

Transformación de *Beauveria bassiana* Bb9205 con genes *pr1A*, *pr1J* y *ste1* de *Metarhizium anisopliae* y evaluación de su patogenicidad sobre la broca del café

Transformation of *Beauveria bassiana* Bb9205 with *pr1A*, *pr1J*, and *ste1* genes of *Metarhizium anisopliae* and evaluation of the pathogenicity on the coffee berry borer

MARTHA LILIANA RODRÍGUEZ C.¹, CARMENZA E. GÓNGORA B.²

Revista Colombiana de Entomología 31 (1): 51-58 (2005)

Resumen. *Beauveria bassiana* cepa Bb9205 fue transformada con genes de proteasas tipo subtilinas (*pr1A*, *pr1J*) y esterasa (*ste1*) aislados de *Metarhizium anisopliae* que están involucrados en la patogenicidad contra insectos. El objetivo del experimento fue aumentar la patogenicidad de la cepa contra la broca del café, *Hypothenemus hampei*. Para esto, se clonaron los genes en el plásmido pBarGPE1 que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Se obtuvo un cultivo monoespórico de la cepa Bb9205, cuya patogenicidad fue del 78% de mortalidad contra *H. hampei*, usando 1×10^6 esporas/ml. Con este monoespórico se produjeron protoplastos. Con respecto a la producción de protoplastos se optimizó la metodología obteniendo una concentración de 3×10^7 protoplastos/ml después del pre-tratamiento enzimático, durante 4 horas en agitación lenta a 37°C. Se realizó la transformación con los plásmidos pBarGPE1-*pr1A*, pBarGPE1-*pr1J* y pBarGPE1-*ste1* mediante los métodos de PEG y electroporación. Dos transformantes con el gen *pr1A* y uno con el gen *ste1* resistentes a 25 µg/ml del herbicida glufosinato de amonio exhibieron incremento de actividad proteolítica y esterolítica, respectivamente. Se evaluó, en pruebas de laboratorio, la patogenicidad de las cepas de *B. bassiana* transformadas comparándolas con la cepa Bb9205 no transformada monoespórica. La expresión constitutiva de la proteasa en la cepa transgénica Bb9205-*pr1A* mejoró su actividad insecticida al demostrar un incremento de mortalidad del 21,7% y una disminución del 14,3% en el tiempo de mortalidad sobre la broca del café. El transformante Bb9205-*ste1* disminuyó en un 9,5% el tiempo de mortalidad sobre broca al compararse con Bb9205 sin transformar. Los resultados indican que con el mejoramiento de cepas de *Beauveria*, por medio de transformación genética, se puede lograr un control biológico mejor.

Palabras clave: Patogenicidad. Proteasas. Esterasas. Control biológico. *Hypothenemus hampei*.

Summary. *Beauveria bassiana* strain 9205 (Bb9205) was transformed with protease genes (*pr1A* and *pr1J*) and one sterase gene (*ste1*) isolated from *Metarhizium anisopliae* that are involved in insect pathogenicity. The goal of this research was to increase the pathogenicity of the strain against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. To do this, genes were cloned into the plasmid pBarGPE1 that confers resistance to the herbicide ammonium-glufosinate. A monosporic line of strain Bb9205 was obtained with pathogenicity of 78% mortality against *H. hampei*, using 1×10^6 spore/ml. Protoplasts were produced from this monosporic line. The methodology for the protoplast production was optimized obtaining 3×10^7 protoplasts/ml after enzymatic pretreatment for 4 hours under slow agitation at 37°C. Transformation was carried out with the plasmids pBarGPE1-*pr1A*, pBarGPE1-*pr1J* and pBarGPE1-*ste1* by PEG and electroporation. Two strains transformed with the *pr1A* gene and one strain transformed with the *ste1* gene were obtained, that showed resistance to 25 µg/ml of ammonium glufosinate. These strains showed increased proteolytic and sterolytic activity, respectively. Under laboratory conditions, pathogenicity tests of *B. bassiana* transformants was compared to untransformed monosporic Bb9205. Constitutive over-expression of protease in the transgenic strain Bb9205-*pr1A* improved its insecticidal activity. The transformed strain showed a 21,7% increase in the insect mortality rate with 14,3% reduction in the time of mortality. The Bb9205-*ste1* transformant strain showed a 9,5% reduction of the time of mortality compared with the untransformed strain. The results indicate that breeding of *Beauveria* strains by genetic transformation can be achieved for purposes of better biological control.

Key words: Pathogenicity. Proteases. Sterases. Biological control. *Hypothenemus hampei*.

Introducción

El hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin ha sido ampliamente usado como controlador biológico de insectos (Ferrón 1978; Charnley 1991), especialmente de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari).

B. bassiana se encuentra naturalmente infectando *H. hampei* en casi todas las regiones de Colombia y experimentos, llevados a cabo en Cenicafé, han demostrado que el control del insecto en campo es posible empleando dosificaciones de 1×10^{10} y 1×10^{12} esporas por árbol, las cuales pueden llegar a causar mortalidades

entre 70-95% en las poblaciones de broca, dependiendo de las condiciones de cultivo y ambientales que se presenten (Posada 1998). Sin embargo, el uso de esta concentración de esporas es costosa y una de las formas de reducir estas dosificaciones altas es aumentando la patogenicidad de las cepas de *B. bassiana*. De esta forma sería

¹ Estudiante de Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.

