVPHHADMSK  VLSYQVAEDA  ASADCAPSYT  LQRGSRPGPH  FGSLEFQAEI
151    LLIEAVLEQD  WVVVVPDYEG  PEALYLAWRL  AGQATLDGIR  AALGSEKITG
201    TAADATVAMW  GYSAGSMATA  WAAEIQPQYA  PELHIAGAAF  GGTTPNITNV
251    VGATNKGNFA  GLLPTGIMGL  SNQYPALKDM  VDRLLKPEFR  EVVEQTKHQC
301    PFADLAAFSG  LDVTAMFTDP  REMYNDPVAV  KVLAEIDLQ  AVPEVPIYWY
351    KSVHDEVSPV  ADSDAVYEWY  CAGGATIEYV  RDEVSEHASA  MATGAPRAVA
401    WLKNIMDGGK  PKPGCSKETT  LSSLLDLSTI  EVLPGFILDA  LLDLVGKPVG
451    PWLA
  
```

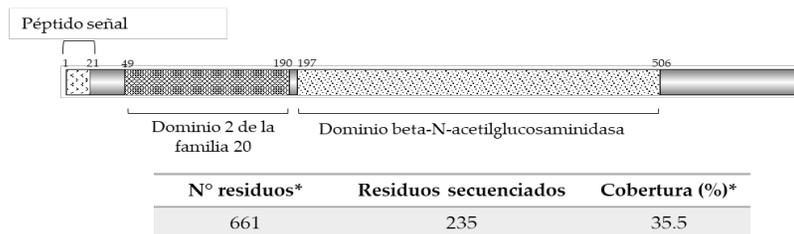


**Figura 11. Lipasas extracelulares encontradas en el extracto de proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en el medio M2 y A8.** (A, B) Secuencias aminoácidas y esquemas de Lip1 (OP328425) y Lip2 (OP328426), respectivamente. Las proteínas corresponden a secuencias de aminoácidos deducidas del genoma de *B. pseudobassiana* RGM 2184 (JAKJXD000000000.1). Los esquemas funcionales de estas proteínas (paneles de la derecha) se construyeron utilizando la información disponible en la base de datos de dominios conservados del NCBI. Los péptidos secuenciados están resaltados en negrita en el panel izquierdo. Recuadro verde en panel izquierdo resaltan motivos conservados. El péptido señal (en cursiva) y los residuos del sitio activo (subrayados) se denotan en la secuencia aminoácida de la exoenzima en el panel izquierdo y se esquematiza en el panel derecho. Los dominios relevantes están demarcados en el panel derecho. Los asteriscos indican que la información fue predicha por análisis bioinformático.

**A**

```

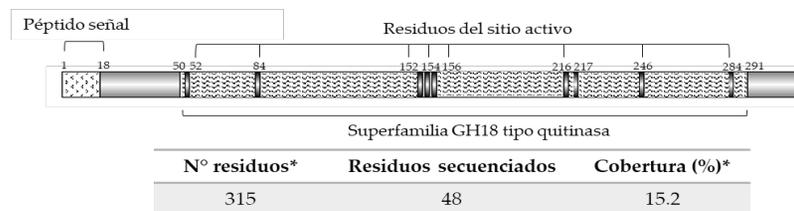
1      MVHLQRVTAL WASFVALSWP VAANPVTNNN VDAAQIDLKS ASDQKSNVPA
51     VWPPPQQISA SSASTVRLNS DVTIVTGNAT DAPTIKAIQA IVADAGGKAT
101    VSIQASGKGT QIYIGTATQN EAAAAAKAL TGDSAEGLTA EGYVLGGTY
151    NGHPTVVLNG VDIRGTFYAA QTLRQLVNDT PSVPGVKVRD WPLMPIRGSI
201    EGFYGIWWSH QARKDQYVYF GQHKMNTYVY TPKGDPYLRA TWRELYGGKD
251    LDQLKDLIET ANANHVDFY ALSPLGLDLCY TSDADFNATV SKFEQLRKLK
301    VSSFYIALDD IPLKFHCSD KKKFPDNGDW HWIADAQTYI LNRVQKEYIK
351    AHHGLTDLET VPTNYGASAP DPYKGEFGKQ PDKNIRVQWT GEGVFSDKIT
401    VESVVRADST YVTDKLEIWD NFPVNDGKPF RLFLNPLTER APDLYKHMIG
451    FTSNPMVQSY ASMIALGNYG DYSWNPSYD AKKSWAAVIO ALAGKDKSVH
501    TALATFVDIN QNWFYRKS TE SAPQLSKDID NFWAARKSHK NQSSALTRD
551    LKLIASLPDV LPGMAMKFFA TEVAPWSTVA MQWAKASQHM TAMLAADNG
601    DSKADDEYK AAQEWVERTK ARTVDSLSSA GKVVVNSITP TTGDGVDFAF
651    IVNATAIYKG Q
  
```



**B**

```

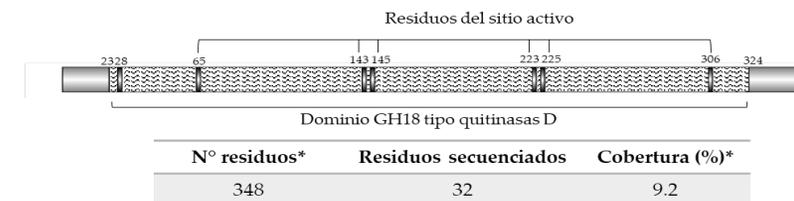
1      MKLSILSFIT LGVASVMAGS ASVCPSDNTH TTGAALQNVY DYKKGHDQLM
51     AGYFRSWRDK ASSTANKVSM LDLPDCLDIA FFFPEGNEPA AFWTALKDTY
101    VPALRRKRGTK VRSVGIQAL INSTWANTPA GWQGLADALL KNVDYDGI DG
151    LDIDVQNLNLS AAQLQQTGV FNALSKKLGK KSGTGWKLLIF DTNMDGSQLP
201    WRNVYSTISY VLIQSYGRSP SGLQNTYNSF KSYISSKQYL IGFSFYEENG
251    ADWEDTTTPI TSSRAWQYAK WQPSGATKGG IFSYAIDRDG VAIGDDKLQP
301    TDFTWTRKLI SAMNP
  
```



**C**

```

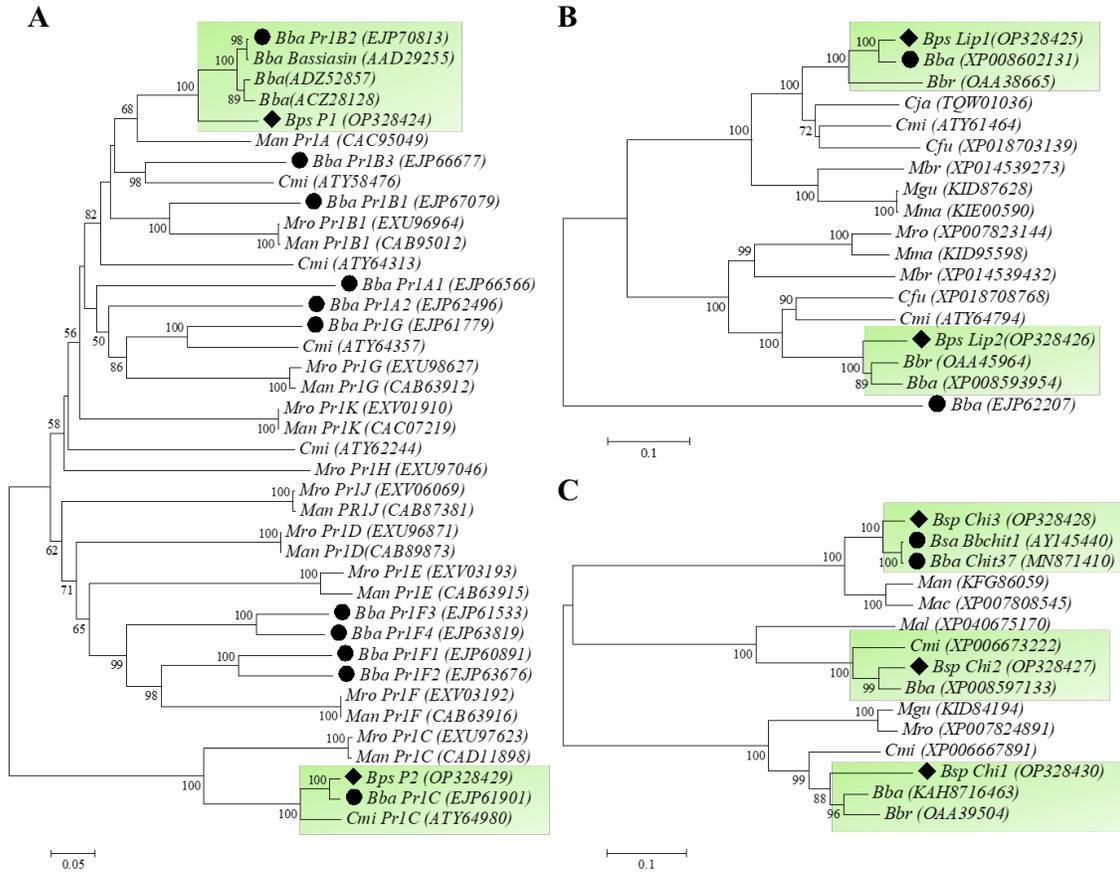
1      MVSASPLAFR ADTCATKGRP AGKVLQGYWE NWDGAKNGVH PFFGWPTIQS
51     PDIRKHGYNV INAAFPPIQP DGTALWEDGM DTGVKVASPA DMCEAKAAGA
101    TILMIGGCT AAIDLSSSAV ADKFVSTIVP ILEKYNEGI DIDIEGLTG
151    SGNIAITLSTS QTNLIRIIDG VLAQMPSNFG LTMAPETAYV TGGSVTYGSI
201    WGSYLPVIKK YLDNGRLWWL NMQYYNGEMY GCSGDSYKAG TVEGFVAQTD
251    CLNKGILTQG VTIKIPMRSK CLAFPLPSLGL VAVTCPRFTW RRFSHYKGLAL
301    KGLMTWLSLWV DGSKNWTFGD NVKGLGLDCV KLECYVRAPQ SHGWGNWNT
  
```



**Figura 12. Quitinasas extracelulares encontradas en el extracto de proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en el medio M2 y A8.** (A, B, C) Secuencias aminoácidas y esquemas de Chi1 (OP328430), Chi2 (OP328427), y Chi3 (OP328428), respectivamente. Las proteínas corresponden a secuencias de aminoácidos deducidas del genoma de *B. pseudobassiana* RGM 2184 (JAKJXD000000000.1). Los esquemas funcionales de estas proteínas (paneles de la derecha) se construyeron utilizando la información disponible en la base de datos de dominios conservados del NCBI. Los péptidos secuenciados están resaltados en negrita en el panel izquierdo. Recuadro verde en panel izquierdo resaltan motivos conservados. El péptido señal (en cursiva) y los residuos del sitio activo (subrayados) se denotan en la secuencia aminoácida de la exoenzima en el panel izquierdo y se esquematiza en el panel derecho. Los dominios relevantes están demarcados en el panel derecho. Los asteriscos indican que la información fue predicha por análisis bioinformático.

### 3.5. Análisis filogenético de enzimas identificadas por LC-MS/MS.

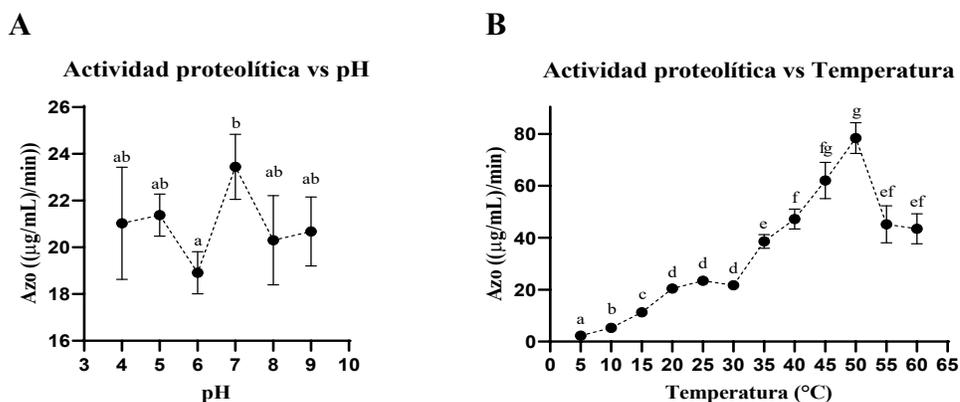
Se realizó un análisis para determinar relaciones filogenéticas entre las enzimas identificadas mediante espectrometría de masas en la cepa RGM 2184 y las descritas en la literatura. Para el caso de las proteasas P1 y P2, se logró establecer que la primera compartía el mismo subclado que Pr1B2 (Gao *et al.*, 2019) un 100% de las 1000 iteraciones que se realizaron para determinar el árbol (Figura 13A). P2 en cambio, se agrupó con Pr1C, descrita tanto en *B. bassiana* como en *C. militaris* en todas las iteraciones *Bootstrap* (Figura 13A) (Gao *et al.*, 2019). Lip1 se encuentra en el mismo subclado que el precursor de la lipasa extracelular de *B. bassiana* ARSEF 2860 (Secuencia de referencia NCBI: XP\_008602131) (Figura 13B). Para el caso de Lip2, esta se agrupa con dos lipasas (Figura 13B) predichas desde el genoma de *Beauveria brongniartii* RCEF 3172 (Número acceso NCBI: OAA45964) y *B. bassiana* ARSEF 2860 (Número acceso NCBI: XP008593954), de las cuales ninguna ha sido caracterizada. En cuanto a las quitinasas, las tres identificadas en RGM 2184 pertenecen a subclados distintos (Figura 13C). Chi3 comparte el mismo clado con Bbchit1, descrita en *B. bassiana* (Fang *et al.*, 2005). Tanto como Chi1 y Chi2, comparten subclados con quitinasas anotadas predictivamente en el genoma de otros HEP.



**Figura 13. Árbol filogenético de exoproteasas, exolipasas y exochitinasas descritas y/o predichas en hongos entomopatógenos.** Los árboles filogenéticos de (A) exoproteasas, (B) exolipasas y (C) exochitinasas se construyeron utilizando el método de unión de vecinos en el software MEGA7. Los árboles están dibujados a escala, con longitudes de rama medidas por el número de sustituciones por sitio. Las enzimas identificadas en este estudio se indican con rombos. Las exoenzimas descritas en otros estudios se indican con un círculo (Gao *et al.*, 2020; Hube *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2005; Vici *et al.*, 2012; Lovera *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2007). Al final de la rama se indica la especie abreviada de la especie de HEP seguida de su código de acceso NCBI entre paréntesis. Las especies HEP se abrevian como sigue: *Bba*, *Beauveria bassiana*. *Bbr*, *Beauveria brongniartii*. *Bps*, *Beauveria pseudobassiana*. *Cfu*, *Cordyceps fumosorosea*. *Cja*, *Cordyceps javanica*. *Cmi*, *Cordyceps militaris*. *Mal*, *Metarhizium album*. *Mgu*, *Metarhizium guizhouense*. *Mma*, *Metarhizium majus*. *Man*, *Metarhizium anisopliae*. *Mro*, *Metarhizium robertsii*.

### 3.6. Medición actividad proteolítica en extracto M2 a diferentes pH y temperaturas.

La actividad proteolítica del extracto M2 se evaluó en un rango de pH de 4 a 9, a temperatura constante (25°C). La mayor actividad promedio se registró a pH 7 (Figura 14<sup>a</sup>). Por lo tanto, se utilizó la solución tampón neutra para realizar el barrido de actividad a distintas temperaturas. Las proteasas presentes en el extracto registraron las mayores actividades en temperaturas superiores a 30°C, alcanzando su *peak* a 45°C y 50°C. A 25°C (Figura 14B), se registró una actividad de 3.350 U/mg, mientras que, a 50°C, se obtuvo el triple de este valor de actividad, 11.196 U/mg (Anexo 8.6). Si bien a temperaturas inferiores a 30°C disminuye considerablemente la actividad, a 5°C se registró catálisis proteolítica que representa un 3% de la actividad obtenida a 50°C. Estos resultados sugieren que en el extracto M2 posee una mayor proporción de proteasas que presentan actividad óptima a pH neutro y a temperaturas entre 45 y 50°C.

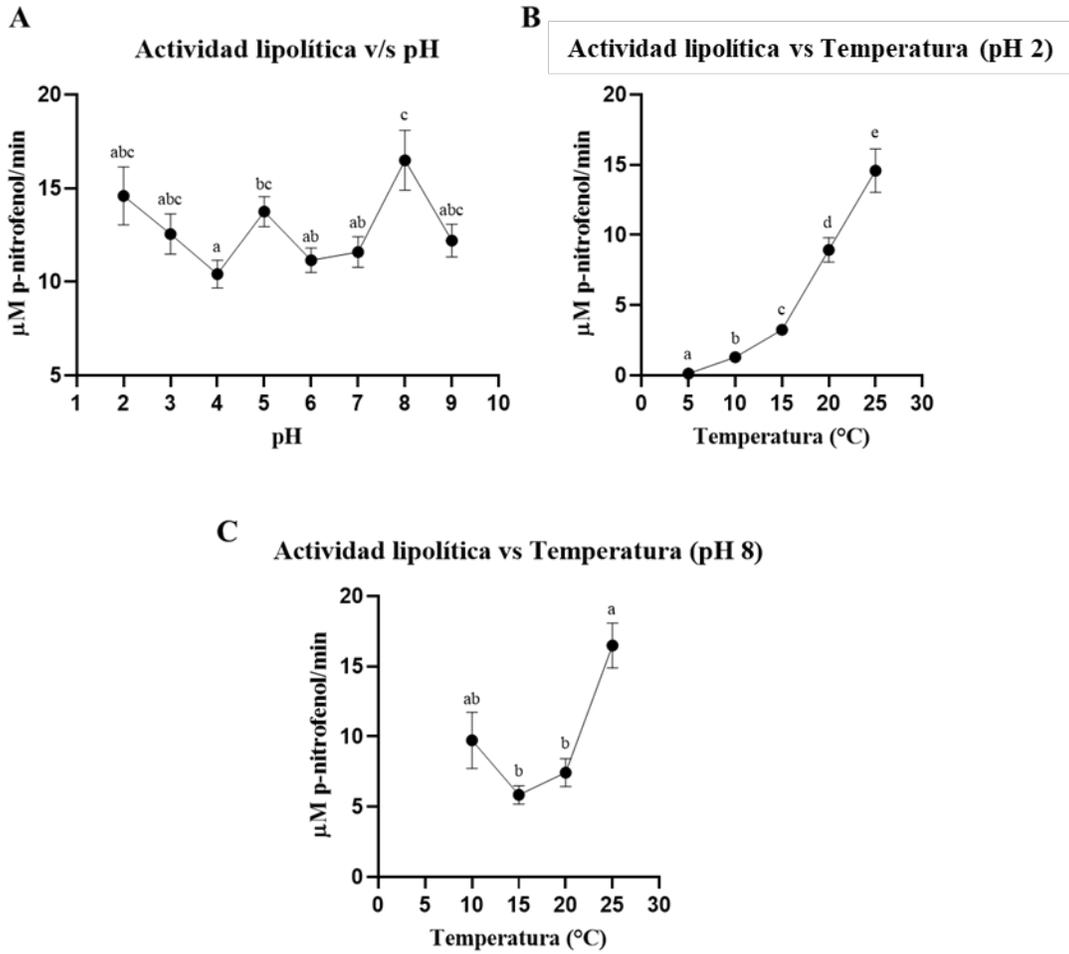


**Figura 14. Actividad proteolítica del extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2.** (A) Gráfico de actividad proteolítica del extracto M2 a distintos pHs y temperatura constante (25°C). (B) Gráfico de actividad proteolítica del extracto M2 a distintas temperaturas y pH constante (pH 7). Cada punto representa la actividad, y los bigotes el error estándar. Las letras representan una comparación de los intervalos de confianza al 95% de las actividades registradas en los distintos tratamientos evaluados. Diferentes letras en los tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas entre estos.