² Autor para correspondencia: Microbióloga. Ph. D. Investigadora Científica I. Disciplina de Entomología. Cenicafé. Chinchiná, Caldas. Teléfono:(68) 506550 Extensión 332. E-mail: carmenza.gongora@cafedecolombia.com

posible reducir la dosis de esporas requerida para controlar el insecto. Por otra parte, la mortalidad del insecto se lograría en un tiempo más corto, disminuyendo el daño que causa el insecto en los cafetales.

En general, los experimentos de control biológico empleando entomopatógenos han originado frecuentemente resultados inconsistentes en cuanto a la estabilidad de la formulación y la lentitud en causar la mortalidad, en comparación con los insecticidas químicos, lo que ha detenido el desarrollo comercial de estos productos; debido a esto, las consideraciones acerca de la sostenibilidad de un hongo entomopatógeno con propósitos comerciales inevitablemente conlleva a la posibilidad de mejorar su desempeño como biocontrolador.

El gen de la proteasa Pr1 de *M. anisopliae* ha sido clonado y expresado en *M. anisopliae* mejorando su actividad como biocontrolador (St. Leger *et al.* 1996). Los genes *pr1J* (proteasa) y *ste1* (esterasa), que también han sido clonados, están involucrados en los procesos de infección y patogenicidad del entomopatógeno *M. anisopliae*. El propósito de este estudio fue determinar si *B. bassiana* transformada con los genes *pr1A*, *pr1J* y *ste1* incrementa su patogenicidad contra la broca del café.

Los genes *pr1A*, *pr1J* y *ste1* se introdujeron mediante transformación genética en *B. bassiana* cepa Bb9205 monoespórica con el fin de incrementar la actividad proteolítica y esterolítica de la cepa. Las cepas transformantes Bb9205-*pr1A*, Bb9205-*pr1J* y Bb9205-*ste1* se evaluaron a nivel molecular, enzimático y de su actividad biocontroladora contra *H. hampei* en condiciones de laboratorio. Se comprobó que la expresión constitutiva de la proteasa *pr1A* en *B. bassiana* cepa 9205 mejora su patogenicidad contra la broca del café. Adicionalmente, el único transformante Bb9205-*ste1* obtenido presentó una disminución significativa en el tiempo de mortalidad de la broca.

Materiales y Métodos

Entomopatógeno *Beauveria bassiana*

La cepa 9205 de *Beauveria bassiana* fue originalmente aislada de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae), y conservada dentro de la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé. Este entomopatógeno se cultivó en agar sabouraud dextrosa (SDA) y medio Sam-sinakova (2,3% sacarosa, 2,5% almidón, 2,5% extracto de maíz, 0,5% NaCl, 0,2% CaCO₃ y 1,5% agar), mantenido a 26°C durante 15 a 30 días.

Vectores de transformación

Los genes *pr1A* y *pr1J* que codifican para proteasas del tipo de las subtilisinas y el gen *ste1* codificador de la esterasa, aislados de *M. anisopliae*, fueron suministrados a Cenicafé por el Dr. Raymond St. Leger (Department of Entomology University of

Maryland, USA). Los códigos de acceso al "Genbank", para cada uno de los genes utilizados se presentan a continuación: Subtilisin-like serine protease *pr1A* [*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*], AJ251925; Subtilisin-like protease *pr1J* gene, exon 1-2 [*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*] AJ251922 y Esterase *ste1* (*ste1* gene) [*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*] AJ251924. Cada uno de estos genes había sido previamente clonado en el plásmido pBlueScript (pBS) (Stratagene, La Jolla, CA) y para esta investigación se subclonaron individualmente en el plásmido pBarGPE1, el cual fue obtenido del Fungal Genetic Stock Center, (Department of Microbiology, The University of Kansas Medical Center, USA).

El plásmido pBarGPE1 se escogió como plásmido de transformación ya que contiene el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio, bajo el control del promotor para la biosíntesis del triptofano-*trpC*; además, posee un gen de resistencia a ampicilina, y un sitio de clonación múltiple bajo el control del promotor gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa-*gpdA*. Cada uno de los genes de interés se clonaron en este último sitio.

Obtención de protoplastos

Esporas de la cepa monoespórica Bb9205 logradas a partir de un cultivo del hongo en medio SDA, mantenido a 26°C por 15-30 días, se resuspendieron en Tween al 0,02% y se transfirieron a un erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo líquido de saboraud dextrosa, suplementado con 0,1% de extracto de levadura, el cual se mantuvo en agitación a 110 rpm durante 36 h. De esta forma se obtuvo micelio joven, el cual se filtró utilizando Miracloth® (Calbiochem, Alemania), se lavó tres veces con agua destilada estéril y una vez con STC (sorbitol 1,2 M, tris 10 mM y CaCl₂ 20 mM). El micelio se incubó en 20 ml de solución enzimática [sorbitol 1,2M, MES 20 mM, 0,8% de Novozyme 234® de *Trichoderma harzianum* (Sigma, St Louis, MO) y 0,3% de β-glucuronidasa de *Helix pomatia* (Sigma), con una actividad de 400.000 U/substrato]. Se evaluaron dos temperaturas distintas, 37°C y temperatura ambiente (+ 26°C), durante 4 h. Adicionalmente se preparó una solución que tenía el doble de la cantidad de enzimas y se colocó a temperatura ambiente. La producción de protoplastos se monitoreó por observación al microscopio a intervalos de una hora. La solución enzimática con protoplastos se filtró usando Miracloth® para eliminar los restos de micelio sin degradar. Posteriormente, la solución se centrifugó a 3.450 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se lavó dos veces adicionando 15 ml de STC. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en 800 μl de STC, se cuantificaron utilizando un hemocitómetro, obteniendo una concentración promedio de 3 x 10⁷ protoplastos/ml, los cuales se mantuvieron en hielo hasta su uso.

Transformación de protoplastos de *B. bassiana*

La transformación de *B. bassiana* cepa Bb9205 monoespórica se llevó a cabo con cada uno de los vectores de proteasas pBarGPE1-*pr1A*, pBarGPE1-*pr1J* y esterasa pBarGPE1-*ste1*.

Se emplearon dos metodologías de transformación, polietilenglicol (PEG) (St. Leger *et al.* 1996) y electroporación (St. Leger *et al.* 1995) para transformar la cepa Bb9205, usando para ambas metodologías, la resistencia al herbicida glufosinato de amonio como agente de selección. Para la selección de colonias transformadas se determinó previamente la concentración inhibitoria del herbicida glufosinato de amonio de acuerdo con el rango de sensibilidad al glifosato de protoplastos de *B. bassiana* sin transformar.

Análisis molecular de los transformantes

En cada una de las colonias transformadas con los vectores pBarGPE1-*pr1A*, pBarGPE1-*pr1J* y pBarGPE1-*ste1*, se verificó la presencia del gen marcador *bar* y de los genes -*pr1A*, -*pr1J* y -*ste1*, respectivamente, mediante su amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para esto, se extrajo ADN de cada una de las cepas transformadas crecidas en medio con herbicida, la extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por Jürgen *et al.* (2001). Los genes de interés se amplificaron con reacciones de PCR en un volumen de 25 μl, que contenían 20 ng de ADN fúngico, 10X PCR buffer, 25 μM de cada oligonucleotido (específicos para la amplificación de cada uno de los genes), 2 mM de deoxinucleotidos, 2,5 mM de MgCl₂ y 1 U de Taq DNA polimerasa. Las reacciones se incubaron en un termociclador, siguieron un ciclo de denaturación inicial de 95°C por 5 min, 94°C por 1 min seguido de 40 ciclos de alineamiento a diferentes temperaturas según el caso (55, 60 y 65°C) por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, denaturación a 94°C por 1 min y un ciclo final de extensión a 72°C por 5 min.

El gen *pr1A* se amplificó utilizando las secuencias de oligonucleótidos *pr1A* F: 5' GCT GCC CCT GCC ACC AT3' y *pr1A* R: 5' TAC GCG CCC GAT AAC AT3', los cuales se unen en las posiciones 122 y 1.470 de la secuencia del gen *pr1A*. Estos oligonucleótidos se usaron en la reacción de amplificación a una concentración de 12,5 μM y una temperatura de alineamiento de 55°C.

Para la amplificación del gen *pr1J* se probaron dos temperaturas de alineamiento 60 y 65° con el fin de incrementar las condiciones de astringencia en la reacción de PCR. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas fueron *pr1JF*: 5' CTG GGT TCG GGA TGT TCA AGT G 3' y *pr1JR*: 5' TGC CAG GAG CGA GGG ACA AGA C 3', los cuales se unen en las posiciones 204 y 1.046 de la secuencia del gen *pr1J*.

El gen *ste1* se amplificó utilizando las secuencias de oligonucleótidos: *ste1F*: 5' TAC GCC GAC GCA TCC ACC AAG AAA 3' y *ste1R*: 5' TAT ATG CTG CCG GGG AAG GAT GT 3', los cuales se unen en las posiciones 173 y 1.169 de la secuencia del gen *ste1*, la reacción fue llevada a cabo siguiendo las condiciones de PCR inicialmente descritas con una temperatura de alineamiento de 55°C.

Para la amplificación del gen *barse* modificó la reacción de PCR, se probaron diferentes concentraciones de magnesio 1,0 mM, 1,5 mM y 2,0 mM. Se aumentó la temperatura de alineamiento a 65°C, para incrementar la astringencia y hacer más específica la amplificación. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados en esta reacción fueron *barF*: 5' ATG CGC CCA GAA CGA CGC CC3' y *barR*: 5' AGA TCT CGG TGA CGG GCA GGA C 3', los cuales se unen en las posiciones 160 y 709 de la secuencia del gen *bar*.

Se seleccionaron las colonias que tenían tanto el gen *bar* como el gen de interés y se determinó si expresaban las respectivas proteínas.