### **3.7. Medición actividad lipolítica del extracto M2.**

La actividad enzimática del extracto en el rango de 2 a 9 unidades de pH presentó un comportamiento oscilante (Figura 15A). Sin embargo, los promedios de actividad más altos se registraron a pH ácido 2 (2.084 U/mg) y pH básico 8 (2.357 U/mg) (Anexo 8.10). Debido a que estos valores de actividad no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, se evaluó la reacción a distintas temperaturas en ambos Ph. A pH 2, la mayor actividad se registró a 25°C, y se observó una menor actividad a medida que se disminuyó la temperatura (Figura 15B). A pH 8, también se obtuvo la mayor actividad a 25°C, sin embargo, se observó una tendencia de aumento de actividad lipolítica a 10°C (1.392 U/mg), en comparación a la registrada a 15°C (837 U/mg) (Figura 15C). Esto sugiere la presencia de enzimas adaptadas al frío que son capaces de hidrolizar lípidos. A 5°C no se logró determinar la actividad, dado a que la sensibilidad del equipo fue insuficiente para seguir la cinética de la liberación de p-nitrofenol (Anexo 8.9A)

Estos resultados sugieren que el crecimiento de la cepa RGM 2184 en medio M2, induce la secreción de lipasas de diferente naturaleza bioquímica, permitiendo hidrolizar lípidos bajo diversos Ph. La cepa RGM 2184 secreta al menos una lipasa capaz de actuar eficientemente a temperaturas bajo los 15°C.

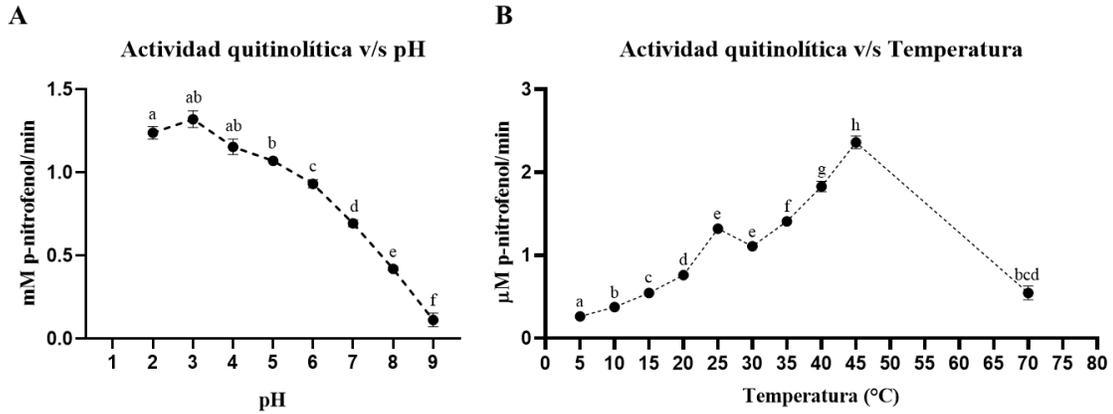


**Figura 15. Actividad lipolítica del extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2.** (A), Gráfico de actividad lipolítica del extracto M2 a distintas unidades de Ph. (B), Gráfico de actividad lipolítica del extracto M2 a distintas temperaturas a pH 2. (C), Gráfico de actividad lipolítica del extracto M2 a distintas temperaturas a pH 8. Cada punto representa la actividad, y los bigotes el error estándar. Se compararon los intervalos de confianza de las actividades registradas. Diferentes letras en los tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas entre estos.

### **3.8. Medición actividad quitinolítica del extracto A8.**

Se llevó a cabo un ensayo de actividad quitinolítica del extracto de proteínas del sobrenadante del medio de cultivo de RGM 2184 en medio A8. La reacción se llevó a cabo en fase acuosa utilizando el sustrato pNG a diferentes unidades de pH y temperatura. La mayor actividad quitinolítica se observó en las unidades 2, 3 y 4 de pH (177, 188 y 164 U/mg de actividad, respectivamente; Anexo 8.13) a 25°C. A medida que incrementó el pH disminuyó la actividad quitinolítica, lo que da cuenta de una menor proporción o una ausencia de quitinasas básicas (Figura 16A). El promedio más alto de actividad se registró a pH 3, sin embargo, en el rango de pH de 2-4 no se obtuvieron diferencias significativas en la actividad.

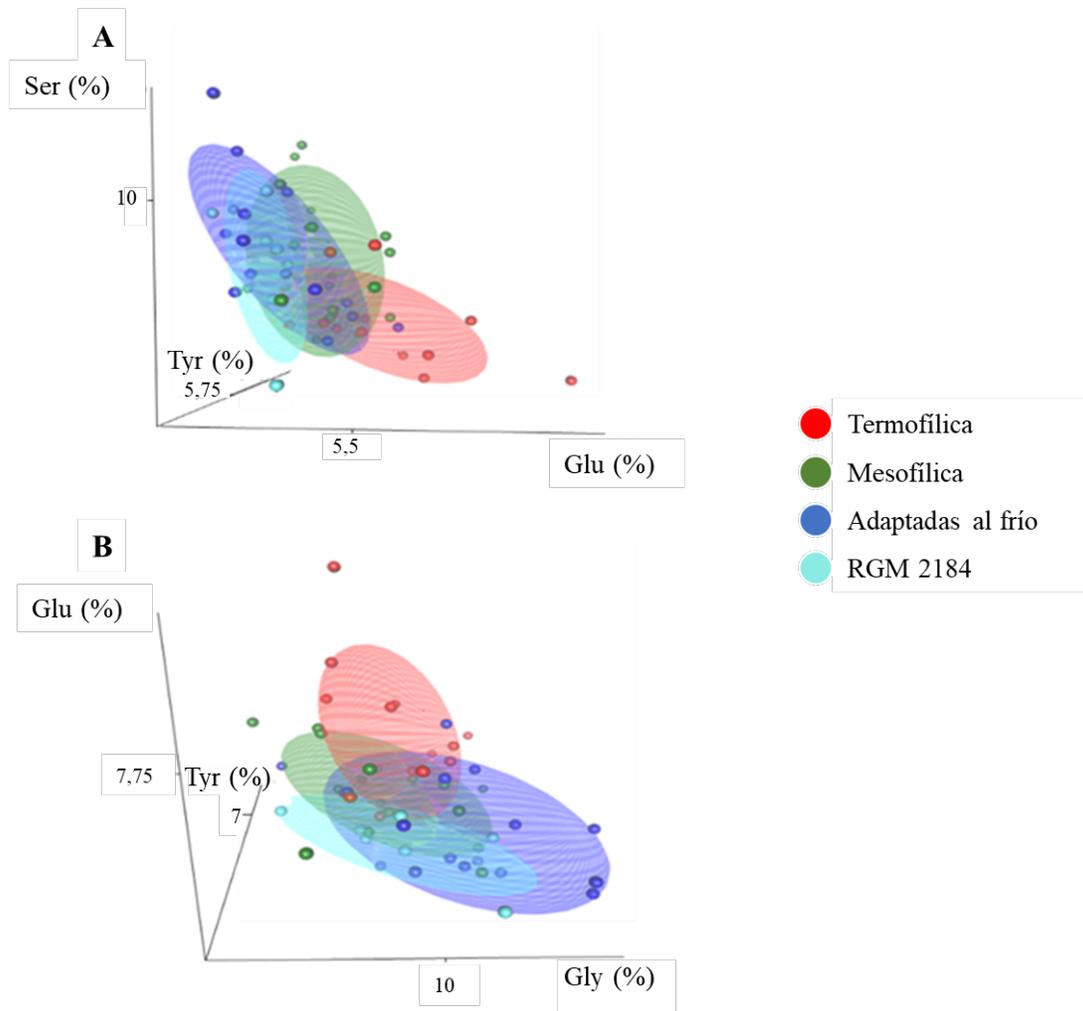
Se determinó la actividad enzimática a diferentes temperaturas a pH constante (pH = 3). La actividad más alta se obtuvo a 45°C (337 U/mg), doblando la actividad registrada a 25°C. A medida que se disminuyó la temperatura se redujo la actividad quitinolítica del extracto A8 (Figura 16B). Sin embargo, a 5°C se detectó actividad representando el 11% de la actividad quitinolítica máxima registrada. Estos resultados, permitieron establecer que la cepa RGM 2184 en el medio A8 secreta quitinasas ácidas y activas principalmente a altas temperaturas.



**Figura 16. Actividad quitinolítica del extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio A8.** (A), Gráfico de actividad quitinolítica del extracto A8 a distintas unidades de pH. (B), Gráfico de actividad quitinolítica del extracto A8 a distintas temperaturas a pH 3. Cada punto representa la actividad, y los bigotes, el error estándar de la pendiente. Se compararon los intervalos de confianza de las actividades registradas. Diferentes letras en los tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas entre estos.

### 3.9. Análisis de composición aminoacídica de exoenzimas identificadas, en comparación con enzimas mesófilas, adaptadas al frío y termófilas.

El análisis de la composición de aminoácidos se realizó entre 17 enzimas mesófilas, 14 termófilas y 14 adaptadas al frío descritas en la literatura científica (Anexo 8.14). Este análisis indicó que las enzimas adaptadas al frío presentan un porcentaje significativamente mayor de glicina (Gly), menor porcentaje de ácido glutámico (Glu) y tirosina (Tyr), con respecto a las enzimas mesófilas y termófilas (Anexo 8.15). Por otra parte, el análisis de dispersión en 3D de la composición aminoacídica mostró que las exoenzimas identificadas de la cepa RGM 2184 se agrupan en una elipsoide que se solapa con el de las enzimas adaptadas al frío (Figura 17). Estos resultados sugieren que las exoenzimas de la cepa RGM 2184 presentan una composición aminoacídica similar a enzimas descritas como adaptadas a bajas temperaturas.



**Figura 17. Diagrama de dispersión tridimensional según composición aminoacídica.** Las enzimas adaptadas al frío, mesófilas, termófilas y las identificadas en *B. pseudobassiana* RGM 2184, se representan con los colores azul, verde, rojo y celeste, respectivamente (esferas y elipsoides). Los ejes corresponden al porcentaje de tirosina (Tyr (%)), ácido glutámico (Glu (%)), glicina (Gly (%)) y serina (Ser (%)) en la estructura primaria de las enzimas. (A, B) Gráfico compuesto por los ejes Ser (%) – Tyr (%) – Glu (%) y Glu (%) – Tyr (%) – Gly (%), respectivamente.

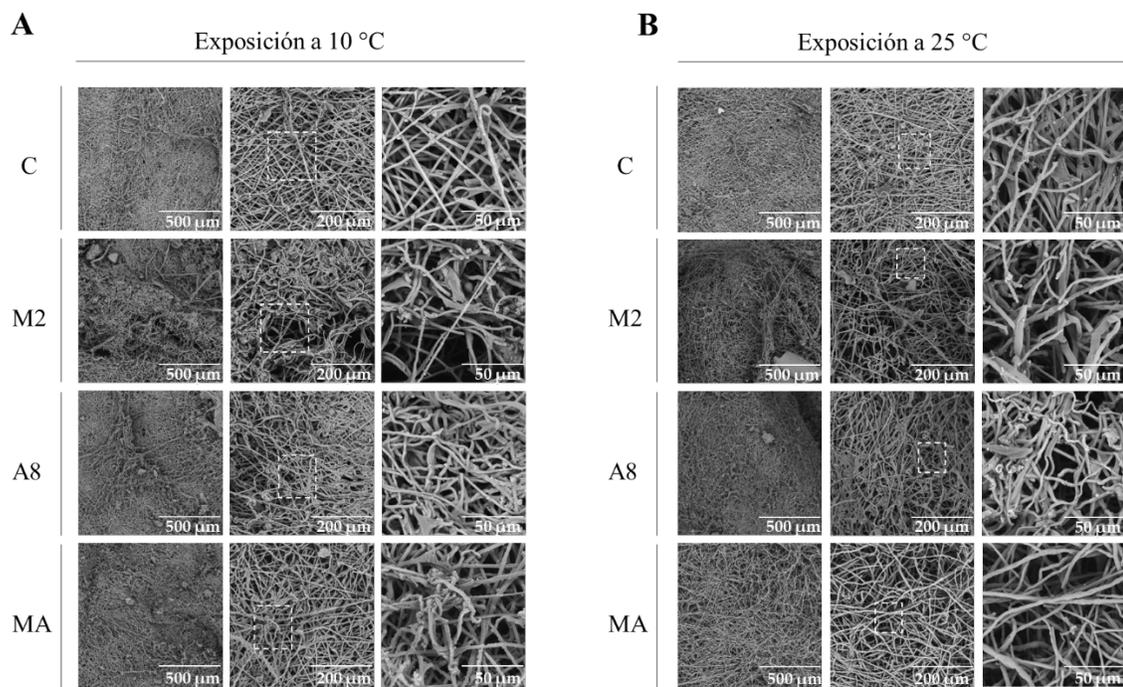
### **3.10. Evaluación de la actividad hidrolítica de las enzimas secretadas por la cepa RGM 2184 en seda y pupas de *L. botrana*.**

La cepa *B. pseudobassiana* RGM 2184 demostró ejercer su capacidad biocontroladora en otoño invierno (Altimira *et al.*, 2019). Por este motivo, se evaluó la capacidad hidrolítica de los extractos enzimáticos M2 y A8 para degradar el capullo y cutícula de *L. botrana* a 10 y 25°C.

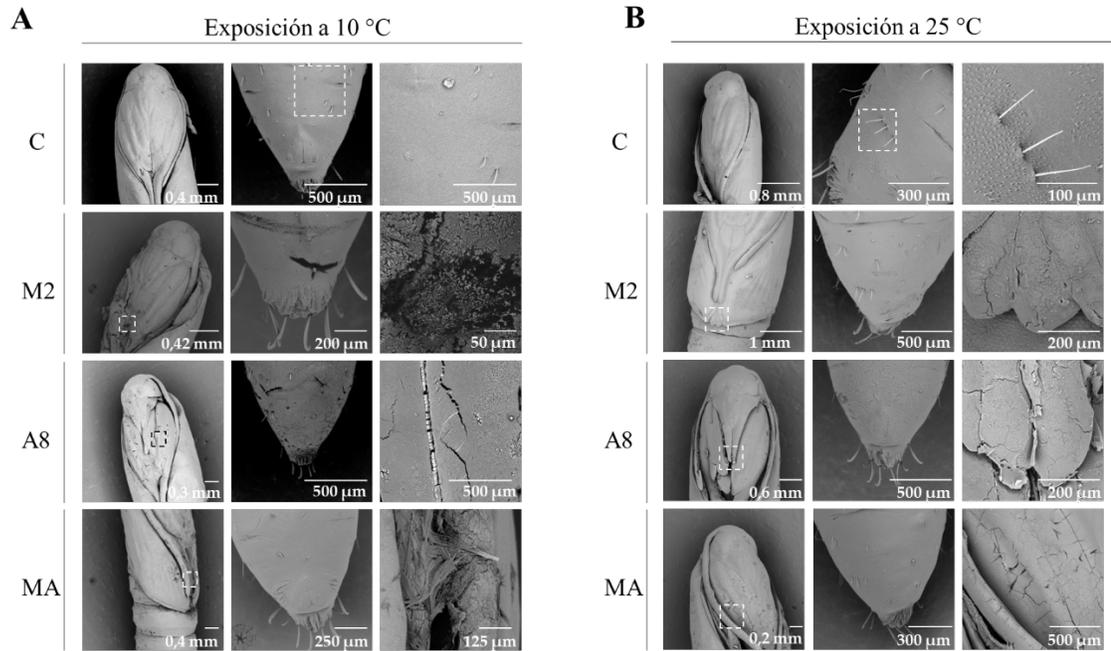
En el caso de la seda de capullo de *L. botrana*, los daños se asociaron a una pérdida de densidad del tejido capullo. Estos se visualizaron tanto a 10 como a 25°C (Figura 18). El tejido fibroso incubado a 10°C se observó menos compacto cuando se expuso al extracto enriquecido con proteasas M2 (Figura 18A, panel M2), en comparación con el control no tratado. La seda incubada con la mezcla de ambos extractos (MA) denotó un daño similar al registrado con solo el extracto M2 (Figura 18A, panel MA). La densidad de las fibras proteicas de la seda expuestas a A8 (Figura 18A, panel A8) se visualizó similar a la del tratamiento control (Figura 18A, panel C). A 25 °C, las menores densidades de la seda se observaron al tejido expuesto a M2 y a la mezcla MA (Figura 18B, panel M2 y MA). A diferencia de la incubación a 10 °C, las fibras de la seda en presencia de las proteínas del extracto A8 (Figura 18B, panel A8), se observan menos densas que la del tratamiento control (Figura 18B, panel C).

Con respecto a la cutícula de las pupas de *L. botrana*, los daños se determinaron visualmente, según frecuencia de fisuras y agujeros. Las pupas expuestas a los extractos enzimáticos A8 y M2, se registraron daños en ambas temperaturas (Figura 19). En presencia del extracto M2, se visualizó una menor frecuencia de daños en comparación al efecto de los otros extractos, sin embargo, a 10°C se observó un agujero (Figura 19A, panel M2). Para el caso de las cutículas de polillas expuestas a el extracto enriquecido con quitinasas, los daños se visualizan como fisuras superficiales (Figura 19A, panel A8). A 25°C, el extracto A8 ejerció un efecto notable en las pupas, donde la cutícula expone una mayor frecuencia de fisuras (aspecto quebradizo)

(Figura 19, panel A8). Tanto en presencia de las enzimas del extracto M2, como en presencia de la mezcla, se observaron daños superficiales. Las lesiones observadas en los tejidos de la pupa y seda en presencia de los extractos enzimáticos crudos, no se visualizaron en el tratamiento control a 10 y 25°C. Por consiguiente, estos resultados comprueban la actividad hidrolítica ejercida por las enzimas secretadas por la cepa RGM 2184. Los daños fueron evidentes tanto en las fibras del capullo como en la cutícula de las pupas de polilla *L. botrana*. La capacidad de degradar los tejidos mencionados se observó a las temperaturas promedio de otoño (~10°C) y a 25°C. Estos resultados permiten suponer que la cepa RGM 2184 secreta enzimas hidrolíticas capaces de degradar el capullo y cutícula a bajas temperaturas (10°C).



**Figura 18. Micrografías SEM de sedas de *L. botrana* expuestas a los extractos proteicos de la cepa RGM 2184. (A) incubadas a 10°C, (B) incubadas a 25°C. El panel C muestra el tratamiento control; el panel M2 (4, 5, 6) corresponde a sedas incubadas con el extracto M2; el panel A8 son sedas incubadas con el extracto A8; el panel MA muestra las sedas incubadas en una mezcla de ambos extractos, M2 y A8. Los cuadrados segmentados indican la zona que se muestra aumentada en la tercera columna de cada tratamiento.**



**Figura 18. Micrografías SEM de pupas de *L. botrana* expuestas a los extractos proteicos de RGM 2184.** (A) incubadas a 10°C, (B) incubadas a 25°C. El panel C muestra el tratamiento control; el panel M2 (4, 5, 6) corresponde a pupas incubadas con el extracto M2; el panel A8 son pupas incubadas con el extracto A8; el panel MA muestra las pupas incubadas en una mezcla de extractos enzimáticos, M2 y A8. Los cuadrados segmentados indican la zona que se muestra aumentada en la tercera columna de cada tratamiento.

## 4. DISCUSIÓN

La plaga cuarentenaria *Lobesia botrana* afecta la oferta exportadora de uva de mesa de Chile. Para controlar esta plaga se utilizan principalmente agroquímicos. Sin embargo, en el mercado no se existen métodos para controlar la polilla en su estadio de pupa durante la temporada otoño-invierno. Dadas las características de su capullo, los agroquímicos son incapaces de penetrar y ejercer su acción insecticida (Altimira, 2020). Sin embargo, el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 demostró disminuir eficazmente las poblaciones de este insecto durante la temporada otoño invierno (Altimira *et al.*, 2021). Una de las etapas críticas para que estos microorganismos logren ejercer su acción biocontroladora es la secreción de un coctel enzimático que hidroliza los componentes de la cutícula del insecto (Moharram *et al.*, 2021). En este estudio se identificaron y caracterizaron enzimas potencialmente involucradas en la acción insecticida de la cepa RGM 2184. Adicionalmente, se evaluó la actividad catalítica de su maquinaria enzimática a bajas temperaturas, para controlar a pupas de *L. botrana* durante otoño-invierno.

### 4.1. Análisis bioinformático establece la presencia de genes que codifican enzimas extracelulares que participarían en la actividad entomopatógena de RGM 2184.

Los hongos entomopatógenos cuentan con una diversa batería enzimática capaz de degradar los distintos componentes de la cutícula del insecto (Vidhate *et al.*, 2022). A partir del genoma secuenciado y anotado de la cepa RGM 2184 de *B. pseudobassiana*, se predijeron las potenciales enzimas que serían secretadas por esta cepa entomopatógena. Mediante el análisis *in silico* se lograron identificar 116 genes que codifican a exoenzimas. De estos 45 (39%) son proteasas, 13 lipasas (11%) y 3 quitinasas (3%) (Anexo 8.1). Debido a la naturaleza de los componentes de la cutícula del artrópodo, estos son los grupos enzimáticos de mayor relevancia en la actividad entomopatógena del hongo.

Dado que la actividad proteolítica se considera preponderante en la virulencia de las distintas cepas de HEP, se esperaba que la cepa RGM 2184 contara con una diversa batería de proteasas para poder degradar la amplia variedad de proteínas que están presente en el capullo y cutícula del artrópodo. A través del análisis de las secuencias de las enzimas se pudo predecir que 27 de estas proteasas son serín proteasa. De las cuales 19 contienen el dominio conservado de la superfamilia Peptidasa S8\_S53 (CD: c110459), presente en todas las isoenzimas de Pr1 (Gao *et al.*, 2020) (Anexo 8.1). No obstante, solo en cinco de ellas se pudo resolver que el dominio catalítico pertenecía a la familia de las Pr1 (Peptidasa S8 PCSK9 tipo-Proteínasa K; CD: 04077). Esto es disímil con la cantidad descrita en *Beauveria bassiana*, donde se detectaron 11 proteasas Pr1 con este dominio (Gao *et al.*, 2020). Dada la cercanía filogenética entre los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *B. pseudobassiana*, se podría suponer que ambas poseen un número similar de proteasas Pr1. Por lo que es probable que el resto de las isoformas de Pr1 presentes en RGM 2184 estén contenidas en el pool que presentó el dominio de la superfamilia CD: c10459 y la base de datos fue incapaz de asignar la familia al dominio catalítico. Por su parte, la cantidad de lipasas predichas en el genoma y la baja identidad entre la mayoría de ellas (menor al 25%; Tramontano, 1998) (Anexo 8.16) sugiere que estas enzimas difieren en los sustratos digeridos. Puesto que la composición lipídica de la epicutícula difiere entre las especies de artrópodos (Ganina *et al.*, 2022), este resultado *in silico* es concordante con el amplio rango de hospederos que puede colonizar el género *Beauveria*. Por último, de las quitinasas extracelulares predichas, 2 de ellas tienen una potencial actividad endoquitinasa y 1 exoquitinasa. Esto está en concordancia con el proceso infectivo de los hongos entomopatógenos, donde ambos tipos de actividad son necesarios para degradar la endocutícula de los insectos (Butt *et al.*, 2016).

#### **4.2. Análisis de genómica comparativa establece correlación de enzimas extracelulares compartidas entre HEP y su cercanía filogenética.**

El análisis de genómica comparativa de las secuencias nucleotídicas de las exoenzimas predichas en la cepa RGM 2184 con respecto a otras cepas HEP secuenciadas, indicó que la cantidad de secuencias homólogas que presentan se relaciona directamente con la cercanía filogenética con RGM 2184 (Figura 7; Anexo 8.2).

Estos resultados indican que existe una amplia diversidad de exoenzimas entre los géneros de hongos entomopatógenos *Beauveria* y *Metarhizium* que pertenecen a la familia Cordycipitaceae y Clavicipitaceae, respectivamente. Este antecedente es relevante en una estrategia de biocontrol, debido a que una mezcla de cepas pertenecientes a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* podría tener un repertorio enzimático diferente para ejercer su acción sobre la plaga. Contar con microorganismo de estos dos géneros reducirá las posibilidades de que la plaga genere resistencia, ya que la diversificación de las propiedades fisicoquímicas de las enzimas, le confiere un mayor espectro de sustratos y permite evitar los mecanismos de defensa del artrópodo (por ejemplo, inhibidores de quitinasas/proteasas; Butt *et al.*, 2016).

#### **4.3. Medios de cultivos como inductores de actividad enzimática proteolítica, lipolítica y quitinolítica.**

La expresión y secreción de los factores de patogenicidad de los organismos es altamente regulada. De lo contrario se volvería un gasto energético innecesario por parte del hongo entomopatógeno (Safavi, 2012). Por esta razón se realizó un *screening* de 10 medios de cultivo líquido, y se evaluó la actividad proteolítica, lipolítica y quitinolítica del extracto de proteínas obtenido de los sobrenadantes de estos cultivos. Con respecto a la actividad proteolítica, se detectó

una mayor actividad en el medio a base de pupas y en M2 (Figura 8). Similar a lo reportado en Cheong *et al.* (2020), donde al día 7 de crecimiento, los mayores niveles de actividad Pr1 en *B. bassiana* se reportaron en los medios A8 y a base de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*). A diferencia del trabajo citado, en el presente estudio se midió la actividad con azocaseína, por lo que no se puede cuantificar la participación de enzimas con actividad Pr1. Sin embargo, este sustrato se utiliza para medir la actividad total del extracto, incluyendo Pr1 y Pr2 (capaces de hidrolizar la azocaseína; Firouzbakht *et al.*, 2020), por lo que un aumento de esta actividad sugiere el aumento de secreción de serín proteasas de interés. La detección de la actividad proteolítica fue acotada, por lo que probablemente la cepa RGM 2184 requiera sustratos específicos para la inducción de estas enzimas. Según la literatura, compuestos de quitina inducen la secreción de proteasas en HEP (Dahr y Kaur, 2010; Mondal *et al.*, 2016), tal como se observó en el medio P (presencia de polímeros de quitina provenientes de la cutícula de las pupas de *L. botrana*). El extracto de proteína del sobrenadante de cultivo de la cepa RGM 2184 en el medio a base de pupas de *L. botrana* registró la mayor actividad proteolítica en comparación a los otros tratamientos. Sin embargo, presentó actividad sin la presencia de enzimas de la cepa RGM 2184. Por lo que se descartó el uso de este medio para la posterior identificación y caracterización de enzimas extracelulares, ya que la actividad (i) se podría asociar a la presencia de proteasas del artrópodo; (ii) en la identificación de proteasas por zimografía no se podrían diferenciar las enzimas que pertenecen a RGM 2184 y al insecto; y (iii) el análisis de identificación por espectrometría de masas podría llevar a conclusiones erróneas, debido a que se secuencian péptidos y no la proteína completa, por lo que un péptido podría estar presente en proteasas de distintas fuentes. Es por esto que el medio M2 fue seleccionado para identificar y evaluar las proteasas secretadas por la cepa RGM 2184.

En el barrido de actividad quitinolítica, el medio A8, fue el que registró la absorbancia más alta. En el trabajo de Cheong *et al.* (2020) se reportó, de manera similar, que el medio A8 y G8 indujeron la secreción de quitinasas en *B. bassiana*. Dado a que una de las vías de inducción de

síntesis enzimática es la presencia de su(s) sustrato(s) en el medio (Zarevúcka, 2012); se podría hipotetizar que la presencia de compuestos de la cutícula del insecto podría ejercer un efecto positivo en la secreción de quitinasas. Sin embargo, no se observó este efecto de forma significativa en el medio a base de pupas de *L. botrana*. Lo que se explicaría debido a que la epicutícula del insecto presenta lípidos de cadena larga, y su metabolización genera un alto estrés oxidativo (Gao *et al.*, 2020). En consecuencia, el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) produce que el microorganismo entomopatógeno genere una respuesta antioxidativa (Cheong *et al.*, 2020). Estos antecedentes sugieren que el HEP debe priorizar su gasto energético en ejercer una respuesta antioxidante por sobre la síntesis de enzimas hidrolíticas.

En cuanto a la actividad lipolítica, esta se observó en todos los medios de cultivo líquido. Por lo que se puede establecer que existe una actividad lipolítica basal. Sin embargo, la composición de ciertos medios aumentó la hidrólisis de lípidos (M2, G55, A55, A8, CN55 y CN8). Dado a que la mayor actividad se detectó en M2, se utilizó este medio para identificar y caracterizar lipasas. Cabe señalar que el medio M1 y M2 presentan la misma fuente de carbono y nitrógeno (glucosa y extracto de levadura, respectivamente), sin embargo, M2 contiene sales minerales (iones:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ). Este último indujo las tres actividades, en comparación al medio sin sales. Esta diferencia podría explicarse porque las sales minerales (i) contrarrestan las cargas negativas de los ácidos nucleicos y (ii) de las proteínas, pudiendo aumentar la transcripción de genes involucrados y la actividad enzimática, respectivamente. Además, (iii) los iones pueden activar enzimas específicas actuando como cofactor en reacciones enzimáticas entre sustratos (S) y productos (P); y (iv) participan en el estrés oxidativo, reduciendo especies oxidadas, incrementando la capacidad del hongo de prosperar en un entorno competitivo (*fitness*).

#### 4.4. Precipitación por acetona y obtención de enzimas adaptadas al frío.

El uso de solventes orgánicos solubles en agua ha sido empleado desde los principios de la purificación de proteínas. El proceso fisicoquímico se explica porque los disolventes orgánicos reducen la constante dieléctrica de las soluciones acuosas, aumentando así la atracción entre dos grupos de carga opuestos e interrumpiendo la capa de solvatación de las proteínas, lo que provoca la agregación y precipitación de las moléculas proteicas. (Scopes, 1994; Liu *et al.*, 2020). Uno de los posibles problemas que podría conllevar una precipitación mediante el uso de estos solventes, es la posible desnaturalización de las proteínas al formar un *pellet* difícilmente solubilizado. Para evitarlo, se requiere realizar el procedimiento a bajas temperaturas, ya que el incremento de la energía calórica aumenta la flexibilidad de la proteína, lo que permite al solvente acceder a los *core* hidrofóbicos y generar la desnaturalización del péptido (Scopes, 1994). Una estrategia para contrarrestar esta posibilidad es el uso de solventes orgánicos a bajas temperaturas ( $<-10^{\circ}\text{C}$ ). Dado a que los puntos de fusión de este tipo de solvente son bajos, se puede realizar sin problema a temperaturas inferiores a los  $0^{\circ}\text{C}$  (Mohtashami *et al.*, 2019). Sin embargo, existe otro factor que amenaza la mantención de baja energía calórica durante la precipitación, y es el proceso de solvatación. Al agregar el solvente al agua, se eleva la temperatura del sistema, debido a la entalpía negativa de la hidratación de moléculas (Hefter *et al.*, 2002). En la metodología de este trabajo se agregó un 66% v/v de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esto permite que el efecto de solvatación no incremente la temperatura, ya que a porcentajes superiores a 20% v/v, el efecto se vuelve despreciable (Scopes, 1994).

En la literatura se ha reportado el uso de acetona para la obtención de enzimas adaptadas al frío. También se ha descrito la precipitación o concentración de proteínas mediante el uso de sulfato de amonio (*salting-out*) y sistemas de ultrafiltración, como se señala en la Tabla 1. Así, la literatura respalda la metodología utilizada en el presente estudio. Sin embargo, cabe señalar que las enzimas

adaptadas al frío son más flexibles (Santiago, 2016), por lo que es probable que, si existió una desnaturalización, una mayor proporción de enzimas adaptadas al frío podrían estar presentes en el precipitado insoluble. Adicionalmente, para ensayos posteriores se sugiere que los matraces en los que se creció el hongo se enfrien previamente a 4°C y minimizar así, la posibilidad de desnaturalización.

**Tabla 1. Métodos de concentración de enzimas adaptadas al frío**

<b>Microorganismo</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>Método de concentración</b>	<b>Referencia</b>
<i>Emericella nidulans</i>	Lipasa	Precipitación por sulfato de amonio	Lanka <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas sp.</i>	Lipasa	Precipitación por acetona	Dey <i>et al.</i> , 2014
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipasa	Precipitación por sulfato de amonio	Li <i>et al.</i> , 2019
<i>Pseudomonas mandeli</i>	Lipasa	Precipitación por acetona	Shaheen <i>et al.</i> , 2019
<i>Psychrobacter SC65A.3</i>	Lipasa	Precipitación por acetona	Gheorghita <i>et al.</i> , 2021
<i>Geotrichum sp</i>	Lipasa	Precipitación por sulfato de amonio	Cai <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas sp.</i>	Quitinasa	Ultrafiltración	Liu <i>et al.</i> , 2019
<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	Quitinasa	Precipitación por sulfato de amonio	Fu <i>et al.</i> , 2020
<i>Arthrobacter sp.</i>	Quitinasa	Precipitación por sulfato de amonio	Mavromatis <i>et al.</i> , 2003
<i>Geomyces sp.</i>	Quitinasa	Precipitación por glicol polietileno	Urbanek <i>et al.</i> , 2022
<i>Alkaliphilus transvaalensis</i>	Serín proteasa	Amicon Ultra-15	Toyokawa <i>et al.</i> , 2010
<i>Clostridium sp.</i>	Serín proteasa	Precipitación por sulfato de amonio	Alam <i>et al.</i> , 2005
<i>Curtobacterium luteum</i>	Metalloproteasa	Precipitación por sulfato de amonio	Kuddus <i>et al.</i> , 2008
<i>Leucosporidium antarcticum</i>	Serín proteinasa	Precipitación por acetona	Turkiewics <i>et al.</i> , 2003
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Serín proteasa	Precipitación por sulfato de amonio	Zhu <i>et al.</i> , 2009
<i>Planomicrobium sp.</i>	Serín proteasa	Precipitación por sulfato de amonio, liofilización	Sheng <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Serín proteasa	Precipitación por sulfato de amonio	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Serín proteasa	Precipitación por sulfato de amonio, PEG 2000	Damare <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas sp.</i>	Serín proteasa	Precipitación por sulfato de amonio	Zeng <i>et al.</i> , 2003
<i>Serratia marcescens</i>	Metalloproteasa	Precipitación por sulfato de amonio, precipitación por acetona	Morita <i>et al.</i> , 1997
<i>Serratia proteamaculans</i>	Proteasa tipo-tripsina	Ultrafiltración	Khairulin <i>et al.</i> , 2009
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Serín proteasa	Ultrafiltración	Vazquez <i>et al.</i> , 2005

#### 4.5. Detección e identificación de enzimas potencialmente involucradas en la actividad entomopatógena de la cepa RGM 2184.

Las enzimas secretadas por la cepa RGM 2184 con actividad proteolítica, lipolítica y quitinolítica fueron detectadas mediante zimografía e identificadas por espectrometría de masas. Se detectaron 3 proteasas extracelulares mediante el ensayo de zimografía del extracto de proteínas del sobrenadante de RGM 2184 en el medio M2 (Figura 9A). Las masas moleculares de estas enzimas fueron de ~32, ~105 y ~113 KDa. Sin embargo, solo 2 proteasas de este extracto se identificaron mediante el análisis de espectrometría de masas. Los péptidos secuenciados se contrastaron con la secuencia de las enzimas predichas. Las masas moleculares de las enzimas identificadas fueron de 38 kDa y 93 kDa. Estas se denominaron como P1 y P2, respectivamente. La masa molecular de P1 es similar a la detectada por zimografía, mientras que la masa molecular de P2 es similar a las dos enzimas de mayor masa molecular detectada por dicha técnica. Estos resultados sugieren las siguientes hipótesis: (i) las enzimas de 113 kDa y 105 kDa del zimograma, corresponden a la proenzima (forma inactiva de la enzima, que debido al proceso de renaturación expone su sitio activo) y a la enzima activa, respectivamente (Samuels *et al.*, 2011). Sin embargo, mediante el servidor CDD (del inglés *Conserved Domain Database*), no se detectaron dominios inhibitorios (ii) las enzimas corresponden a isoformas debido a *splicing* alternativos del gen que codifica dichas proteínas. Empero, el gen que codifica a P2, no presenta intrones en su estructura según la predicción *in silico* mediante el servidor Augustus (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/submission>). (iii) Son tres enzimas expresadas por genes diferentes, pero una de ellas no se logró recuperar mediante el proceso de precipitación por acetona.

Adicionalmente, análisis de proteómica comparativa de las proteasas P1 y P2 reveló que pertenecen al grupo Pr1 (serín proteasa tipo-subtilisina). Estas enzimas degradan la cutícula y activan la cascada de profenoloxidasas de insectos (Krieger *et al.*, 2006). El análisis filogenético de

las secuencias de las proteínas P1 y P2 indicó están estrechamente relacionadas con Pr1B2 y Pr1C, respectivamente, descritas en *B. bassiana* ARSEF 2860 (Figura 13A). Isoformas de la enzima Pr1C han sido caracterizadas en cepas del género *Metarhizium* (Andreis *et al.*, 2019 y Gao *et al.*, 2020). El análisis de la secuencia de aminoácidos de estas enzimas (Figura 10) nos permitió encontrar motivos que podrían estar implicados en la funcionalidad, la estabilidad y el mecanismo de secreción al espacio extracelular. P1 contiene el dominio peptidasa S8 tipo proteinasa K, que presenta una tríada catalítica Asp/His/Ser característica de las serín proteasas de tipo subtilisina (Figura 10A). Además, la secuencia de la enzima tiene un sitio de unión al Ca<sup>+2</sup>. La presencia de sitios de unión para iones calcio es una característica compartida por los miembros de la superfamilia subtilisina, en la que se ha demostrado que la unión del calcio es esencial para el correcto plegamiento y la estabilidad estructural de la proteína (Betzl *et al.*, 1990; Siezen *et al.*, 1997; Arnórsdóttir *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2012)

El gen homólogo de Pr1B2 es uno de los factores de virulencia secretados por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. El gen que codifica a Pr1B2 en *B. bassiana*, ARSEF 2860 (BBA\_00443), fue uno de los 100 genes más expresados de esta cepa en la cutícula y hemolinfa de insectos de la langosta (*Locusta migratoria*) (Xiao *et al.*, 2012). Este antecedente indica la importancia del papel de esta enzima como factor de virulencia en la penetración de la cutícula, asimilación de nutrientes en la hemolinfa y/o lisis de péptidos antifúngicos.

Con respecto a la detección de lipasas mediante zimografía, la transferencia se realizó por capilaridad. Inicialmente, el traspaso de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE al gel copolimerizado con tributirina, se intentó realizar mediante electrotransferencia. Mas, no se lograron detectar lipasas luego de la incubación con los co-factores (resultados no mostrados). Por lo que se hipotetizó que el pKa de las lipasas secretadas por RGM 2184 era mayor al pH del tampón de transferencia (>8,3). Por esto se realizó la transferencia por capilaridad. Luego de esto, se logró

detectar una sola banda lítica en el gel de aproximadamente 52 kDa (Figura 9B). Concomitantemente, el análisis de espectrometría de masas indicó que estos extractos poseían dos lipasas de masa molecular similar, pero con secuencias diferentes (Figura 11). Por lo tanto, es probable que ambas lipasas no se visualizaran a través de zimografía porque se superpusieron por tener una masa molecular similar. Las enzimas se denominaron Lip1 y Lip2 y sus secuencias se compararon con otras lipasas descritas y/o predichas en cepas de HEP. Lip1 comparte el mismo clado (Figura 13B) que la lipasa Bb11 descrita en *B. bassiana* bb11 (Gonçalves *et al.*, 2020). Lip2 se agrupó en el mismo clado que otras lipasas de HEP que se han predicho, pero aún no se han caracterizado (Figura 13B). La secuencia de Lip1 y Lip2 muestra un dominio LIP (pfam03583) que se encuentra en lipasas bacterianas que se expresan y secretan durante el ciclo de infección de estos patógenos (página NCBI *Conserved Domain Database*; Hube *et al.*, 2000) (Figura 11). Ambas enzimas presentaron el motivo GX SXG (donde X puede ser cualquier aminoácido) y la tríada catalítica Ser, Asn e His en sus secuencias: Ser<sup>226</sup>, Asp<sup>372</sup> e His<sup>404</sup> en Lip1 y Ser<sup>214</sup>, Asp<sup>399</sup> e His<sup>431</sup> en Lip2 (Figura 11). Según la literatura, las lipasas secretadas por la cepa RGM 2184 participarían en la hidrólisis de componentes del tegumento de los insectos (por ejemplo, enlaces éster de lipoproteínas, grasas y ceras; Butt *et al.*, 2016) y/o degradan el hemocele del insecto, que tiene una composición lipídica del 1,5%-5,5% p/v (Mondal *et al.*, 2016).