Ensayos de actividad enzimática

Los niveles de proteasas totales producidas por las colonias transformadas y no transformadas se cuantificaron usando ensayos de actividad enzimática.

Se colectaron esporas de 15-30 días con germinación mayor del 90% de cepas sin transformar y transformadas con los genes *pr1A* y *pr1J*. Se utilizaron, para inocular a una concentración de 1×10^8 esporas/ml, erlenmeyers de 125 ml con 25 ml de medio mínimo (0,1% KH_2PO_4 , 0,05% MgSO_4), suplementado con 1% (p/v) de quitina y quitina más 2% de N-acetyl glucosamida (NAG). Se incubaron los cultivos en agitación a 110 rpm, 28°C durante 60 h. Cada 12 horas se tomó una muestra de 250 μl , se centrifugó y se midió la actividad proteolítica sobre el péptido sintético succinil-(alanil) 2-prolil-fenilalanina (pNA: p-nitroanilide) (Sigma), el cual fue preparado diluyendo 3,2 mg de este sustrato en 5 ml de dimetil sulfoxido (DMSO) siguiendo la metodología descrita por St. Leger *et al.* (1994). Para hacer las lecturas se tomaron 10 μl del medio de cultivo de los hongos previamente centrifugado y a éste, se le adicionaron 90 μl de buffer Tris, HCl 0,1 M a pH 8,0 y 8 μl de sustrato 1 mM. Las muestras se colocaron en microplatos y se midió la cantidad de sustrato degradado a los 60 minutos por reacción colorimétrica en un espectrofotómetro modelo 3550 UV (Bio-Rad) a 405 λ .

Para observar la actividad enzimática proteolítica específica de las cepas transformadas por isoelectroenfoque (IEF), se tomaron 25 ml de medio de la cepa control Bb9205 sin transformar y de transformantes Bb9205-*pr1A*, creciendo en medio mínimo con quitina y medio mínimo con quitina más NAG después de 72 h.

Los cultivos se filtraron a través de papel filtro Whatman 1 y se concentraron por ultracentrifugación.

Para la ultracentrifugación se utilizaron unidades de ultrafiltración Centricon para 15 ml con membranas de exclusión de 10kDa (Amicon) en los cuales se colocó el cultivo filtrado y se centrifugó a 1.800 rpm varias veces hasta completar los 25 ml de muestra, luego se lavó dos veces adicionando 10 ml de agua destilada y centrifugando nuevamente. Este extracto enzimático se transfirió a unidades Centricon para 2 ml (Amicon) en donde se centrifugó por 2 h a 1.800 rpm obteniendo finalmente 500 μl de extracto enzimático concentrado.

Alícuotas de 2 μl de estos extractos concentrados se aplicaron a un gel hecho con una mezcla de polimerización consistente de una solución anfólito-monómero (5,5 ml agua destilada deionizada, 2 ml acrilamida 24,25% - bis acrilamida 0,75%, 2 ml glicerol 25%, 0,5 ml anfólito 3/10 Bio-lyte), la mezcla fue desgasificada por 4 min, luego se adicionó la solución de catálisis (15 μl de 10% persulfato de amonio, 50 μl de 0,1% riboflavina 5' fosfato (FMN), 3 μl *N, N, N, N'*, tetramethylethylenediamine TEMED). Las proteínas fueron separadas así: 100V por 15 min, 200V por 15 min, 450V por 1 h en una mini IEF cell model 111 (Bio-Rad). La actividad proteolítica de los transformantes se visualizó al poner en contacto el gel IEF zymograma de proteasas con un film de radiografía, el cual viene recubierto de una película de gelatina, las proteasas presentes en el gel hidrolizaron la gelatina en el film, y se observó un halo transparente (Bidochka y Khachatourians 1988).

Para observar la actividad enzimática esterolítica se siguió la metodología descrita por Peterson y Bridge (1994).

Pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio

Para determinar la patogenicidad de las cepas, en condiciones de laboratorio, se utilizaron concentraciones de 1×10^5 y 1×10^6 esporas/ml y se siguió la metodología descrita por Vélez *et al.* (1997). El experimento constó de cuatro tratamientos por cada una de las cepas: Bb9205 no trans-

formada, Bb9205-*pr1A* y Bb9205-*ste1* transformadas, más el testigo (brocas sin hongo). Cada tratamiento contenía cuatro repeticiones y 15 individuos por repetición, para un total de 60 brocas por tratamiento. Se realizaron tres réplicas del experimento.

La mortalidad de las brocas se evaluó diariamente después de la inoculación durante 15 días. Las variables evaluadas en el experimento fueron mortalidad causada por el hongo (PMBb), mortalidad por otras causas (POC) y mortalidad por contaminantes (PMC) expresados en porcentaje a un nivel de significancia del 5%. Se determinaron las diferencias en el tiempo de mortalidad para cada cepa.

Análisis estadísticos

Para el análisis de datos de las pruebas de patogenicidad de las cepas transformadas se compararon los tratamientos entre sí y el control sin transformar mediante un análisis de varianza y se establecieron diferencias a través de pruebas de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significancia del 5% mediante el programa S.A.S.