En el extracto A8, las quitinasas identificadas por espectrometría de masas se denominaron Chi1 (~71 kDa), Chi2 (~34 kDa) y Chi3 (~37 kDa). Por otra parte, en el extracto M2 se identificaron péptidos correspondientes a las exoenzimas Ch1 y Chi2. Sin embargo, no se pudo realizar la zimografía para detectarlas debido a problemas en el sustrato utilizado en la técnica. Chi2 mostró el dominio catalítico de la glicosil hidrolasa familia 18 (GH18), característico de las endo-beta-N-acetilglucosaminidasas (Figura 12B). Este tipo de enzima se ha caracterizado principalmente en bacterias (NCBI; Hube *et al.*, 2000) y predicho en *B. bassiana* ARSEF 2860 (XP008597133.1) y *Cordyceps militaris* CM01 (XP006673222.1). Las secuencias de Chi3

mostraron una alta identidad con Bbchit1, descrita en *B. bassiana* (Figura 13C). Ambas enzimas pertenecen a la quitinasa de la familia 18, y tienen dominios catalíticos y de unión a sustrato similares (SXGG y DXXDXDXE) (Figura 12B y C). Bbchit1 es una endoquitinasa que tiene una masa molecular de aproximadamente 33 kDa y un pI de 5,4 (Borgi y Gargouri, 2014). La sobreproducción de Bbchit1 aumentó la virulencia de *B. bassiana* contra los áfidos (Borgi y Gargouri, 2014).

A nivel general hay que considerar que no todas las enzimas predichas *in silico* son necesariamente detectadas por la técnica de zimografía o identificadas por LC-MS/MS. Esto puede deberse a que (i) los servidores utilizados (SignalP y Psort) tienden a sobreestimar la presencia de exoenzimas (Imai y Nakai, 2020); (ii) los genes anotados *in silico* de un genoma pueden perder su promotor o codón de inicio; (iii) las enzimas no degradan los sustratos del zimograma; (iv) dos enzimas pueden presentar masa molecular similar, incapaz de resolverse en una electroforesis de una dimensión, y (vi) la cantidad de proteína está bajo el límite de detección de la técnica LC-MS/MS.

Según los resultados reportados en la literatura ya mencionados, se establecen como posibles exoenzimas involucradas en la actividad entomopatógena de *B. pseudobassiana* RGM 2184 a P1, P2 y Chi2. Lo que no descarta la participación de las otras enzimas identificadas en el mecanismo patógeno del HEP, sin embargo, falta evidencia para sugerir su participación en el mecanismo de infección de RGM 2184.

#### **4.6. Los extractos proteicos denotan catalizar sustratos de proteasas, lipasas y quitinasas en un amplio rango de pH y temperatura.**

Se evaluó la actividad enzimática en los extractos M2 y A8 a distintas temperaturas y pH. Este barrido de condiciones permitió evaluar la actividad catalítica a bajas temperaturas de proteasas, lipasas y quitinasas presentes, y determinar las condiciones fisicoquímicas óptimas de sus actividades enzimáticas.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad de proteasas a distintas unidades de pH dan cuenta de que las proteasas (P1 y P2) presentes en el extracto son capaces de ejercer su catálisis en un amplio rango de pH (4,0 - 9,0) (Figura 14A). Por otra parte, se obtuvo una baja actividad en el extracto a temperaturas inferiores a los 20°C y un incremento significativo de la actividad a temperaturas superiores a 25°C (Figura 14B). La actividad remanente a 5°C puede deberse a la acción de proteasas adaptadas al frío de la cepa RGM 2184. Dado a que no están purificadas las proteasas, esta pequeña actividad residual puede explicarse porque que en el extracto M2 existiría una menor proporción de estas enzimas. Adicionalmente, las enzimas adaptadas el frío son específicas para su sustrato, debido a que se deben controlar las interacciones débiles entre el sustrato y el sitio activo, ya que el complejo enzima-sustrato debe tener una energía lo suficientemente alta para alcanzar la energía de activación (Santiago *et al.*, 2016). Por otra parte, no se puede descartar que alguna de estas enzimas no hidrolizara la azocaseína, generando una subestimación de la actividad del extracto a bajas temperaturas.

La actividad lipolítica del extracto M2 exhibió un amplio rango de pH. Registrándose dos *peaks* máximos de actividad catalítica, a pH 2 y pH 8 (Figura 15A). Estos resultados sugieren que las dos lipasas detectadas por espectrometría de masas corresponden a una lipasa ácida y básica. Dado a que la actividad promedio a pH 8 y pH 2 fueron las mayores y similares entre sí, se evaluó

el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática a ambos pHs. Se observó que a pH 8, la actividad catalítica aumentó desde los 15 a los 10°C. Este resultado sugiere que el extracto contiene una lipasa básica adaptada al frío, dado al incremento de actividad al disminuir la temperatura, característica de enzimas adaptadas al frío (Siddiqui y Cavicchioli, 2006; Santiago *et al.*, 2016). No se logró seguir la cinética a 5°C, debido al agotamiento de los reactivos. Los tiempos en los que se detectó liberación de p-nitrofenol, fueron insuficientes para calcular la actividad (Anexo 8.9A). Cabe señalar que las enzimas adaptadas al frío pueden presentar una temperatura óptima de actividad catalítica mayor a 15°C. La flexibilidad de las enzimas adaptadas al frío les permite actuar a temperaturas bajas y altas, inclusive a temperaturas superiores a los 70°C (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Son más lábiles que sus homólogas mesófilas, pero no significa que todas se denaturen a temperatura ambiente (Tabla 2). Señalado lo anterior, no se debe descartar que la actividad lipolítica a 10°C sea por la actividad residual de más de una lipasa, y no solo de una enzima que actúa a rangos acotados de temperaturas inferiores a 20°C. Este descubrimiento no tiene solo relevancia en la comprensión de la maquinaria enzimática que secreta la cepa RGM 2184, sino que tiene diversas aplicaciones biotecnológicas de interés industrial, tales como en la industria alimentaria, producción de detergentes y remediación de ambientes fríos. Las dos primeras aplicaciones, optimizan el uso de energía calórica con el empleo de lipasas adaptadas al frío, dado a que reemplazan ciertos procesos de catálisis química a altas temperaturas (Mhetras *et al.*, 2021).

**Tabla 2. Temperatura óptima de enzimas descritas como adaptadas al frío.**

Microorganismo	Actividad enzimática	T <sub>opt</sub> (% de actividad residual a una temperatura específica)	Referencia
<i>Psychrobacter sp.</i>	Lipasa	35° (30% a 5°)	Shuo-shuo <i>et al.</i> , 2011
<i>Sorangium cellulosum</i>	Lipasa	30° (35% a 0°)	Cheng <i>et al.</i> , 2011
<i>Shewanella frigidimarina</i>	Lipasa	25° (35% a 10°)	Parra <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhizomucor endophyticus</i>	Lipasa	40° (75% a 0°)	Yan <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas sp.</i>	Lipasa	20° (30% a 5°)	Tanaka <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas sp.</i>	Quitinasa	20° (50% a 0°)	Liu <i>et al.</i> , 2019
<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	Quitinasa	30° (35% a 0°)	Fu <i>et al.</i> , 2020
<i>Arthrobacter sp.</i>	Quitinasa	20° (50% a 0°)	Mavromatis <i>et al.</i> , 2003
<i>Geomyces sp.</i>	Quitinasa	25° (ND)	Ramli <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Proteasa	15° (20% a 5°)	Toyokawa <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudoalteromonas sp</i>	Proteasa	25° (ND)	Acevedo <i>et al.</i> , 2013
<i>Euphausia superba</i>	Serín proteasa	50° (ND)	Olivera-Nappa <i>et al.</i> , 2003
<i>Shewanella arctica</i>	Proteasa	60° (20% a 0°)	Kuddus <i>et al.</i> , 2008

ND: No determinado.

Contrario a los casos anteriores, las quitinasas presentes en el extracto A8 exhiben una mayor actividad a pHs bajos ( $\geq 2$  y  $\leq 5$ ) (Figura 16A). En *B. bassiana*, se ha caracterizado la actividad quitinolítica del extracto crudo de proteínas obtenido desde el sobrenadante del cultivo y de la quitinasa Bbchit1, donde en ambos casos se ha establecido una actividad máxima a pH 5 (Pinnamaneni *et al.*, 2011). Al igual que en *M. anisopliae*, donde una quitinasa fue caracterizada y su pH óptimo también fue de 5 unidades (Leger *et al.*, 1998). En ningún trabajo relacionado con la batería enzimática de HEP se ha identificado una quitinasa tan ácida que registre su *peak* de actividad a pH 3, como la encontrada en este estudio. Se ha reportado que, durante el proceso de penetración de la cutícula, los hongos entomopatógenos secretan ácido oxálico, el cual se ha establecido como un importante factor de virulencia (Kirkland *et al.*, 2005). Durante la penetración de la cutícula, este ácido secuestra cofactores metálicos y se estima que produce una inhibición o degradación de moléculas de defensa del insecto (Godoy *et al.*, 1990; Gadd, 1999; Cessna *et al.*, 2000; Jarosz-Wilkolazka y Gadd, 2003). En el trabajo de Moino *et al.* (2002), se reportaron cristales bipiramidales, posiblemente de oxalato doble de magnesio y amonio, incrustados en el tegumento del insecto infectado, cerca de la zona de penetración de los tubos germinales de dos cepas de HEP, *B. bassiana* 634 y *M. anisopliae* E-9. Lo que sugiere una alta concentración del ácido en las

perforaciones, produciendo la formación de los cristales. Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que la cepa RGM 2184 presenta una ventaja adaptativa para que la actividad quitinolítica se mantenga en presencia del ácido oxálico. Por otra parte, en el barrido a diferentes temperaturas, se pudo establecer que la actividad quitinolítica máxima se verifica cerca de los 45°C (Figura 12B). Sin embargo, a 5°C se registra una actividad enzimática 9 veces menor que a 45°C. Esto significa que la actividad residual a 5°C es cercana al 10%, por lo que podría considerarse que la actividad quitinolítica presenta una naturaleza adaptada al frío, similar a lo reportado en una B-galactosidasa con una actividad óptima a 90°C, la cual mantiene un 10% de su actividad a 5°C (Dong *et al.*, 2014). Así, la catálisis quitinolítica remanente registrada a 5°C podría estar siendo efectuada por una quitinasa adaptada al frío.

#### **4.7. La composición aminoacídica de las enzimas identificadas mediante LC-MS/MS, es similar a la de enzimas adaptadas al frío.**

Las enzimas adaptadas a bajas temperaturas deben ser lo suficientemente flexibles para no perder su actividad catalítica y alcanzar la energía de activación de la reacción (Siddiqui y Cavicchioli, 2006; Bathia *et al.*, 2021). Se ha demostrado que las proteínas adaptadas al frío poseen una serie de cambios en los aminoácidos que les confiere una mayor flexibilidad, incluyendo menos puentes salinos, un menor contenido de residuos de prolina, menos enlaces de hidrógeno, una menor proporción Arg/(Arg + Lys) y un mayor contenido de serina y glicina en comparación con las enzimas mesófilas y termófilas (Aghajari *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1998; Georlette *et al.*, 2000; Huston *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2008; Ræder *et al.*, 2008; Metpally y Reddy, 2009).

Se recopilaron desde la literatura las secuencias de enzimas de interés (serín proteasas, lipasas y quitinasas) adaptadas al frío, mesófilas y termófilas. El análisis estadístico de la composición de aminoácidos entre estos grupos indicó que las enzimas adaptadas al frío poseían más glicina y menos ácido glutámico, tirosina y serina que sus homólogas mesófilas y termófilas

(Figura 17; Anexo 8.15). El análisis comparativo de estas características en el gráfico de dispersión 3D, agrupó a las proteasas, lipasas y quitinasas de RGM 2184 cerca de las proteínas adaptadas al frío. Este es el primer análisis de composición aminoacídica realizado a enzimas de hongos de entomopatógenos, además de ser la primera aproximación en la búsqueda de enzimas adaptadas al frío en este tipo de microorganismos multicelulares. Por lo que, por primera vez se puede sugerir que un hongo entomopatógeno secreta una maquinaria enzimática adaptada a bajas temperaturas a partir de su estructura primaria.

Cabe señalar que la flexibilidad de las enzimas no depende solo de la estructura primaria, sino que también de la disposición tridimensional de la estructura terciaria/cuaternaria. Las enzimas adaptadas al frío, a diferencia de la estructura de sus homólogas mesófilas, presentan: (i) un menor número de puentes salinos intra o inter subunidades (Bhatia *et al.*, 2021); (ii) un empaquetamiento hidrofóbico cohesionado en el núcleo de la proteína (Aqvist *et al.*, 2017); (iii) bucles de superficie más largos y menos prolinas en dichos bucles (Michetti *et al.*, 2017); (iv) cargas superficiales adicionales (en su mayoría negativas: ácido aspártico y ácido glutámico) que mejoran las interacciones con el disolvente (Siddiqui y Cavicchioli, 2006); y (v) una mejor accesibilidad y flexibilidad del sitio activo. Por lo que el análisis de composición aminoacídica es solo una aproximación para definir que una enzima está adaptada al frío según su estructura.

Estos antecedentes acerca de la posible estructura de enzimas adaptadas al frío permiten sentar las bases para un próximo análisis del plegamiento de las exoenzimas de la cepa RGM 2184 a través de cristalografía de rayos X, para así verificar si presentan las características conformacionales que exhiben las enzimas adaptadas al frío.

#### **4.8. Los extractos demostraron ser activos en la degradación sobre pupas y seda de *L. botrana* a bajas temperaturas.**

El efecto hidrolítico del sobrenadante de un organismo entomopatógeno sobre cutícula se ha evaluado anteriormente mediante SEM (Phiri *et al.*, 2013; Montes *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2023). Sin embargo, primera vez que se aplica a sobrenadantes de hongos entomopatógenos. Las exoenzimas de la cepa RGM 2184 demostraron degradar el capullo y la cutícula de las pupas de *L. botrana* a 10 y 25°C (Figura 18 y 19). El tejido del capullo expuesto al extracto enzimático del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en M2, que contiene las proteasas P1 y P2, mostró notablemente menor compactación y densidad de tejido a 10°C y 25 °C, en comparación al control (Figura 18). Por otra parte, las pupas expuestas al extracto enzimático del sobrenadante del cultivo en M2, A8, y a la mezcla de ambos, denotaron una degradación de la superficie, perforaciones y ruptura cuticular, tanto a 10 como a 25°C de incubación, mientras que los tratamientos de control correspondientes no mostraron daños (Figura 19). Tanto para el capullo como la seda, los resultados obtenidos a la exposición de la mezcla de extractos M2 y A8, denotaron daños similares a los observados con la exposición a M2. Por lo que no se puede asegurar sinergia entre los extractos en cuanto al efecto hidrolítico en ambas matrices. Para el caso de la seda se podría esperar este resultado, dado su composición peptídica. Teóricamente, solo es sustrato para proteasas y no quitinasas, por lo que, en el caso de la mezcla, solo evaluamos la degradación por parte de las proteasas presentes en M2. Con respecto al capullo, se podría sugerir que no se observa sinergia, debido a que las quitinasas actúan posterior a las proteasas, en una liberación coordinada. Una vez que las proteasas actúan y exponen las fibras de quitina presente en la exocutícula, las quitinasas ejercen su efecto hidrolítico (Ferreira y Freitas, 2020). Dado a que la fuente de enzimas no es dirigida, ni controlada por el microorganismo entomopatógeno, si no que se encuentran en suspensión, se produce un daño deslocalizado. Se podría hipotetizar entonces que, en la cutícula expuesta a la mezcla, no se observa sinergia, porque las quitinasas y proteasas no logran ejercer una degradación localizada ni coordinada.

La degradación hidrolítica del capullo fibroso y cutícula de *L. botrana* catalizada a través de enzimas extracelulares de RGM 2184 incubadas a 10°C, fue consistente con la capacidad de la cepa de colonizar a *L. botrana* en la temporada otoño-invierno (Altimira *et al.*, 2021). Estos resultados junto con la capacidad de crecer a 4°C (datos no mostrados) sugieren que la cepa RGM 2184 secreta enzimas adaptadas al frío capaces de degradar las fibras proteicas de la seda y generar la disrupción de la cutícula de *L. botrana*. Lo que permite que RGM 2184 sea eficiente en ejercer su efecto insecticida durante la temporada otoño-invierno en pupas de la polilla cuarentenaria.

## 5. CONCLUSIONES.

El hongo *B. pseudobassiana* RGM 2184 secreta una batería de enzimas hidrolíticas que presentan actividad en un amplio rango de temperaturas y pHs. Estas enzimas son capaces de degradar matrices complejas de tejidos de insectos a bajas temperaturas, otorgándole al HEP una ventaja competitiva sobre otras estrategias de control, como los insecticidas químicos, que no pueden penetrar en el capullo de insectos.

## 6. PROYECCIONES.

1. Determinar específicamente cuál de las enzimas es responsable de la catálisis hidrolítica a bajas temperaturas. Para lo anterior sería necesario individualizar las actividades registradas en el extracto y purificar las distintas enzimas que contiene tanto el extracto M2 como el A8.
2. Complementario al análisis de composición aminoacídica, las enzimas identificadas y purificadas se podrían someter a cristalografía de rayos X para así dilucidar los motivos estructurales que le confiere la propiedad de adaptada al frío a las enzimas.
3. Sobreexpresar enzimas adaptadas al frío en la cepa *B. pseudobassiana* RGM 2184, con el fin de incrementar su eficacia sobre las pupas *Lobesia botrana* en otoño-invierno.
4. Desarrollar un producto comercial en base a RGM 2184 con HEP distantes filogenéticamente, aumentarían la eficacia y espectro de plagas objetivo.

## 7. REFERENCIAS

- ABBEY, L; ABBEY, J; LEKE-ALADEKOBA, A; EKENE, M; IJENYO, M. 2019. Biopesticides and Biofertilizers: Types, Production, Benefits, and Utilization. En: Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels. Estados Unidos: John Wiley & Sons Ltd, pp. 479-500.
- ACEVEDO, J.P.; RODRIGUEZ, V.; SAAVEDRA, M.; MUNOZ, M.; SALAZAR, O.; ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A. 2013. Cloning, expression and decoding of the cold adaptation of a new widely represented thermolabile subtilisin-like protease. *Journal of applied microbiology*, 114(2), 352-363.
- ADLER, D.; NENADIC, O.; ZUCCHINI, W. 2003. Rgl: A r-library for 3d visualization with opengl. En: Proceedings of the 35th symposium of the interface: computing science and statistics, 35. Estados Unidos: Curran Associates, Inc., pp. 1-11.
- AGHAJARI, N.; FELLER, G.; GERDAY, C.; HASER, R. 1998. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure*, 6(12), 1503-1516.
- ALDOSSARI, N.; ISHII, S. 2021. Isolation of cold-adapted nitrate-reducing fungi that have potential to increase nitrate removal in woodchip bioreactors. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 197-207.
- ALI, S.; REN, S.; HUANG Z. 2014. Extracellular lipase of an entomopathogenic fungus effecting larvae of a scale insect. *Journal of Basic Microbiology*, 54(11), 1148-1159.
- ALIAS, N.; MAZIAN, A.; SALLEH, A.B.; BASRI, M.; RAHMAN, R.N.Z.R.A. 2014. Molecular cloning and optimization for high level expression of cold-adapted serine protease from Antarctic yeast *Glaciozyma antarctica* PI12. *Enzymes Research*, e197938.
- ALTIMIRA, F. 2020. Microorganismos con actividad entomopatogena. En: Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides. Boletín INIA N° 419. Chile. pp. 34-50.
- ALTIMIRA, F., ARIAS-ARAVENA, M., JIAN, L., REAL, N., CORREA, P., GONZÁLEZ, C., GODOY, S., CASTRO, J.F.; ZAMORA, O.; VERGARA, C.; VITTA, N.; TAPIA, E. 2022. Genomic and experimental analysis of the insecticidal factors secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184. *Journal of Fungi*, 8(3), 253.
- ALTIMIRA, F; DE LA BARRA, N; REBUFEL, P; SOTO, S; SOTO, R; ESTAY, P; VITTA, N; TAPIA, E. 2019. Potential biological control of the pupal stage of the European grapevine moth *Lobesia botrana* by the entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* in the winter season in Chile. *BMC Res Notes* 12(1), 1-6.
- ALVES, E.A.; SCHMALTZ, S.; TRES, M.V.; ZABOT, G.L.; KUHN, R.C.; MAZUTTI, M.A. 2020. Process development to obtain a cocktail containing cell-wall degrading enzymes with insecticidal activity from *Beauveria bassiana*. *Biochemical Engineering Journal*, 156, e107484.
- AMLACHER, S.; SARGES, P.; FLEMMING, D.; VAN NOORT, V.; KUNZE, R.; DEVOS, D.P.; ARUMUGAM, M.; BORK, P.; HURT, E. 2011. Insight into structure and assembly of the nuclear pore complex by utilizing the genome of a eukaryotic thermophile. *Cell*, 146(2), 277-289.
- ANATIS BIOPROTECTION. 2018. BioCeres® WP bio-insecticide à base du champignon beauveria bassiana très efficace contre les ravageurs des cultures en serre et en champ. [en línea] < <https://anatisbioprotection.com/blog/bioceres-beauveria-bassiana.html>> [consulta: 12 marzo 2022].
- ANDERSON, I.; GÖKER, M.; NOLAN, M.; LUCAS, S.; HAMMON, N.; DESHPANDE, S.; CHENG, J.-F.; TAPIA, R.; HAN, C.; GOODWIN, L. 2011. Complete genome sequence of the hyperthermophilic hemolithoautotrophy *Pyrolobus fumarii* type strain (1AT). *Standards in Genomic Sciences*, 4(3), 381-392.
- ÅQVIST, J.; ISAKSEN, G.V.; BRANDSDAL, B.O. 2017. Computation of enzyme cold adaptation. *Nature Reviews Chemistry*, 1(7), 1-14.

- ARNORSDOTTIR, J.; SMÁRADÓTTIR, R.B.; MAGNUSSON, O.T.; THORBJARNARDÓTTIR, S.H.; EGGERTSSON, G.; KRISTJÁNSSON, M.M. 2002. Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5536–5546.
- ASOEX. 2022. Anuario Uva de Mesa 2022: "Pese a la contingencia, exportaciones de uvas de mesa chilenas tuvieron un 12% de aumento respecto al ejercicio anterior" [en línea] < <https://www.asoex.cl/component/content/article/25-noticias/1152-anuario-uva-de-mesa-2022-pese-a-la-contingencia-exportaciones-de-uvas-de-mesa-chilenas-tuvieron-un-12-de-aumento-respecto-al-ejercicio-anterior.htmls>.> [consulta: 20 Agosto 2022]
- ATOMI, H.; FUKUI, T.; KANAI, T.; MORIKAWA, M.; IMANAKA, T. 2004. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea*, 1(4), 263–267.
- BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S.; LEGER, R. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 324(1), 159-169.
- BALABANIDOU, V.; GRIGORAKI, L.; VONTAS, J. 2018. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current opinion in insect science*, 27, 68–74.
- BARON, N; RIGOBELLO, E; ZIED, D. 2019. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research* 79(2), 307-315.
- BENDT, A.; HÜLLER, H.; KAMMEL, U.; HELMKE, E.; SCHWEDER, T. 2001. Cloning, expression, and characterization of a chitinase gene from the *Antarctic psychrotolerant* bacterium *Vibrio* sp. strain Fi: 7. *Extremophiles*, 5, 119–126.
- BENDTSEN, J; NIELSE, H; HEIJNE, G; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340(4), 783-795.
- BENJAMINI, Y.; KRIEGER, A.M.; YEKUTIELI, D. 2006. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika*, 93(3), 491-507.
- BERESTETSKIY, A; IVANOVA, A; PETROVA, M; PROKOF'EVA, D; STEPANYCHEVA, E; USPANOV, A; LEDNEV, G. 2018. Comparative analysis of the biological activity and chromatographic profiles of the extracts of *Beauveria bassiana* and *B. pseudobassiana* cultures grown on different nutrient substrates. *Microbiology*, 87(2), 200-214.
- BHATIA, R.K.; ULLAH, S.; HOQUE, M.Z.; AHMAD, I.; YANG, Y.H.; BHATT, A.K.; BHATIA, S.K. 2021. Psychrophiles: a source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), e104607.
- BREUSCH, T.S.; PAGAN, A.R. 1979. A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. *Econometrica: Journal of the econometric society*, 47(5), 1287-1294.
- BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A.M. 2008. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Fungal Biology Reviews*, 22(3-4), 120–130.
- BRUNNER-MENDOZA, C.; REYES-MONTES, M.D.R.; MOONJELY, S.; BIDOCHKA, M.J.; TORIELLO, C. (2019). A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 29(1), 83–102.
- BUTT, T; COATES, C; DUBOVSKIY, I; RATCLIFFE, N. 2016. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host–Pathogen Interactions. En: *Advances in Genetics*, 94(1). Estados Unidos: Elsevier, pp. 1-58.
- CANCHIGNIA, H; ALTIMIRA, F; MONTES, C; SANCHÉZ, E; TAPIA, E; MICCONO, M; ESPINOZA, D; AGUIRRE, C; SEEGER, M; PRIETO, H. 2017. Candidate nematocidal proteins in a new *Pseudomonas veronii* isolate identified by its antagonistic properties against *Xiphinema index*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 63(1), 11-21.
- CARRAZCOSA, J.F.M.; LUPAN, A.; COSAR, C.; KUN, A.Z.; SILAGHI-DUMITRESCU, R. 2015. On the roles of the alanine and serine in the  $\beta$ -sheet structure of fibroin. *Biophysical Chemistry*, 197, 10-17.

- CASTELLANOS-MOGUEL, J; CRUZ-CAMARILLO, R; ARANDA, E; MIER, T; TORIELLO, C. 2008. Relationship between protease and chitinase activity and the virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Mexicana de micología* 28(1), 71-80.
- CAVAZZINI, D.; GROSSI, G.; LEVATI, E.; VALLESE, F.; MONTANINI, B.; BOLCHI, A.; ZANOTTI, G.; OTTONELLO, S. 2017. A family of archaea-like carboxylesterases preferentially expressed in the symbiotic phase of the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Scientific Reports*, 7, 7628.
- CESSNA, S.G.; SEARS, V.E.; DICKMAN, M.B.; LOW, P.S. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell*, 12(11), 2191-2199.
- CHENG, Y.Y.; QIAN, Y.K.; LI, Z.F.; WU, Z.H.; LIU, H.; LI, Y. Z. 2011. A novel cold-adapted lipase from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2: gene cloning, expression, and enzymatic characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 12(10), 6765–6780.
- CHEONG, P.C.H.; GLARE, T.R.; ROSTÁS, M.; HAINES, S.; BROOKES, J.J.; FORD, S. 2020. Lack of involvement of chitinase in direct toxicity of *Beauveria bassiana* cultures to the aphid *Myzus persicae*. *Journal of invertebrate pathology*, 169, e107276.
- CHILLI, W.O.N.; ASSAM, I. 2015. Molecular characterizations of microbial antagonists and development of bioformulations for management of bacterial. *The Journal of Experimental Biology*, (3)2.
- CHOI, N.; CHOI, J.; KIM, B.; HAN, Y.; KIM, J.; LEE, S.; SONG, J. 2009. Mixed-substrate (glycerol tributyrates and fibrin) zymography for simultaneous detection of lipolytic and proteolytic enzymes on a single gel. *Electrophoresis* 30(12), 2234-2237.
- COELHO, D.F.; SATURNINO, T.P.; FERNANDES, F.F.; MAZZOLA, P.G.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E.B. 2016. Azocasein substrate for determination of proteolytic activity: Reexamining a traditional method using bromelain samples. *BioMed Research International*, 2016, 8409183.
- COLLINS, T.; ROULLING, F.; PIETTE, F.; MARX, J.C.; FELLER, G.; GERDAY, C.; D'AMICO, S. 2008. Fundamentals of cold-adapted enzymes. En: *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer: Berlin, pp. 211-227.
- CRUZ-AVALOS, A; BIVIÁN-HERNÁNDEZ, M; IBARRA, J; DEL RINCÓN-CASTRO, M. 2018. High virulence of Mexican entomopathogenic fungi against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology* 112(1), 99-107.
- DASSARMA, S.; CAPES, M.D.; KARAN, R.; DASSARMA, P. 2013. Amino acid substitutions in cold-adapted proteins from *Haloerubrum lacusprofundi*, an extremely halophilic microbe from Antarctica. *PLoS One*, 8(3), e58587.
- DGAC. 2021. Temperatura Media Climatológica. [en línea] <<https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/anual/temperaturaMediaAnual/360011/2020>> [consulta: 18 abril 2020].
- DHAR, P.; KAUR, G. 2010. Cuticle-degrading proteases produced by *Metarhizium anisopliae* and their induction in different media. *Indian Journal of Microbiology*, 50(4), 449-455.
- DONATTI, A; FURLANETO-MAIA, L; FUNGARO, M; FURLANETO, M. 2008. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. *Current Microbiology* 56(1), 256-260.
- DONG, Q.; YAN, X.; ZHENG, M.; YANG, Z. 2014. Characterization of an extremely thermostable but cold-adaptive beta-galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* for use as a recombinant aggregation for batch lactose degradation at high temperature. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 706–710.
- DUFOUR, J. M., FARHAT, A., GARDIOL, L., & KHALAF, L. 1998. Simulation-based finite sample normality tests in linear regressions. *The Econometrics Journal*, 1(1), 154-173.

- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, 5(1), 1-19.
- ESPARZA, M.A.M.; CONTEIRO, A.M.C.; FRAGA, M.E. 2017. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84.
- FAN, Y.; PEI, X.; GUO, S.; ZHANG, Y.; LUO, Z.; LIAO, X.; PEI, Y. 2010. Increased virulence using engineered protease-chitin binding domain hybrid expressed in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbial pathogenesis*, 49(6), 376-380.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 363-370.
- FANG, W.; FENG, J.; FAN, Y.; ZHANG, Y.; BIDOCHKA, M.; LEGER, R.; PEI, Y. 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 155-159.
- FEDIC, R.; ZUROVEC, M.; SEHNAL, F. 2002. The silk of Lepidoptera. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture*, 71(1), 1-15.
- FIROUZBAKHT, H.; ZIBAEI, A.; HODA, H.; MEHDI, M. 2015. Purification and characterization of the cuticle-degrading proteases produced by an isolate of *Beauveria bassiana* using the cuticle of the predatory bug, *Andrallus spinidens Fabricius* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Plant Protection Research* 55(2), 179-186.
- FLORCZAK, T.; DAROCH, M.; WILKINSON, M.C.; BIAŁKOWSKA, A.; BATES, A.D.; TURKIEWICZ, M.; IWANEJKO, L.A. 2013. Purification, characterization and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of LipG7 an enantioselective, cold-adapted lipase from the Antarctic filamentous fungus *Geomyces sp. P7* with unusual thermostability characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(1), 18-24.
- FOX, J.; WEISBERG, S.; ADLER, D.; BATES, D.; BAUD-BOVY, G.; ELLISON, S.; MONETTE, G. 2012. Package 'car'. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 16.
- FU, X.; GUO, Y.; JIN, Y.; MA, M. 2020. Bioconversion of chitin waste using a cold-adapted chitinase to produce chitin oligosaccharides. *LWT*, 133, 109863.
- GADD, G.M.; BURFORD, E.P.; FOMINA, M. 2003. Biogeochemical activities of microorganisms in mineral transformations: Consequences for metal and nutrient mobility. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(3), 323-331.
- GAO, B.; MOU, Y.; TONG, S.; YING, S.; FENG, M. 2020. Subtilisin-like Pr1 proteases marking the evolution of pathogenicity in a wide-spectrum insect-pathogenic fungus. *Virulence* 11(1), 365-380.
- GAO, Y.L.; ZHANG, M.L.; WANG, X.; ZHANG, H.D.; HUANG, J.Z.; LI, L. 2021. Isolation and characterization of a new cytotoxic polyketide amino acid hybrid from *Thermothelomyces thermophilus* ATCC 42464. *Natural Product Research*, 35(11), 1792-1798.
- GAUR, A.C.; SADASIVAM, K.V.; MATHUR, R.S.; MAGU, S.P. 1982. Role of mesophilic fungi in composting. *Agricultural Wastes*, 4(6), 453-460.
- GAVIRIA, D.; MENDEZ, C.; CENOBIA, L. 2015. Uso de biomateriales a partir de la fibroína de la seda de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) Para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos. *Revista Médica Risaralda* 21(1), 38-47.
- GEORLETTE, D.; JONSSON, Z.O.; VAN PETEGEM, F.; CHESSA, J.P.; VAN BEEUMEN, J.; HÜBSCHER, U.; GERDAY, C. 2000. A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures. *European journal of biochemistry*, 267(12), 3502-3512.
- GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and molecular plant pathology*, 37(3), 179-191.

- GU, C.X.; ZHANG, B.L.; BAI, W.W.; LIU, J.; ZHOU, W.; LING, Z.Q.; LU, Y.; XU, L.; WAN, Y.J. 2020. Characterization of the endothiapsin-like protein in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its virulence effect on the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169, 107277.
- HATTING, J; WRAIGHT, S; RAY, M. 2010. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) for control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on resistant wheat under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14(5), 459-473.
- HO, M; WANG, H; LAU, K. 2012. Effect of degumming time on silkworm silk fibre for biodegradable polymer composites. *Applied Surface Science*, 258(8), 3948-3955.
- HOLDER, D. J.; KEYHANI, N. O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5260–5266.
- HUANG, J; VALLUZZI, R; BINI, E; VERNAGLIA, B; KAPLAN, D. 2003. Cloning, expression, and assembly of sericin-like protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 46117-46123.
- HUANG, Z.; HAO, Y.; GAO, T.; HUANG, Y.; REN, S.; KEYHANI, N.O. 2016. The Ifchit1 chitinase gene acts as a critical virulence factor in the insect pathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5491–5503.
- HUSTON, A.L.; METHE, B.; DEMING, J.W. 2004. Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine psychrophile *Colwellia psychrerythraea* strain 34H. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3321-3328.
- ITAYA, M.; TSUGE, K.; KOIZUMI, M.; FUJITA, K. (2005). Combining two genomes in one cell: Stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(44), 15971–15976.
- IZRAEL-ZIVKOVIC, L; GOJGIC-CVIJOVIC, G; GOPCEVIC, K; VRVIC, M; KARADZIC, I. 2009. Enzymatic characterization of 30 kDa lipase from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Journal of Basic Microbiology*, 49(5), 452-462.
- JAISWAL, A.; PREET, M.; TRIPTI, B. (2017). Production and optimization of lipase enzyme from mesophiles and thermophiles. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 9(3), 126–131.
- JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; GADD, G.M. 2003. Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere*, 52(3), 541-547.
- JU, J.; HU, N.; CAIRNS, D.M.; LIU, H.; TIMKO, B.P. 2020. Photo-cross-linkable, insulating silk fibroin for bioelectronics with enhanced cell affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(27), 15482-15489.
- KIM, J; ROH, J; CHOI, J; WANG, Y; SHIM, H; JE, Y. 2010. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biology* 114(1), 120-128.
- KIM, R. J.; SUH, M. C. 2016. The GxSxG motif of *Arabidopsis* monoacylglycerol lipase (MAGL6 and MAGL8) is essential for their enzyme activities. *Applied Biological Chemistry*, 59, 833-840.
- KIRKLAND, B. H.; EISA, A.; KEYHANI, N. O. 2005. Oxalic acid as a fungal acaricidal virulence factor. *Journal of medical entomology*, 42(3), 346-351.
- KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. 2008. A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization. *The Journal of general and applied microbiology*, 54(6), 385-392.
- KUMAR, M.; THAKUR, V.; RAGHAVA, G.P. 2008. COPid: composition based protein identification. *In silico biology*, 8(2), 121–128.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

- LAEMMLI, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LARIBI-HABCHI, H; DZIRIL, M; BADIS, A; MOUHOU, S; MAMERI, N. 2014. Purification and characterization of a highly thermostable chitinase from the stomach of the red scorpionfish *Scorpaena scrofa* with bioinsecticidal activity toward Cowpea Weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(9), 1733-1740.
- LEAHY, J; MENDELSON, M; KOUGH, J; JONES, R; BERCKES, N. 2014. Biopesticide Oversight and Registration at the U.S. Environmental Protection Agency. En: ACS Symposium Series. Estados Unidos: American Chemical Society, pp. 3-18.
- LEGER, S; BIDOCHKA, M; ROBERTS, D. 1994. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 314(2), 392-398.
- LEGER, S; JOSHI, L; BIDOCHKA, M; RIZZO, N; ROBERTS, D. 1996. Biochemical Characterization and Ultrastructural Localization of Two Extracellular Trypsins Produced by *Metarhizium anisopliae* in Infected Insect Cuticles. *Applied and environmental Microbiology*, 62(4), 1257-1264
- LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 709-713.
- LEPLAT, J.; FRANÇOIS, A.; BOUSTA, F. 2020. *Parengyodontium album*, a frequently reported fungal species in the cultural heritage environment. *Fungal Biology Reviews*, 34(3), 126-135.
- LI, A.N.; XIE, C.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; LI, D.C. 2011. Cloning, expression, and characterization of serine protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. *Journal of Microbiology*, 49(1), 121-129.
- LI, L.L.; TAGHAVI, S.; IZQUIERDO, J.A.; VAN DER LELIE, D. 2012. Complete genome sequence of *Clostridium* sp. strain BNL1100, a cellulolytic mesophile isolated from corn stover. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6982-6983.
- LITANTRA, R.; LOBIONDA, S.; YIM, J.H.; KIM, H.K. 2013. Expression and biochemical characterization of cold-adapted lipases from Antarctic *Bacillus pumilus* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1221-1228.
- LIU, K.; DING, H.; YU, Y.; CHEN, B. 2019. A Cold-Adapted Chitinase-Producing Bacterium from Antarctica and Its Potential in Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi. *Marine drugs*, 17(12), 695.
- LOHSE, R.; JAKOBS-SCHÖNWANDT, D.; PATEL, A.V. 2014. Screening of liquid media and fermentation of an endophytic *Beauveria bassiana* strain in a bioreactor. *AMB Express*, 4, 47.
- LOVERA, A.; BELAICH, M.; VILLAMIZAR, L.; PATARROYO, M.A.; BARRERA, G. 2020. Enhanced virulence of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* using a soluble recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity. *Biological control*, 144, 104211.
- LUO, Y.; ZHENG, Y.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. 2006. A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(2), 349-355.
- MAVROMATIS, K.; FELLER, G.; KOKKINIDIS, M.; BOURIOTIS, V. 2003. Cold adaptation of a psychrophilic chitinase: a mutagenesis study. *Protein engineering*, 16(7), 497-503.
- MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J.A. 2000 Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), pp. 105-109.
- MCMULLAN, G.; CHRISTIE, J.M.; RAHMAN, T.J.; BANAT, I.M.; TERNAN, N.G.; MARCHANT, R. 2004. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochemical Society Transactions*, 32, 214-217.

- METPALLY, R.P.R.; REDDY, B.V.B. 2009. Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC genomics*, 10(1), 1-10.
- MHETRAS, N.; MAPARE, V.; GOKHALE, D. 2021. Cold active lipases: biocatalytic tools for greener technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(7), 2245-2266.
- MICHETTI, D.; BRANDSDAL, B.O.; BON, D.; ISAKSEN, G.V.; TIBERTI, M.; PAPALEO, E. 2017. A comparative study of cold-and warm-adapted Endonucleases A using sequence analyses and molecular dynamics simulations. *PloS one*, 12(2), e0169586.