Resultados

Obtención de la cepa Bb9205 monoespórica

A partir de un cultivo multiespórico se obtuvieron 14 colonias monoespóricas, de las cuales se seleccionaron las 5 primeras que esporularon y tuvieron porcentaje de germinación mayor del 90%, para evaluar su patogenicidad contra la broca del café; para estas pruebas se usó una dosis de esporas de 1×10^6 esp/ml (Tabla 1). Los aislamientos monoespóricos presentaron potenciales patogénicos que variaron entre el 45 y 78%, utilizando una dosis de 1×10^6 esporas/ml.

Estandarización de la metodología para obtención de protoplastos

La evaluación de dos temperaturas diferentes: 37°C y temperatura ambiente ($\pm 26^\circ\text{C}$) en el proceso de digestión de la pared celular de los protoplastos durante 4 h permitió determinar que a 37°C se logra la mayor cantidad de protoplastos, con una concentración de 3×10^7 protoplastos/ml, mientras que en la solución que se colocó

Tabla 1. Registro de las pruebas de patogenicidad de aislamientos monoespóricos de *B. bassiana* sobre *H. hampei* y porcentaje de germinación de esporas. Dosis 1×10^6 esporas/ml.

Aislamiento monoespórico	Porcentaje germinación	Porcentaje mortalidad	CV
1	100	78	31,6
2	97	46	10,3
3	98	56	2,8
4	96	55	1,4
5	98	45	11,6
Testigo	Sin hongo	0	

CV: coeficiente de variación.

a 26°C se obtienen $1,2 \times 10^7$ protoplastos/ml. Al duplicar la concentración de enzimas en la solución y dejarla a 26°C se obtiene menor cantidad (6×10^6 protoplastos/ml) y su membrana celular presenta un deterioro evidente por el exceso de enzimas.

Selección de transformantes

Previo al proceso de transformación era necesario conocer la concentración del herbicida glufosinato de amonio que inhibiera el desarrollo de la cepa Bb9205. Para esto se obtuvieron protoplastos del hongo y se pusieron a crecer en SDA con diferentes concentraciones de herbicida. Al examinar las cajas, después de 20 días, se encontró que la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ del herbicida glufosinato de amonio inhibía completamente el crecimiento del hongo *B. bassiana* no transformado. Sin embargo, cuando se utilizó esta concentración en los experimentos de transformación no se obtuvieron colonias transformantes, lo que sugirió que esta concentración era muy alta y no permitía la regeneración de transformantes. Por lo tanto, se decidió hacer la selección utilizando la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ del herbicida, recuperando colonias transformantes antes de 20 días con el fin de evitar falsos positivos ya que después de este tiempo el tratamiento control de *B. bassiana* sin transformar puede crecer a esta concentración del herbicida.

Transformación de *B. bassiana* cepa 9205

Se emplearon dos metodologías de transformación, polietilenglicol (PEG) y electroporación, para transformar Bb9205, usando resistencia al herbicida glufosinato de amonio (25 $\mu\text{g/ml}$) como agente de selección. Se realizaron 16 transformaciones en total. Después de 11 transformaciones por PEG (1 transformación con el gen *pr1A*, 4 para *pr1J* y 6 para *ste1*) se obtuvieron 5 colonias putativamente transformadas para el gen *pr1A*, 3 con el gen *pr1J* y 3 con el gen *ste1*. Como el número de colonias putativamente transformadas fue bajo, se decidió probar electroporación, método con el cual se hicieron 5 transformaciones (1 para el gen *pr1A*, 2 para *pr1J* y 2 para *ste1*), obteniéndose 4 colonias putativamente transformadas para el gen *pr1A*, 16 para el gen *pr1J* y 12 con el gen *ste1*. La recuperación de colonias putativamente transformadas se realizó entre 10 y 20 días cuando la transformación se hizo por polietilenglicol y desde el día 4 cuando se utilizó electroporación.

Las colonias seleccionadas se transfirieron a SDA con 25 $\mu\text{g/ml}$ del herbicida glufosinato de amonio y se observó su crecimiento en este medio. Se descartaron algunas colonias porque no crecieron. Al final se evaluaron 9 colonias putativamente transformadas con el gen *pr1A*, 12 con el gen *pr1J* y 6 con el gen *ste1*, a las cuales se les extrajo su DNA para verificar, en cada una de ellas, la presencia de los genes de proteasas o esterasa y del gen marcador *bar*.

Presencia de genes

Se seleccionaron nueve colonias putativamente transformadas Bb9205-*pr1A*, las cuales se mantuvieron en SDA y medio Samsinakova con herbicida durante ocho generaciones. En cada colonia se verificó la presencia del gen de proteasa *pr1A* y del gen marcador *bar* mediante PCR. La amplificación de una banda de 1.348 pb indicó la presencia del gen *pr1A*, tres colonias amplificaron el gen *pr1A*.

Con el fin de verificar si los hongos putativamente transformados en los que se amplificaron bandas del tamaño del gen *pr1A*, también contenían el gen *bar*, éste se amplificó por PCR evaluando diferentes concentraciones de magnesio. Se determinó que con la condición de 1,25 mM de MgCl_2 y una temperatura de alineamiento de 65°C en la reacción, se lograba una amplificación específica del gen. Los resultados de esta amplificación mostraron que tres colonias que contenían el gen *pr1A* también amplificaron el gen *bar*, una de las nueve colonias sólo amplificó el gen *bar*.