- MIRANDA-CALIXTO, A.E.; CALDERÓN-EZQUERRO, C.; DEL ROCÍO REYES-MONTES, M.; CASTELLANOS-MOGUEL, J. 2022. Comparison of total chitinase production in *Lecanicillium lecanii*. A study between Mexican native and ARSEF strains. *Latin American Journal of Development*, 4(3), 1231-1242.
- MOINO, A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; NEVES, P.M.O.J.; PEREIRA, R.M.; VIEIRA, S.A. 2002. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia agricola*, 59, 267-273.
- MONDAL, S; BAKSI, S; KORIS, A; VATAI. 2016. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering* 18(2), 85-99.
- MONTES, C.; ALTIMIRA, F.; CANCHIGNIA, H.; CASTRO, Á.; SÁNCHEZ, E.; MICCONO, M.; TAPIA, E.; SEQUEIDA, A.; VALDÉS, J.; TAPIA, P.; GONZÁLEZ, C.; PRIETO, H. 2016. A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), 1-10.
- MOON, J. H.; AJUNA, H. B.; WON, S. J.; CHOUB, V.; CHOI, S. I.; YUN, J. Y.; HWANG, W. J.; PARK, S. W.; AHN, Y. S. 2023. Entomopathogenic Potential of *Bacillus velezensis* CE 100 for the Biological Control of Termite Damage in Wooden Architectural Buildings of Korean Cultural Heritage. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8189.
- MUKHERJEE, K; VILCINSKAS, A. 2017. The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection. *Virulence* 9(1), 402-413.
- MUROI, F.; TACHIBANA, Y.; SOULENTHONE, P.; YAMAMOTO, K.; MIZUNO, T.; SAKURAI, T.; KOBAYASHI, Y.; KASUYA, K.I. (2017). Characterization of a poly (butylene adipate-co-terephthalate) hydrolase from the aerobic mesophilic bacterium *Bacillus pumilus*. *Polymer Degradation and Stability*, 137, 11–22.
- MUSTAFHA, S.M.; KAMARUDDIN, S.; MAHADI, N.M.; MURAD, A.M.A.; ABU BAKAR, F.D. 2018. Gene isolation and prediction of the corresponding three-dimensional structure of subtilisin from the psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(6), 452–461.
- NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. 2002. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 345–352.
- OLIVERA-NAPPA, A.; REYES, F.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. 2013. Cold adaptation, Ca<sup>2+</sup> dependency and autolytic stability are related features in a highly active cold-adapted trypsin resistant to autoproteolysis engineered for biotechnological applications. *PloS one*, 8(8), e72355.
- ORTIZ-URQUIZA, A; KEYHANI, N. 2013. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects* 4(3), 357-374.
- OSHIMA, T.; IMAHORI, K. (1974). Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(1), 102–112.
- PANOFF, J.M.; CORROLER, D.; THAMMAVONGS, B.; BOUTIBONNES, P. (1997). Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4451–4454.

- PARRA, L.P.; ESPINA, G.; DEVIA, J.; SALAZAR, O.; ANDREWS, B.; ASENJO, J.A. 2015. Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: expression of a cold-active lipase with high specific activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 68, 56–61.
- PHIRI, A. M.; DE POMERAI, D.; BUTTLE, D. J.; BEHNKE, J. M. B. 2014. Developing a rapid throughput screen for detection of nematocidal activity of plant cysteine proteinases: the role of *Caenorhabditis elegans* cystatins. *Parasitology*, 141(2), 164-180.
- PINNAMANENI, R.; KALIDAS, P.; SAMBASIVA RAO, K.R.S. 2011. Studies on the cloning and expression of Bbchit1 gene of *Beauveria bassiana* NCIM 1216. *Indian journal of microbiology*, 51(3), 396-402.
- PRINCE, G; CHANDLER, D. 2020. Susceptibility of *Myzus persicae*, *Brevicoryne brassicae* and *Nasonovia ribisnigri* to Fungal. *Insects*, 11(1), 55.
- QUESADA-MORAGA, E.; GARRIDO-JURADO, I.; YOUSEF-YOUSEF, M.; GONZÁLEZ-MAS, N. 2022. Multitrophic interactions of entomopathogenic fungi in BioControl. *BioControl*, 67, 457-472.
- RÆDER, I.L.U.; LEIROS, I.; WILLASSEN, N.P.; SMALÅS, A.O.; MOE, E. 2008. Uracil-DNA N-glycosylase (UNG) from the marine, psychrophilic bacterium *Vibrio salmonicida* shows cold adapted features: A comparative analysis to *Vibrio cholerae* uracil-DNA N-glycosylase. *Enzyme and microbial technology*, 42(7), 594-600.
- RAMLI, A.N.; MAHADI, N.M.; RABU, A.; MURAD, A.M.; BAKAR, F.D.; ILLIAS, R.M. 2011. Molecular cloning, expression and biochemical characterization of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma antarctica* PI12. *Microbial cell factories*, 10(1), 1-13.
- ROSAS-GARCÍA, N; ÁVALOS-DE-LEÓN, O; VILLEGAS-MENDOZA, J; MIRELES-MARTÍNEZ, M; BARBOZA-CORONA, J; CASTAÑEDA-RAMÍREZ, J. 2014. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 1495-1502.
- RUSSELL, R.J.; GERIKE, U.; DANSON, M.J.; HOUGH, D.W.; TAYLOR, G.L. 1998. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure*, 6(3), 351-361.
- SAFAVI, S. 2011. Successive subculturing alters spore-bound Pr1 activity, germination and virulence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 21(8), 883-891.
- SAG. 2021a. Lobesia botrana o polilla del racimo de la vid. [en línea] <<https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/lobesia-botrana-o-polilla-del-racimo-de-la-vid>> [consulta: 12 marzo 2021].
- SAG. 2021b. Listado de predios de vid de mesa ubicados dentro del área reglamentada por *Lobesia botrana*. Temporada 2020-2021. [en línea] < <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/lobesia-botrana-o-polilla-del-racimo-de-la-vid/1429/registros>> [consulta: 15 abril 2021].
- SAG. 2022. Lista de plaguicidas con autorización vigente. [en línea] <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/plaguicidas-y-fertilizantes/78/registros> [consulta: 27 de agosto 2022].
- SAHL, J; CAPORASO, J; RASKO, D; KEIM, P. 2014. The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. *PeerJ*, 2(1), e322.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- SAMUELS, R. I.; SANTOS, A. V.; SILVA, C. P. 2011. *Enzymology of entomopathogenic fungi*. Microbial insecticides-principles and applications. Nova Science Publishers, Inc, p. 71-92.
- SÁNCHEZ-BAYO, F. 2012. Ecological impacts of insecticides. En: *Insecticides—advances in integrated pest management*. Gran Bretaña: InTechOpen, pp. 61-90.
- SANCHÉZ-PÉREZ, L; BARRANCO-FLORIDO, J; RODRÍGUEZ-NAVARRO, S; CERVANTES-MAYAGOITIA, J; RAMOS-LÓPEZ, M. 2014. Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. *Advances in Enzyme Research*, 2(2), 65-76.

- SANTI, L; BEYS, W; BERGER, M; GUIMARAES, J; SCHRANK, A; VAINSTEIN, M. 2010. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4), 874-880.
- SANTIBÁÑEZ, Q. F. 2017. Atlas agroclimático de Chile. Estado actual y tendencias del clima. Tomo III: Regiones de Valparaíso, Metropolitana, O'Higgins y Maule. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas: FIA.
- SCOPES, R. K. 1993. Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media. 85p.
- SECADES, P; GUIJARRO, J. 1999. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3969-3975.
- SEMENOVA, T; DUNAEVSKY, Y; BELJAKOVA, G; BELOZERSKY, M. 2020. Extracellular peptidases of insect-associated fungi and their possible use in biological control programs and as pathogenicity markers. *Fungal biology*, 124(1), 65-72.
- SHAH, F; WANG, C; BUTT, T. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 259-266.
- SHUO-SHUO, C.; XUE-ZHENG, L.; JI-HONG, S. 2011. Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948. *Protein Expression and Purification* 77(2), 166–172.
- SIDDIQUI, K.S.; CAVICCHIOLI, R. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annual review of biochemistry*, 75, 403–433.
- SINGH, D.; RAINA, T.K.; SINGH, J. 2017. Entomopathogenic fungi: An effective biocontrol agent for management of insect populations naturally. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(6), 833.
- SINGH, V.; SINGH, M.P.; VERMA, V.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, R., SINGH, A.K. 2016. Characteristics of cold adapted enzyme and its comparison with mesophilic and thermophilic counterpart. *Molecular and Cellular Biology*, 62(3), 1000144.
- SUPAKDAMRONGKUL, P; BHUMIRATANA, A; WIWAT, C. 2010. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(4), 228-235.
- TAKII, Y.; IKEDA, K.; SATO, C.; YANO, M.; SATO, T.; KONNO, H. 2005. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Rhizopus oryzae* MIBA348. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5(1), 11–16.
- TANAKA, D.; YONEDA, S.; YAMASHIRO, Y.; SAKATOKU, A.; KAYASHIMA, T.; YAMAKAWA, K. 2012. Characterization of a new cold-adapted lipase from *Pseudomonas* sp. TK-3. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 168(2), 327–338
- TAPIA, E. 2020. Plaguicidas microbianos en base a hongos entomopatógenos: una alternativa para el manejo integrado de *Lobesia botrana*. En: Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides. Boletín INIA N° 419. Chile. pp. 21-33.
- TECHTMANN, S.M.; FITZGERALD, K.S.; STELLING, S.C.; JOYNER, D.C.; UTTUKAR, S.M.; HARRIS, A.P.; ALSHIBLI, N.K.; BROWN, S.D.; HAZEN, T.C. 2016. *Colwellia psychrerythraea* strains from distant deep sea basins show adaptation to local conditions. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 33.
- TOYOKAWA, Y.; TAKAHARA, H.; REUNGSANG, A.; FUKUTA, M.; HACHIMINE, Y.; TACHIBANA, S.; YASUDA, M. 2010. Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1867-1875.
- UMARU, F.F.; SIMARANI, K. 2022. Efficacy of Entomopathogenic Fungal Formulations against *Elasmolomus pallens* (Dallas) (Hemiptera: Rhyparochromidae) and Their Extracellular Enzymatic Activities. *Toxins*, 14(9), 584.

- VENO, J.; AHMAD, A.N.H.; MOHAMAD, A.M.S.; MASOMIAN, M.; ABD, R.; RAHMAN, R.N.Z. (2017). Directed evolution of recombinant C-terminal truncated *Staphylococcus epidermidis* lipase AT2 for the enhancement of thermostability. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2202.
- VICI, A.C.; da CRUZ, A.F.; FACCHINI, F.D.A.; de CARVALHO, C.C.; PEREIRA, M.G.; FONSECA-MALDONADO, R.; WARD, R.J.; PESSELA, B.C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; TORRES, F.A.G. 2015. *Beauveria bassiana* Lipase A expressed in *Komagataella (Pichia) pastoris* with potential for biodiesel catalysis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1083.
- VIDHATE, R.P.; DAWKAR, V.V.; PUNEKAR, S.A.; GIRI, A.P. 2022. Genomic Determinants of Entomopathogenic Fungi and Their Involvement in Pathogenesis. *Microbial ecology*, 85, 49-60.
- VITTA, N. 2020a. Antecedentes biológicos de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller)(Lepidoptera, Tortricidae) En: Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides. *Boletín INIA N° 419*. Chile. pp. 7-20.
- VITTA, N. 2020b. Control biológico sobre *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) En: Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides. *Boletín INIA N° 419*. Chile. pp. 21-33.
- WANG, C; LEGER, R. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic cell* 6(5), 808-816.
- WANG, X.; ZHAO, Y.; TAN, H.; CHI, N.; ZHANG, Q.; DU, Y.; YIN, H. 2014. Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 455–462.
- WANG, Y.; TANG, D.X.; DUAN, D.E.; WANG, Y.B.; YU, H. 2020. Morphology, molecular characterization, and virulence of *Beauveria pseudobassiana* isolated from different hosts. *Journal of invertebrate pathology*, 172, 107333.
- WATANABE, T.; KOBORI, K.; MIYASHITA, K.; FUJII, T.; SAKAI, H.; UCHIDA, M.; TANAKA, H. 1993. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18567–18572.
- WU, X.; TIAN, Z.; JIANG, X.; ZHANG, Q.; WANG, L. 2018. Enhancement in catalytic activity of *Aspergillus niger* XynB by selective site-directed mutagenesis of active site amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 249–260.
- XIAO, X.; WANG, P.; ZENG, X.; BARTLETT, D.H.; WANG, F. 2007. *Shewanella psychrophila* sp. nov. and *Shewanella piezotolerans* sp. nov., isolated from west Pacific deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 60–65.
- XU, P.; NI, Z.F.; ZONG, M.H.; OU, X.Y.; YANG, J.G.; LOU, W.Y. 2020. Improving the thermostability and activity of *Paenibacillus pasadenensis* chitinase through semi-rational design. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 9–15.
- YAN, Q.; DUAN, X.; LIU, Y.; JIANG, Z.; YANG, S. 2016. Expression and characterization of a novel 1,3-regioselective cold-adapted lipase from *Rhizomucor endophyticus* suitable for biodiesel synthesis. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 86.
- YU, N; WAGNER, J; LAIRD, M; MELLI, G; REY, S; LO, R; DAO, P; CENK, S; ESTER, M; FOSTER, L; BRINKMAN, F. 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13), 1608-1615.
- ZAREVÚCKA, M. 2012. Olive oil as inductor of microbial lipase. En: Olive oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. Gran breña: InTechOpen, 457-471.
- ZHANG, L; FASOYIN, O; MOLNAR, I; XU, Y. 2020. Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: novel bioactive compounds. *Royal Society of Chemistry*, 37(9), 1181-1206.

- ZHANG, S; WIDEMANN, E; BERNARD, G; LESOT, A; PINOT, F; PEDRINI, N; KEYHANI, N. 2012. CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 13477-13486.
- ZHANG, Y; XINGZHONG, L; WANG, M. 2008. Cloning, expression, and characterization of two novel cuticle-degrading serine proteases from the entomopathogenic fungus *Cordyceps sinensis*. *Research in Microbiology*, 159(6), 462-469.
- ZHOU, Q.; YU, L.; YING, S.H; FENG, M.G. 2021. Comparative roles of three adhesin genes (*adh1-3*) in insect-pathogenic lifecycle of *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105(13), 5491–5502.
- ZVERLOV, V.V.; FUCHS, K.P.; SCHWARZ, W.H. 2002. Chi18A, the endochitinase in the cellulosome of the thermophilic, cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 3176–3179.

## 8. ANEXOS

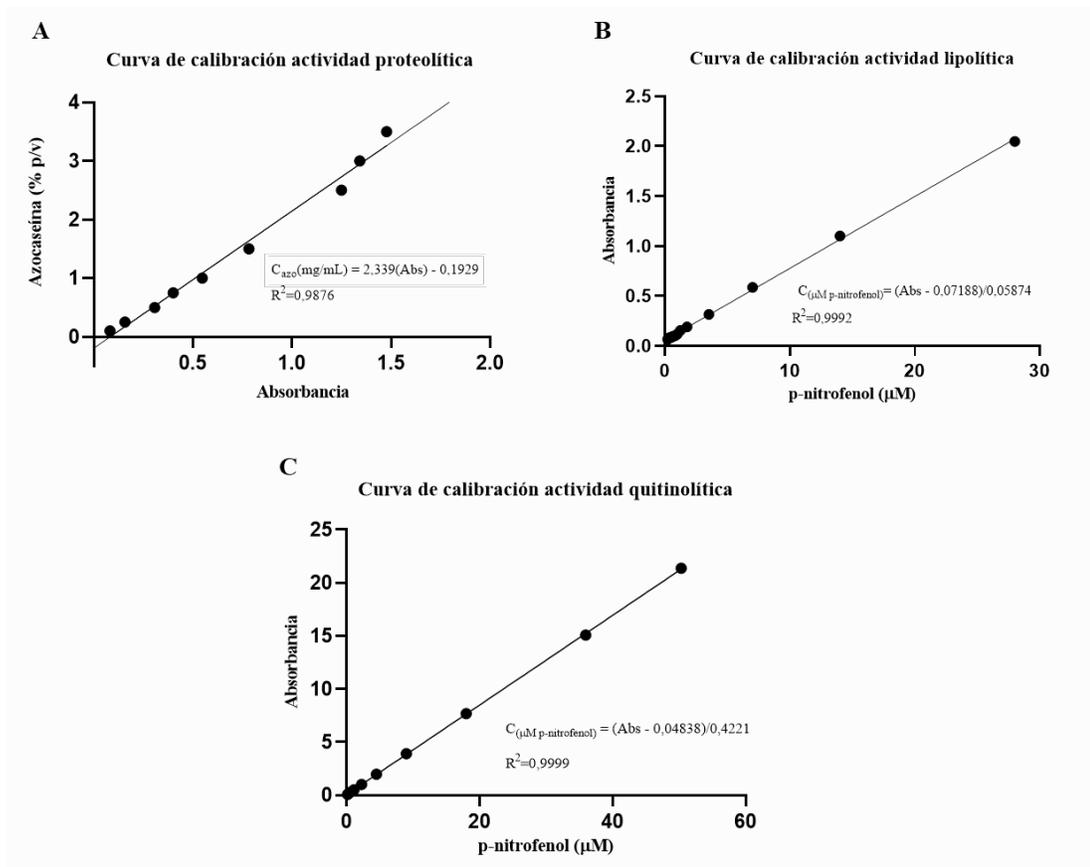
### 8.1. Proteasas, lipasas y quitinasas extracelulares predichas en el genoma de *B. pseudobassiana* RGM 2184.

Actividad	Dominio catalítico		Masa molecular (kDa)
	Superfamilia	Familia	
Aspartato proteasa	Pepsina retropepsina	Tipo pepsina	42.1
Carboxipeptidasa	Zinc peptidasa	Indeterminada	83.8
Carboxipeptidasa	Peptidasa M14	M14 CP tipo A-B	43.9
Carboxipeptidasa	Peptidasa S10	Indeterminada	27.7
Carboxipeptidasa	Peptidasa S10	Indeterminada	53.0
Carboxipeptidasa		Indeterminada	10.5
Carboxipeptidasa	Peptidasa S10	Indeterminada	44.4
Carboxipeptidasa	Peptidasa S10	Indeterminada	49.4
Carboxipeptidasa	Peptidasa S10	Indeterminada	47.4
Endopeptidasa	NLPC P60	Indeterminada	11.4
Metaloproteasa	ZnMc	Indeterminada	24.0
Metaloproteasa	M35	Indeterminada	33.1
Metaloproteasa	ZnMc	Indeterminada	8.3
Metaloproteasa	Metal dependiente	Indeterminada	42.9
Metaloproteasa	ZnMc	Indeterminada	74.6
Metaloproteasa	ZnMc	ZnMc tipo pappalisina	33.3
Metaloproteasa	ZnMc	ZnMc tipo pappalisina	30.6
Metaloproteasa	Indeterminada	Indeterminada	46.3
Metaloproteasa	Tipo Zinc peptidasa	Indeterminada	35.8
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Indeterminada	14.8
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S8 PCSK9 tipo-ProteinasK	39.9
Serín proteasa	Pro-peptidasa S53	Indeterminada	9.6
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S8 PCSK9 tipo-ProteinasK	40.3
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Indeterminada	37.1
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Indeterminada	49.6
Serín proteasa	Abhidrolasa	Indeterminada	55.7
Serín proteasa	Abhidrolasa	Indeterminada	50.5
Serín proteasa	Peptidasa S24 S26	Indeterminada	18.5
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Indeterminada	15.5
Serín proteasa	Abhidrolasa	Indeterminada	18.4
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Indeterminada	22.4
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S53	53.4
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Indeterminada	81.4
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S53	55.5
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S8 PCSK9 tipo-ProteinasK	33.5
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S8 PCSK9 tipo-ProteinasK	47.5
Serín proteasa	Abhidrolasa	Indeterminada	39.3
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S53	68.4
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S8 PCSK9 tipo-ProteinasK	34.8
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S53	47.7
Serín proteasa	Creatinasa N	Indeterminada	12.6
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S53	58.0
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S8 5	71.8
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Peptidasas S8	92.6
Serín proteasa	Peptidasas S8 S53	Indeterminada	90.7
Acetil esterasa	Aes	Aes	42.1
Carboxilestera	Abhidrolasa	Indeterminada	50.7
Carboxilestera	Abhidrolasa	Lipase 3	35.5
Ceramidasa	Abhidrolasa	Ceramidase alk	84.4
Ceramidasa	Abhidrolasa	Ceramidase alk	104.4
Lipasa	Indeterminada	Indeterminada	52.0
Lipasa	Abhidrolasa	Indeterminada	44.3
Lipasa	Abhidrolasa	Indeterminada	53.6
Lipasa	Abhidrolasa	Indeterminada	62.0
Lipasa	Abhidrolasa	CVT17	31.0
Lipasa	Indeterminada	Indeterminada	58.3
Serín esterasa	Abhidrolasa	Indeterminada	47.3
Serín esterasa	Abhidrolasa	DUF676	30.9
Endoquitinasa	tipo quitinasa GH18	Indeterminada	23.1
Endoquitinasa	Glicosil hidrolasa 18	Glicosil hidrolasa 18	34.0
Exoquitinasa	NAGidase	NAGidase	45.1

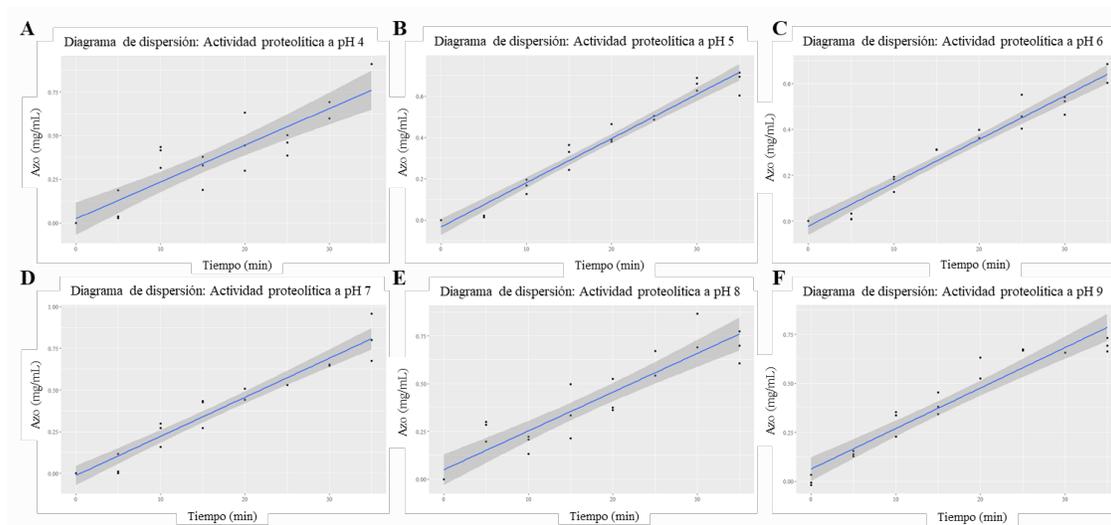
**8.2. Genomas de hongos entomopatógenos utilizados para *Blast score ratio* y porcentaje de genes presentes en cada HEP.** Se indican los niveles taxonómicos orden y familia de cada una de las cepas de HEP. Adicionalmente se indica el porcentaje de enzimas homólogas que presentan con respecto a las 116 enzimas extracelulares predichas en el genoma de *B. pseudobassiana* RGM 2184. Las cepas indicadas con un superíndice “R”, son de referencia.

Cepa HEP	Orden	Familia	Secuencias homólogas (%)
<i>Beauveria pseudobassiana</i> KACC 47484	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	98,2
<i>Beauveria brongniartii</i> RCEF 3172	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	94,7
<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 2860	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	93,0
<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 1520	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	93,0
<i>Akanthomyces lecanii</i> RCEF 1005 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	64,9
<i>Cordyceps javanica</i> IJ1G	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	60,5
<i>Cordyceps javanica</i> IJ2G <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	60,5
<i>Cordyceps militaris</i> CM01 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	54,4
<i>Akanthomyces lecanii</i> UM487	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	37,7
<i>Cordyceps fumosorosea</i> ARSEF 2679 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	52,6
<i>Lecanicillium psalliotae</i> HWLR35	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	42,1
<i>Ophiocordyceps polyrhachis-furcata</i> BCC 54312 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	14,3
<i>Tolypocladium paradoxum</i> NRBC 100945 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	0,0
<i>Purpureocillium lilacinum</i> PLFJ-1 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	0,0
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	1,8
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 549	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,9
<i>Metarhizium anisopliae</i> BRIP 53293	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,9
<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 3297 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,9
<i>Metarhizium album</i> ARSEF 1941 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,0
<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 2575	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,0
<i>M. roberstii</i> ARSEF 23 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,0
<i>Moelleriella libera</i> RCEF 2490 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,0
<i>Metarhizium rileyi</i> RCEF 4871	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,0
<i>Metarhizium rileyi</i> Cep018-CH2 <sup>R</sup>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	0,0
<i>Sporothrix insectorum</i> RCEF 264 <sup>R</sup>	<i>Ophiostomatales</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	0,0
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 118543	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	0,0
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 <sup>R</sup>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	0,0

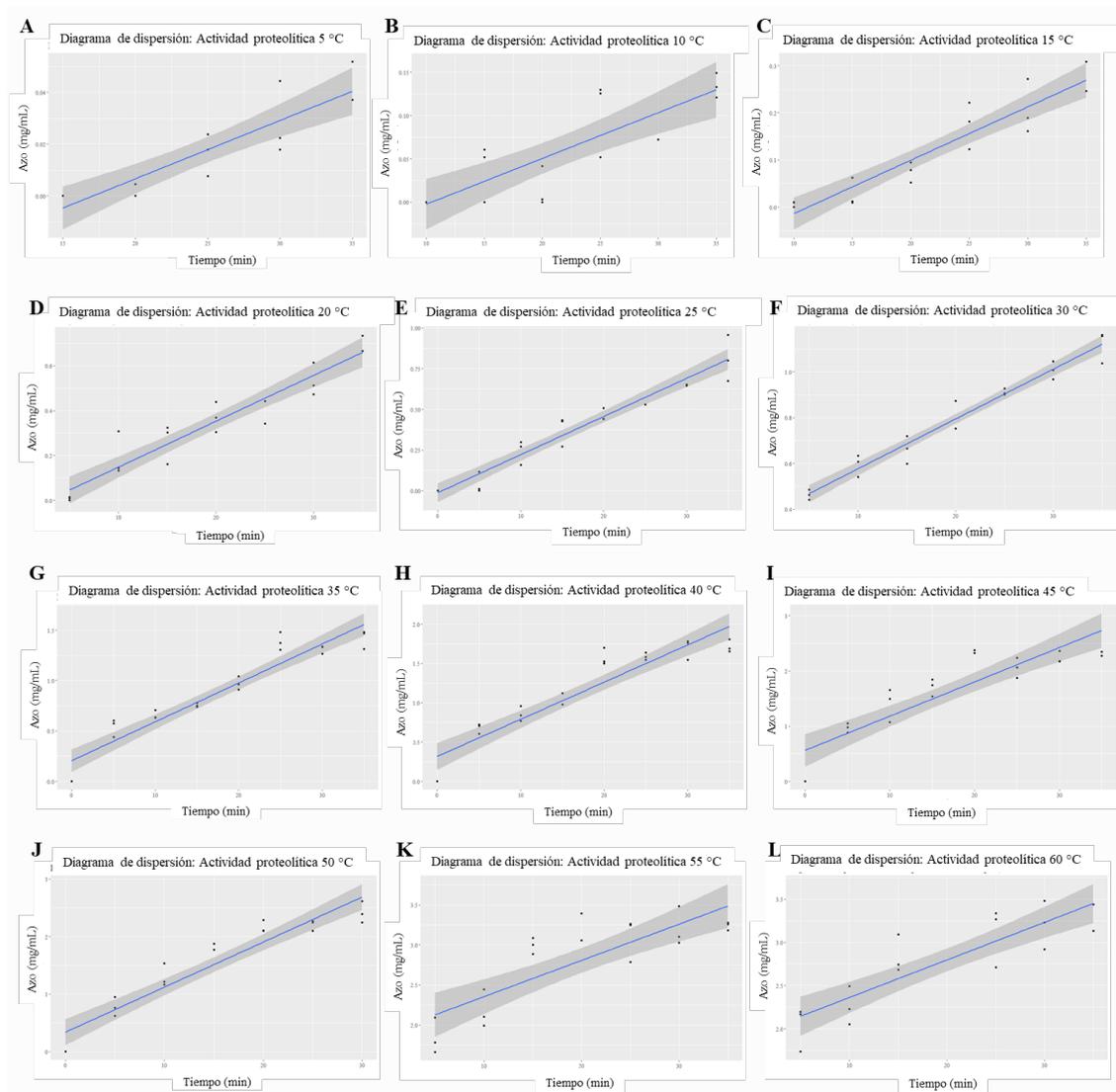
**8.3. Curvas de calibración.** (A) Curva de calibración para determinación de actividad proteolítica. (B) Curva de calibración para determinación de actividad lipolítica. (C) Curva de calibración para determinar actividad quitinolítica. En cada curva se indica la ecuación para la conversión de unidades de absorbancias y el R2 de la regresión lineal.



**8.4. Gráficos de cinética proteolítica a los diferentes pHs.** (A) Cinética a pH 4. (B) Cinética a pH 5. (C) Cinética a pH 6. (D) Cinética a pH 7. (E) Cinética a pH 8. (F) Cinética a pH 9. En cada uno de los gráficos se la regresión lineal (recta de color celeste), además de los intervalos de confianza del 95% (áreas grises oscuras). Todos los ensayos se realizaron a 25°C.



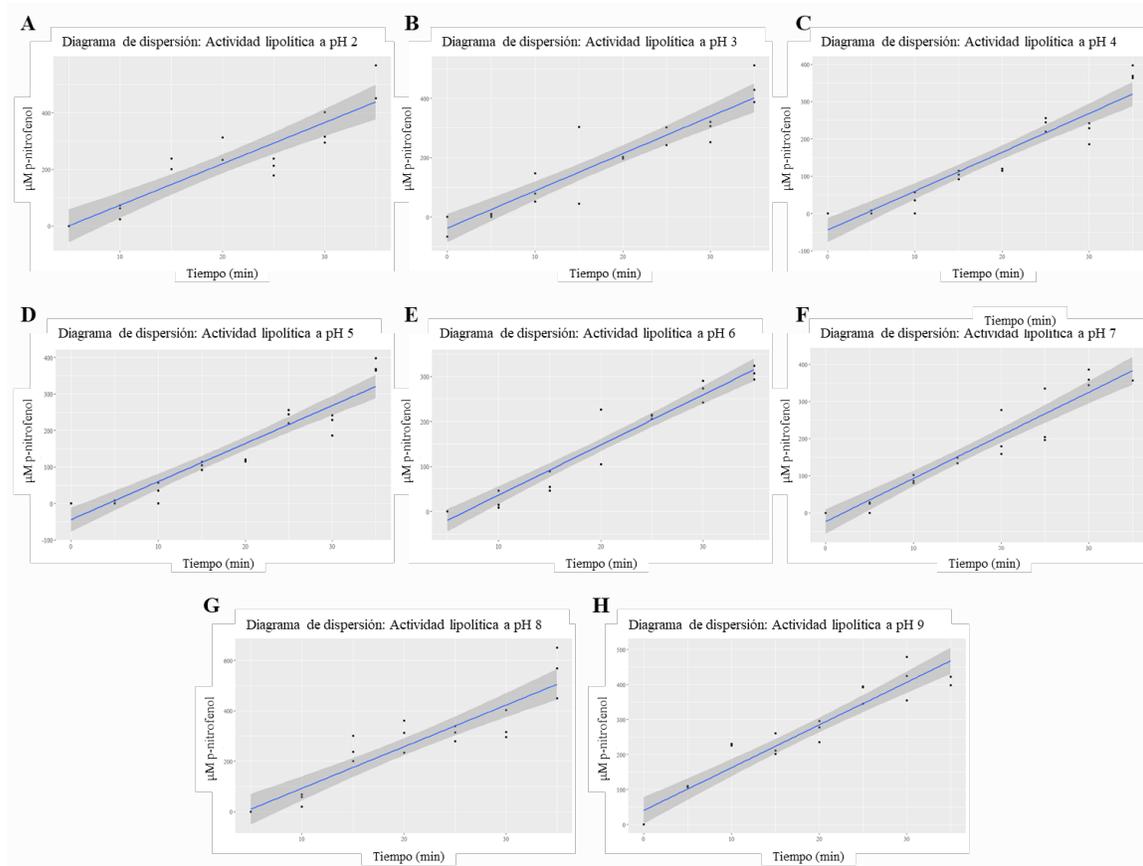
**8.5. Gráficos de cinética proteolítica a diferentes temperaturas a pH 7.** (A) Cinética a 5°C. (B) Cinética a 10°C. (C) Cinética a 15°C. (D) Cinética a 20°C. (E) Cinética a 25°C. (F) Cinética a 30°C. (G) Cinética a 35°C. (H) Cinética a 40°C. (I) Cinética a 45°C. (J) Cinética a 50°C. (K) Cinética a 55°C. (L) Cinética a 60°C. En cada uno de los gráficos se grafica la regresión lineal (recta de color celeste), además de los intervalos de confianza del 95% (áreas grises oscuras). Todos los ensayos se realizaron a pH 7.



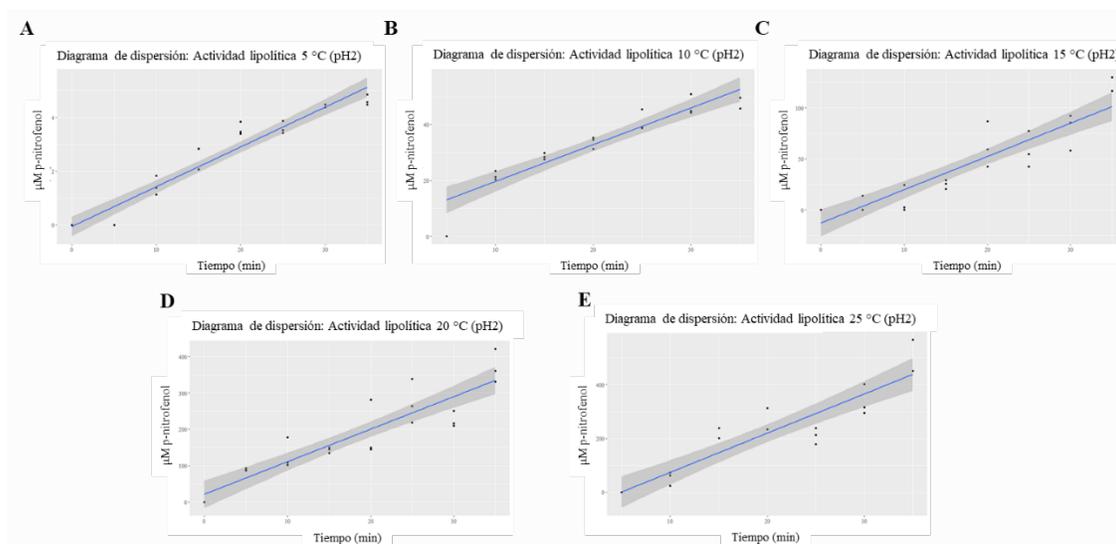
**8.6. Actividad proteolítica de extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2.** Se indica el pH y temperatura a la cual se obtuvo cada uno de los valores. Se expresa la actividad junto al error estándar.

T° (°C)	pH	Actividad (Azo [ $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$ ])	Intervalo de confianza (95%)	
			Límite inferior	Límite superior
25	4	21,02 $\pm$ 2,40	16,00	26,04
25	5	21,38 $\pm$ 0,90	19,50	23,25
25	6	18,91 $\pm$ 0,90	17,03	20,50
25	8	20,30 $\pm$ 1,90	16,32	24,29
25	9	20,68 $\pm$ 1,47	17,59	23,77
60	7	43,44 $\pm$ 5,77	31,20	55,67
55	7	45,22 $\pm$ 7,18	30,14	60,30
50	7	78,37 $\pm$ 5,94	65,90	90,85
45	7	62,09 $\pm$ 7,04	47,45	76,73
40	7	47,24 $\pm$ 3,87	39,20	55,28
35	7	38,59 $\pm$ 2,60	33,19	43,98
30	7	21,75 $\pm$ 0,99	19,67	23,82
25	7	23,45 $\pm$ 1,39	20,53	26,36
20	7	20,43 $\pm$ 1,68	16,90	23,97
15	7	11,31 $\pm$ 1,11	8,94	13,69
10	7	5,29 $\pm$ 0,94	3,2	7,3
5	7	2,25 $\pm$ 0,33	1,53	2,97

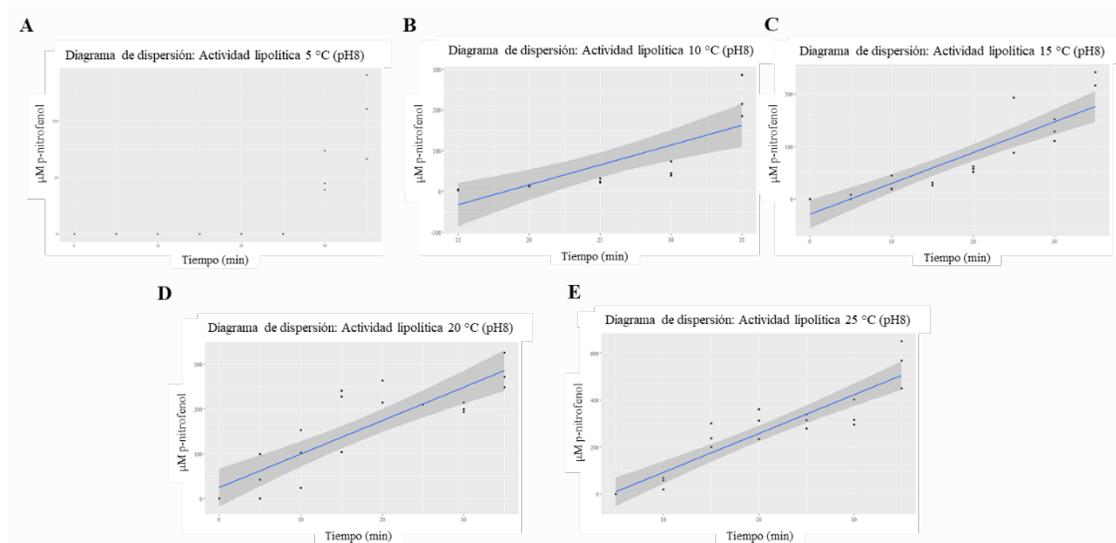
**8.7. Gráficos de cinética lipolítica a los diferentes pHs.** (A) Cinética a pH 2. (B) Cinética a pH 3. (C) Cinética a pH 4. (D) Cinética a pH 5. (E) Cinética a pH 6. (F) Cinética a pH 7. (G) Cinética a pH 8. (H) Cinética a pH 9. En cada uno de los gráficos se indica la regresión lineal (recta color celeste), además de los intervalos de confianza del 95% (áreas grises oscuras). Todos los experimentos se realizaron a 25°C.



**8.8. Gráficos de Cinética lipolítica a diferentes temperaturas a pH 2 constante.** (A) Cinética a 5°C. (B) Cinética a 10°C. (C) Cinética a 15°C. (D) Cinética a 20°C. (E) Cinética a 25°C. En cada uno de los gráficos se indica la regresión lineal (recta color celeste), además de los intervalos de confianza del 95% (áreas grises oscuras). Todos los experimentos se realizaron a pH 2 constante.