Doce colonias putativamente transformadas con el gen *pr1J* fueron mantenidas en SDA y medio Samsinakova con herbicida durante seis generaciones. En cada colonia se verificó la presencia del gen de proteasa *pr1J* y del gen *bar*. Ambos genes fueron amplificados a una temperatura de alineamiento de 65°C. La presencia de una banda de 842 pb indicó la presencia del gen *pr1J*; los resultados de esta amplificación mostraron que tres colonias que contenían el gen *pr1J* también contenían el gen *bar*. Sólo una colonia que tenía el gen *pr1J* no amplificó el gen *bar*.

Seis colonias putativamente transformadas con el *ste1* fueron mantenidas en SDA o medio Samsinakova con herbicida durante 6 generaciones. En cada colonia se

verificó la presencia del gen *ste1* y del marcador *bar*, una colonia amplificó ambos genes.

Actividad enzimática

Para los ensayos de actividad enzimática proteolítica se evaluó la actividad enzimática proteolítica de Bb9205 sin transformar y de las cepas transformantes Bb9205-*pr1A* denominadas A4, A6 y la cepa A5 (solo con el gen *bar*).

En la figura 1 se observa la actividad proteolítica medida en absorbancia a las 24, 36, 48 y 60 horas. Las cepas denominadas A5 y A6 produjeron proteasas en cantidades similares al control Bb9205 cuando se pusieron a crecer en medio mínimo con quitina, la cual induce producción de proteasas. La cepa A4 produce una menor cantidad de proteasas en este medio al compararla con la producción de proteasas de las demás cepas. Solamente las cepas transformadas producen proteasa *pr1A* cuando crecen en medio mínimo con quitina más N-acetilglucosamida (NAG), la cual actúa como inhibidor al bloquear la expresión de proteasas totales en Bb9205 no transformada. En las cepas A5 y A6 se observa una marcada inhibición de crecimiento en medio mínimo con quitina más NAG, similar al control sin transformar. A diferencia de las anteriores, la cepa A4 produce mayor cantidad de proteasas durante su crecimiento en medio mínimo con quitina más NAG, lo cual indica que la proteasa se está expresando constitutivamente y tanto el gen como su respectivo promotor fueron incorporados dentro del genoma del hongo.

De igual manera se evaluó la producción de proteasas en las cepas transformantes Bb9205-*pr1J*; sin embargo, todas las cepas transformantes presentaron el mismo perfil de producción de proteasa *pr1J* en medio mínimo suplementado con quitina y se inhibieron en la misma pro-

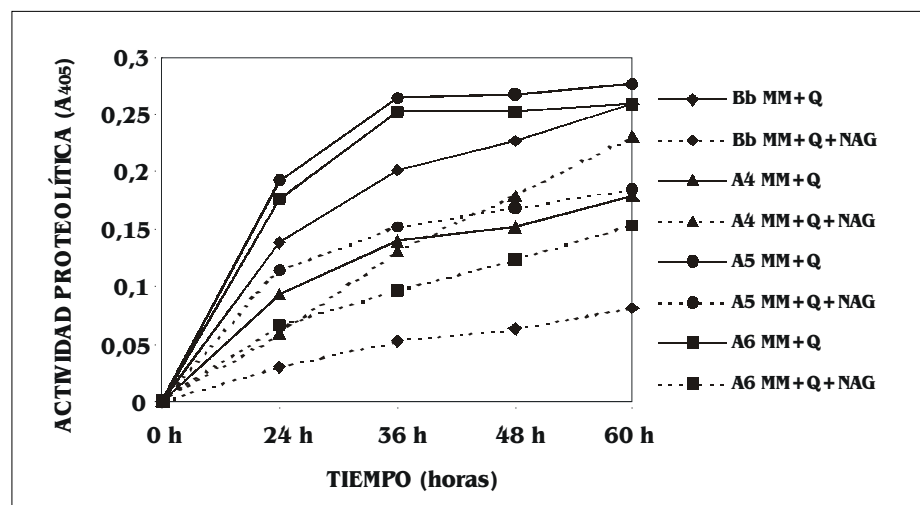


Figura 1. Producción de *pr1A* en la cepa control Bb9205 y cuatro cepas transformadas con pBARGPE1-*pr1A* creciendo en medio mínimo (MM) con quitina (Q) y medio mínimo con quitina más N-acetilglucosamida (NAG). Esta gráfica representa el promedio de tres réplicas del experimento.

porción que la cepa control Bb9205 sin transformar en medio mínimo con quitina más NAG.

Actividad proteolítica por isoelectroenfoque

Para este experimento se escogieron las cepas Bb9205-*pr1A* denominadas A3 y A4 en las cuales se había verificado la presencia de los genes *pr1A* y *bar*. La cepa A4 demostró expresión constitutiva de la proteasa *pr1A*, en la cepa A3 no se midió actividad enzimática proteolítica por espectrofotometría debido a que esta cepa presentó disminución en su capacidad de esporulación; sin embargo, el isoelectroenfoque permitió conocer su actividad proteolítica específica.