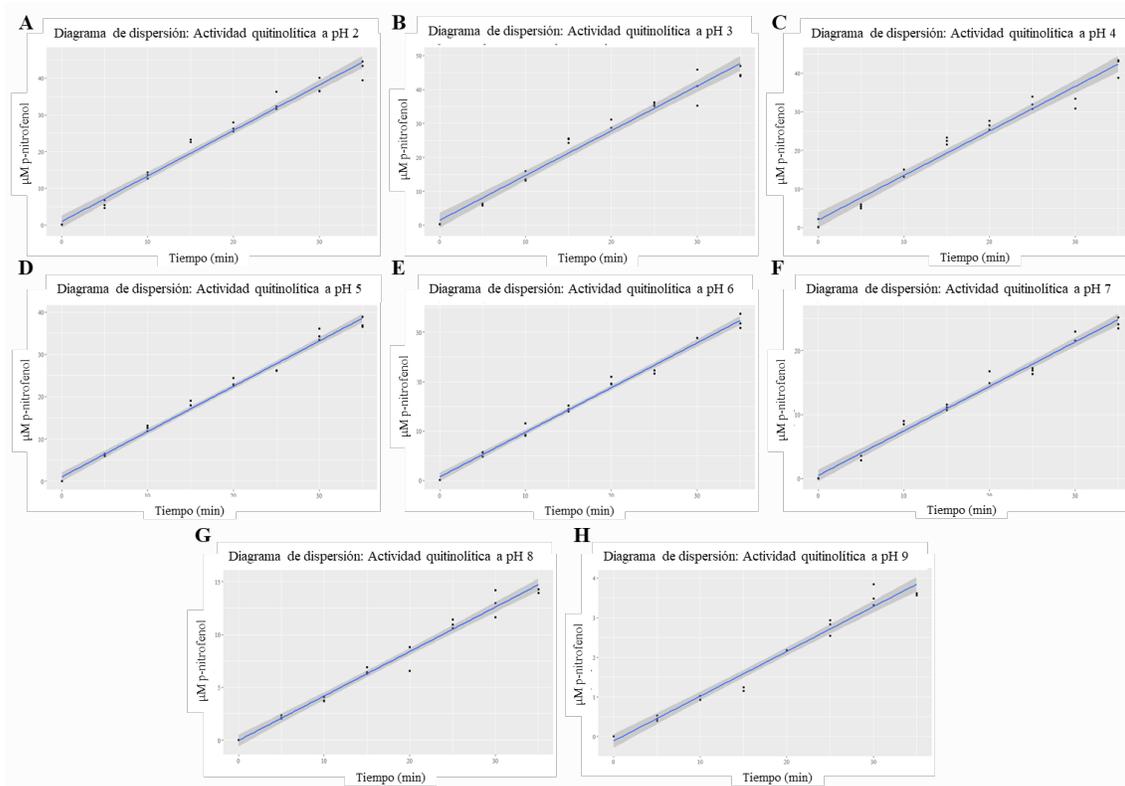
**8.9. Gráficos de Cinética lipolítica a diferentes temperaturas a pH 8 constante.** (A) Cinética a 5°C. (B) Cinética a 10°C. (C) Cinética a 15°C. (D) Cinética a 20°C. (E) Cinética a 25°C. En cada uno de los gráficos se indica la regresión lineal (recta color celeste), además de los intervalos de confianza del 95% (áreas grises oscuras). Todos los experimentos se realizaron a pH 8 constante.



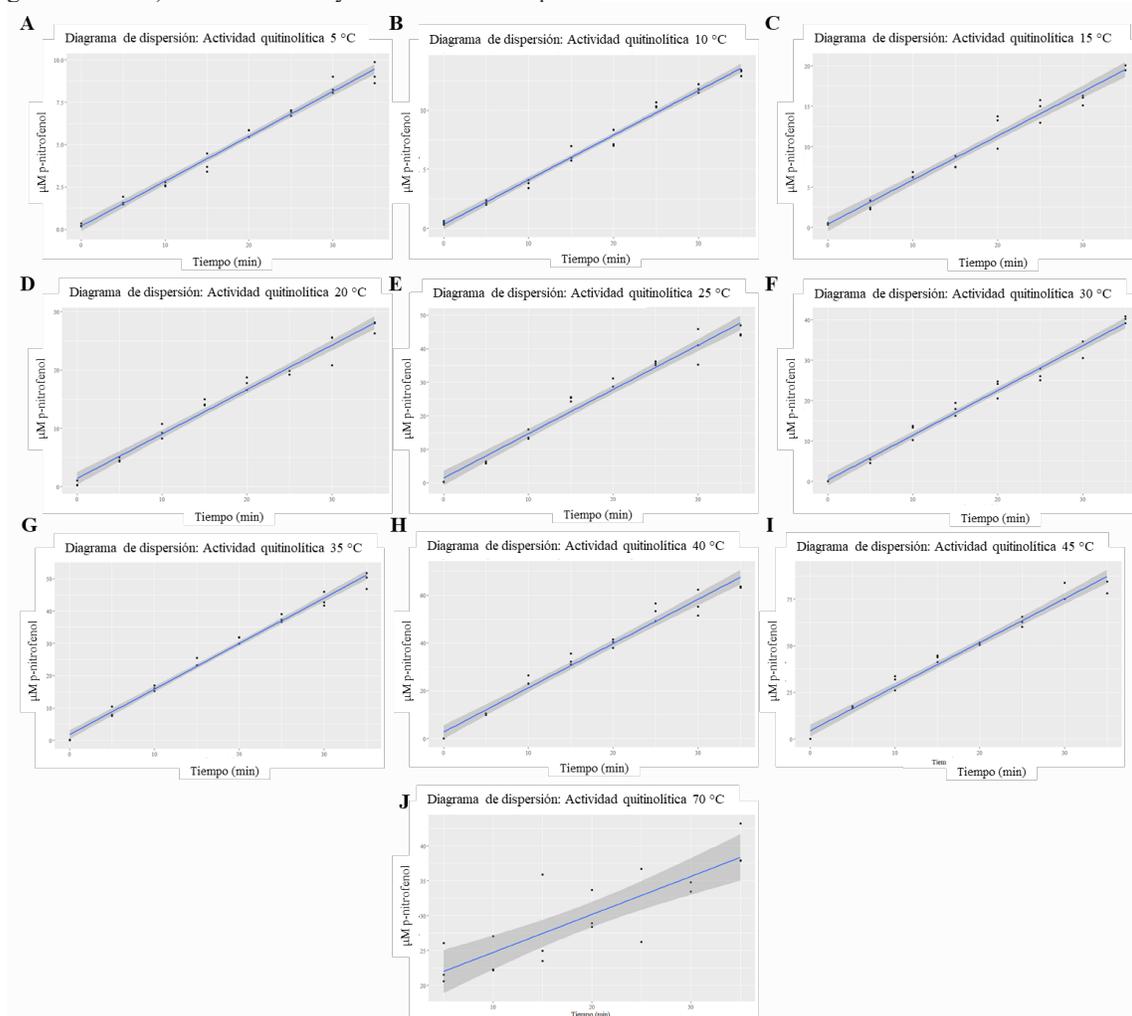
**8.10. Actividad lipolítica de extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio M2.** Se indica el pH y temperatura a la cual se obtuvo cada uno de los valores. Se expresa la actividad junto al error estándar.

T° (°C)	pH	Actividad ( $\mu\text{M p-nitrofenol/min}$ )	Intervalo de confianza (95%)	
			Límite inferior	Límite superior
25	3	$12,55 \pm 1,08$	10,29	14,81
25	4	$10,41 \pm 0,74$	8,87	11,96
25	5	$13,76 \pm 0,79$	12,10	15,41
25	6	$11,16 \pm 0,65$	9,79	12,52
25	7	$11,60 \pm 0,81$	9,90	13,13
25	9	$12,20 \pm 0,87$	10,38	14,03
25	2	$14,59 \pm 1,55$	13,05	16,55
20	2	$8,94 \pm 0,86$	7,14	10,73
15	2	$3,25 \pm 0,31$	2,60	3,90
10	2	$1,32 \pm 0,12$	1,06	1,57
5	2	$0,15 \pm 0,008$	0,11	0,16
25	8	$16,50 \pm 1,61$	13,34	19,86
20	8	$7,44 \pm 0,98$	5,39	9,50
15	8	$5,86 \pm 0,65$	4,50	7,21
10	8	$9,75 \pm 2,01$	5,41	14,08
5	8	ND	-	-

**8.11. Gráficos de cinética quitinolítica a los diferentes pHs.** (A) Cinética a pH 2. (B) Cinética a pH 3. (C) Cinética a pH 4. (D) Cinética a pH 5. (E) Cinética a pH 6. (F) Cinética a pH 7. (G) Cinética a pH 8. (H) Cinética a pH 9. En cada uno de los gráficos se indica la regresión lineal (recta color celeste), además de los intervalos de confianza del 95% (áreas grises oscuras). Todos los experimentos se realizaron a 25°C.



**8.12. Gráficos de cinética quitinolítica a diferentes temperaturas a pH 3.** (A) Cinética a 5°C. (B) Cinética a 10°C. (C) Cinética a 15°C. (D) Cinética a 20°C. (E) Cinética a 25°C. (F) Cinética a 30°C. (G) Cinética a 35°C. (H) Cinética a 40°C. (I) Cinética a 45°C. (J) Cinética a 70°C. En cada uno de los gráficos se visualiza la regresión lineal (recta de color celeste), además de los intervalos de confianza del 95% (áreas grises oscuras). Todos los ensayos se realizaron a pH 3.



**8.13. Actividad quitinolítica de extracto proteico obtenido del sobrenadante del cultivo de RGM 2184 en medio A8.** Se indica el pH y temperatura a la cual se obtuvo cada uno de los valores. Se expresa la actividad junto al error estándar.

T° (°C)	pH	Actividad ( $\mu\text{M}$ p-nitrofenol/min)	Intervalo de confianza (95%)	
			Límite inferior	Límite superior
25	2	1,23 $\pm$ 0,04	1,16	1,32
25	4	1,15 $\pm$ 0,05	1,05	1,25
25	5	1,07 $\pm$ 0,02	1,02	1,12
25	6	0,93 $\pm$ 0,02	0,86	0,95
25	7	0,69 $\pm$ 0,02	0,65	0,74
25	8	0,42 $\pm$ 0,01	0,39	0,44
25	9	0,11 $\pm$ 0,004	0,10	0,12
70	3	0,54 $\pm$ 0,08	0,36	0,72
45	3	2,36 $\pm$ 0,08	2,20	2,52
40	3	1,83 $\pm$ 0,06	1,69	1,96
35	3	1,41 $\pm$ 0,03	1,34	1,47
30	3	1,11 $\pm$ 0,03	1,04	1,17
25	3	1,32 $\pm$ 0,05	1,27	1,37
20	3	0,76 $\pm$ 0,02	0,71	0,81
15	3	0,54 $\pm$ 0,02	0,50	0,59
10	3	0,38 $\pm$ 0,009	0,36	0,40
5	3	0,26 $\pm$ 0,007	0,25	0,28

## 8.14. Listado de enzimas utilizadas para análisis de composición aminoacídica

Actividad	Reino	Cepa	Número de acceso NCBI	Referencia
Adaptada al frío	Serín proteasa	<i>Glaciozyma antarctica</i> P112	AYC49704.1 <sup>G</sup>	Mustafha <i>et al.</i> , 2018
		<i>Linnemannia hyalina</i> SCG-10	KAG9065897.1 <sup>G</sup>	Aldossari <i>et al.</i> , 2021
		<i>Glaciozyma antarctica</i> P112	CAQ76821.1 <sup>G</sup>	Alias <i>et al.</i> , 2014
	Bacteria	<i>Vibrio</i> sp. PA-44	AAO16017.1 <sup>G</sup>	Amorsdottir <i>et al.</i> , 2002
		<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	WP_020914201 <sup>R</sup>	Xiao <i>et al.</i> , 2007
		<i>Cobwellia psychrerythraea</i> 34H	WP_011043668.1 <sup>R</sup>	Techtmann <i>et al.</i> , 2016
	Lipasa	<i>Onygenales</i> sp. P7	ADY17230.1 <sup>G</sup>	Florczak <i>et al.</i> , 2013
		<i>Emericella nidulans</i> NFCCI 3643	EAA64964.1 <sup>G</sup>	Mayordomo <i>et al.</i> , 2000
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> B68	AAU10321.1 <sup>G</sup>	Luo <i>et al.</i> , 2006
	Quitinasa	<i>Bacillus pumilus</i> I 16A	WP_065098612.1 <sup>R</sup>	Litantra <i>et al.</i> , 2013
<i>Glaciozyma antarctica</i> P112		AEH16745.1 <sup>G</sup>	Ramli <i>et al.</i> , 2011	
<i>Linnemannia hyalina</i> SCG-10		KAG9072959.1 <sup>G</sup>	Aldossari <i>et al.</i> , 2021	
<i>Vibrio</i> sp. Fi:7		AAG12973.1 <sup>G</sup>	Bendt <i>et al.</i> , 2001	
	Bacteria	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. DL-6	QBJ64793.1 <sup>G</sup>	Wang <i>et al.</i> , 2014
Mesofílica	Serín proteasa	<i>Pareryodontium album</i>	IIC6 <sup>P</sup>	Leplat <i>et al.</i> , 2020
		<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102	XP_007814452.1 <sup>R</sup>	Brunner-Mendoza <i>et al.</i> , 2019
		<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 23	XP_011411569.1 <sup>R</sup>	Brunner-Mendoza <i>et al.</i> , 2019
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tu 3298	CAA44257.1 <sup>G</sup>	Veno <i>et al.</i> , 2017
		<i>Enterococcus faecalis</i> MMH594	AAK67268.1 <sup>G</sup>	Panoff <i>et al.</i> , 1997
	Lipasa	<i>Clostridium</i> sp. BNL1100	AEY65929.1 <sup>G</sup>	Li <i>et al.</i> , 2012
		<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	5MIH <sup>P</sup>	Cavazzini <i>et al.</i> , 2017
		<i>Rhizopus delemar</i> RA 99-880	EIE86673.1 <sup>G</sup>	Takii <i>et al.</i> , 2005
		<i>Bacillus subtilis</i> 168	NP_388152.1 <sup>R</sup>	Itaya <i>et al.</i> , 2005
		<i>Proteus mirabilis</i> PM185	OZS69007.1 <sup>G</sup>	Jaiswal <i>et al.</i> , 2017
	Quitinasa	<i>Bacillus pumilus</i> F3	ABK80759.1 <sup>G</sup>	Muroi <i>et al.</i> , 2017
		<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7	OTA05027.1 <sup>G</sup>	Chilli <i>et al.</i> , 2015
		<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-8	BAD44715.1 <sup>G</sup>	Chilli <i>et al.</i> , 2015
		<i>Aspergillus niger</i> An76	GAQ37864.1 <sup>G</sup>	Wu <i>et al.</i> , 2018
		<i>Trichoderma viride</i> LTR-2	ABR27743.1 <sup>G</sup>	Gaur <i>et al.</i> , 1982
Bacteria	<i>Bacillus circulans</i> WL-12	IITX <sup>P</sup>	Watanabe <i>et al.</i> , 1993	
		<i>Paenibacillus pasadenensis</i> CS0611	ASO66300.1 <sup>G</sup>	Xu <i>et al.</i> , 2020
Termofílica	Serín proteasa	<i>Thermus thermophilus</i> JCM10941	BDA37360.1 <sup>G</sup>	Oshima <i>et al.</i> , 1974
		<i>Thermoascus aurantiacus</i> var. <i>Levisporus</i>	ABY71274.1 <sup>G</sup>	Li <i>et al.</i> , 2011
		<i>Pyrolobus fumarii</i> 1A	AEM38280.1 <sup>G</sup>	Anderson <i>et al.</i> , 2011
	Lipasa	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	WP_011250640.1 <sup>R</sup>	Atomi <i>et al.</i> , 2004
		<i>Thermomyces lanuginosus</i> T03	ABV69591.1 <sup>G</sup>	Nguyen <i>et al.</i> , 2002
		<i>Thermothelomyces thermophilus</i> ATCC 42464	XP_003664847.1 <sup>R</sup>	Gao <i>et al.</i> , 2021
		<i>Thermothelomyces thermophilus</i> ATCC 42464	XP_003659962.1 <sup>R</sup>	Gao <i>et al.</i> , 2021
		<i>Geobacillus</i> sp.	WP_014195917.1 <sup>R</sup>	McMullan <i>et al.</i> , 2004
	Quitinasa	<i>Geobacillus</i> sp.	WP_033008930.1 <sup>R</sup>	McMullan <i>et al.</i> , 2004
		<i>Thermoactinomyces thermophilus</i> DSM	XP_006692378.1 <sup>R</sup>	Amlacher <i>et al.</i> , 2011
<i>Thermoascus aurantiacus</i> v		ADT82646.1 <sup>G</sup>	Brienzo <i>et al.</i> , 2008	
<i>Thermoactinomyces thermophilus</i> DSM		XP_006692378.1 <sup>R</sup>	Amlacher <i>et al.</i> , 2011	
<i>Thermoascus aurantiacus</i>		ABS00927.1 <sup>G</sup>	Brienzo <i>et al.</i> , 2008	
Bacteria	<i>Acetivibrio thermoceillus</i> ATCC 27405	CAA93150.1 <sup>G</sup>	Zverlov <i>et al.</i> , 2002	

<sup>G</sup> Número de acceso Genbank; <sup>R</sup> Número de acceso Secuencia de referencia NCBI; <sup>P</sup> ID de estructura PDB.

### 8.15. Composición aminoacídica de las enzimas y análisis estadístico.

aa	Adaptadas al frío (%)		Mesofílicas (%)		Termofílicas (%)		Adaptadas al frío vs Mesofílicas	Adaptadas al frío vs Termofílicas	Mesofílicas vs Termofílicas
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	Valor <i>q</i>	Valor <i>q</i>	Valor <i>q</i>
<b>Ala</b>	10.28 ±	2.7	9.01 ±	2.5	9.72 ±	2.1	0.54024	0.405918	0.866327
<b>Cys</b>	1.12 ±	0.6	1.05 ±	1.0	1.01 ±	0.6	0.89454	0.663848	0.902428
<b>Asp</b>	6.04 ±	1.6	6.28 ±	1.3	5.97 ±	1.3	0.856991	0.75692	0.741512
<b>Glu</b>	2.98 ±	1.4	3.33 ±	1.5	5.29 ±	2.1	0.856991	<b>0.005671</b>	0.033267
<b>Phe</b>	3.39 ±	0.9	3.45 ±	0.8	3.67 ±	0.9	0.89454	0.438019	0.701969
<b>Gly</b>	10.93 ±	1.9	8.84 ±	1.8	8.85 ±	1.1	<b>0.007839</b>	<b>0.003756</b>	0.902428
<b>His</b>	1.67 ±	0.8	1.88 ±	0.9	2.04 ±	1.0	0.856991	0.431052	0.902428
<b>Ile</b>	5.01 ±	1.1	5.55 ±	1.5	4.50 ±	1.6	0.692372	0.681556	0.522053
<b>Lys</b>	3.75 ±	1.7	5.79 ±	2.9	4.14 ±	1.7	0.133615	0.438019	0.500879
<b>Leu</b>	7.55 ±	2.3	7.81 ±	1.8	8.59 ±	1.7	0.856991	0.319242	0.547268
<b>Met</b>	1.81 ±	0.7	1.79 ±	0.7	1.76 ±	0.9	0.932639	0.731372	0.902428
<b>Asn</b>	5.49 ±	1.5	6.04 ±	2.1	4.89 ±	1.8	0.856991	0.552061	0.522053
<b>Pro</b>	4.56 ±	1.9	4.84 ±	2.3	6.17 ±	1.5	0.856991	0.070423	0.522053
<b>Gln</b>	3.28 ±	1.1	3.10 ±	1.1	2.94 ±	0.9	0.856991	0.317612	0.688192
<b>Arg</b>	3.24 ±	1.3	3.47 ±	1.9	4.34 ±	1.7	0.856991	0.149236	0.522053
<b>Ser</b>	8.69 ±	2.2	8.67 ±	2.2	6.04 ±	1.4	0.934224	<b>0.003756</b>	<b>0.008768</b>
<b>Thr</b>	7.50 ±	1.8	6.26 ±	2.4	5.96 ±	1.5	0.395353	0.052582	0.902428
<b>Val</b>	7.72 ±	1.3	6.58 ±	1.6	7.10 ±	1.4	0.138528	0.232439	0.741512
<b>Trp</b>	1.42 ±	0.9	1.63 ±	1.0	2.02 ±	1.0	0.856991	0.13347	0.522053
<b>Tyr</b>	3.57 ±	0.7	4.64 ±	1.2	5.01 ±	1.1	0.039502	<b>0.001852</b>	0.522053

En negrita se denotan los *q value* que indican diferencias significativas.

**8.16. Mapa de calor comparativo de identidades de las lipasas predichas *in silico* en RGM 2184.**