Para observar la actividad enzimática proteolítica, se tomaron extractos enzimáticos concentrados de la cepa control Bb9205 sin transformar y de las cepas A3 y A4, creciendo en medio mínimo con quitina y medio mínimo con quitina más NAG. Las proteasas fueron separadas por isoelectroenfoque (IEF), comprobándose la actividad proteolítica por exposición del gel a una película de radiografía, la cual viene recubierta de gelatina. Las proteasas degradaron la gelatina formando un halo transparente. El zimograma mostró que no hubo inhibición de proteasas en las cepas A3 y A4 creciendo en medio mínimo con quitina más NAG, como si es evidente en el control Bb9205 sin transformar. Estos resultados confirman la transformación y expresión constitutiva de *pr1A* en las cepas Bb9205-*pr1A* A3 y A4. Ambas cepas fueron seleccionadas para realizar pruebas de patogenicidad sobre la broca del café.

Actividad esterolítica

El ensayo de actividad esterolítica mostró que la cepa control Bb9205 sin transformar poseía una actividad moderada en el medio Tween 80, dado que la cepa tiene enzimas esterases; sin embargo, en la cepa transformada Bb9205-*ste1* se observó un incremento de actividad esterolítica debido a la transformación con el gen *ste1*. El medio sobre el que creció el transformante contenía 25 µg/ml de herbicida glufosinato de amonio.

Pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio

Se determinaron promedios de porcentaje de mortalidad causado por *B. bassiana* y tiempo de mortalidad sobre la broca del café para cada una de las cepas transgénicas y control sin transformar.

El análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia del 5% mostraron que hubo diferencia significativa entre el porcentaje de mortalidad causado por la cepa transgénica Bb9205-*pr1A* y los porcentajes de mortalidad causados por el control Bb9205 sin transformar y la cepa transgénica Bb9205-*ste1*, pero no existió diferencia significativa entre el porcentaje de

mortalidad causado por Bb9205-*ste1* y el control Bb9205 (Tabla 2 y Fig. 2).

La expresión constitutiva de la proteasa *pr1A* en la cepa transgénica Bb9205-*pr1A* mejora su actividad insecticida al demostrar con una dosis de 1×10^5 esporas/ml un incremento de mortalidad sobre la broca del café del 21,7% al compararse con el control Bb9205 sin transformar.

La cepa transgénica Bb9205-*ste1* tuvo un incremento del 7,3% en su porcentaje de mortalidad sobre broca, pero este valor no fue significativamente diferente ($P=0,05$) del porcentaje de mortalidad sobre broca causado por el control Bb9205 sin transformar.

Para el tiempo de mortalidad (TMOR) el análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% y la prueba de rangos múltiples de Duncan, mostró que existe diferencia significativa en el TMOR de las brocas causado por las cepas Bb9205-*pr1A* y Bb9205-*ste1* con respecto al control Bb9205, pero no existió diferencia significativa entre el TMOR de las cepas Bb9205-*pr1A* y Bb9205-*ste1*. Bb9205-*pr1A* tuvo una disminución del 14,3% en el tiempo de mortalidad y la cepa Bb9205-

ste1 demostró una disminución del 9,5% al ser comparadas con Bb9205 sin transformar (Tabla 2).

Adicionalmente, se realizó otra prueba de patogenicidad utilizando una dosis de 1×10^6 esporas/ml, la cepa Bb9205-*ste1* no se incluyó en esta ocasión debido a que no se disponía de esporas con germinación superior al 90% de esta cepa para realizar la prueba. Los resultados de esta prueba muestran que con una dosis de 1×10^6 esporas/ml la cepa Bb9205-*pr1A* tuvo un incremento del 25% en su porcentaje de mortalidad y una disminución del 16,2% en el tiempo de muerte sobre la broca del café. Estos resultados concuerdan con los obtenidos cuando se utilizó una dosis de 1×10^5 esporas/ml ya que el incremento en el porcentaje de mortalidad y la disminución del tiempo de muerte sobre la broca fueron similares con ambas dosis.

Discusión

El uso de un cultivo monoespórico de *B. bassiana* minimiza los riesgos de variación por la naturaleza mononuclear de estas esporas. En la tabla 1 se observa que en el cultivo multiespórico existen conidias con diferentes potenciales patogénicos, los

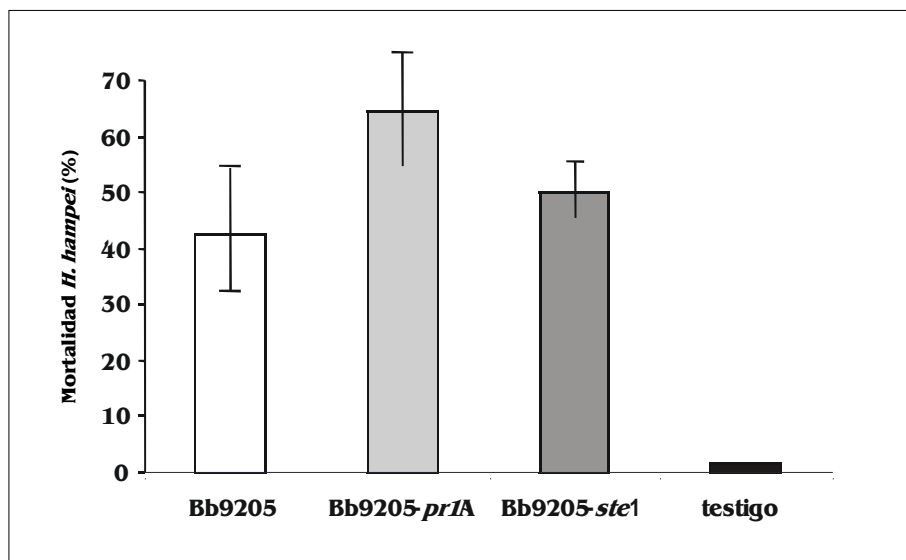


Figura 2. Promedios de porcentaje de mortalidad sobre *H. hampei* de las cepas Bb 9205 sin transformar y las cepas transgénicas Bb9205-*pr1A* y Bb9205-*ste1*. Dosis 1×10^5 esp/ml.

Tabla 2. Promedio de porcentaje de mortalidad y tiempo de mortalidad sobre *H. hampei* de las cepas Bb9205 sin transformar y Bb9205-*pr1A* y Bb9205-*ste1* transgénicas. Dosis 1×10^5 .

CEPAS	Porcentaje de mortalidad		Tiempo de mortalidad	
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb9205	42,7 b	11,6	8,79 b	55,7
Bb9205- <i>pr1A</i>	64,4 a	16,4	7,36 c	47,4
Bb9205- <i>ste1</i>	50,0 b	17,6	7,84 c	55,3
Testigo	0 c	0	15 a	0

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Duncan al 5%.

CV= coeficiente de variación

cuales pueden variar entre el 45 y 78%, utilizando una dosis de 1×10^6 esporas/ml. Resultados similares fueron obtenidos por Estrada *et al.* (1999) quienes también produjeron aislamientos monoespóricos de *B. bassiana* cepa Bb9205, ellos mostraron una gran variabilidad en sus cultivos monoespóricos, utilizando una dosis de 1×10^7 esporas/ml obtuvieron mortalidades menores del 42% y mayores del 70%.

En los experimentos de transformación la calidad de los protoplastos es un factor crítico ya que de esto depende la frecuencia de transformación (Valadares e Inglis 1997). Al estandarizar la metodología para Bb9205, se encontró que a 37°C y 4 h de tratamiento enzimático se obtuvo la cantidad de protoplastos adecuada para el procedimiento de transformación. Estas condiciones fueron similares a las determinadas por Florez *et al.* (2000) para regeneración de protoplastos y pruebas de fusión en *B. bassiana*.

Según los resultados de las pruebas de PCR, de 9 colonias que se obtuvieron por PEG, cuatro (45%) fueron transformadas, mientras que de 18 colonias que se obtuvieron por electroporación solo tres (17%) fueron transformadas, esto sugiere que la electroporación no resultó ser eficiente en términos de frecuencia ya que se obtuvieron muy pocos transformantes por este método. Pfeifer y Khachatourians (1992) obtuvieron resultados similares en la transformación de *B. bassiana* por electroporación.

Al revisar los resultados obtenidos con diferentes metodologías de transformación en diferentes hongos entomopatógenos (Bernier *et al.* 1989; Goettel *et al.* 1990; Reis *et al.* 1996; Barreto *et al.* 1997; Valadares e Inglis, 1997; St. Leger *et al.* 1995; Inglis *et al.* 1999), no se encuentra un patrón claro que permita establecer comparaciones entre ellos, por lo tanto no es posible establecer si las diferencias en la frecuencia de transformación se deben a la especie de hongo o al método utilizado, además la información existente sobre *B. bassiana* sigue siendo limitada.

En general, ambas metodologías de transformación permitieron la obtención de transformantes, sin embargo de 27 colonias evaluadas solo siete resultaron transformadas, tres contenían el gen *prIA*, tres contenían el gen *prIJ* y una contenía el gen *ste1*, lo que indica la presencia de un alto número de colonias falso positivas. Esto posiblemente fue debido a la concentración de herbicida utilizada para la selección de los transformantes. Otros autores describen el uso de diferentes concentraciones de glufosinato de amonio para selección de transformantes (Cantone y Vandenberg 1999a, b; Góngora 2004; Screen *et al.* 2001). Esto conlleva a establecer que la concentración mínima inhibitoria de herbicida varía de acuerdo con la especie y probablemente la concentración mínima inhibitoria de glufosinato de amonio para selección de

transformantes de Bb9205 monoespórica es una concentración intermedia entre 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$. El uso de estas concentraciones restringiría la posibilidad de obtener colonias falso positivas.

En el análisis molecular de los transformantes para amplificar el gen de la proteasa *prIJ* y el gen *bar*, fue necesario establecer condiciones muy astringentes en las reacciones de amplificación debido a la baja especificidad de los oligonucleótidos o a que *B. bassiana* tiene muchas proteasas que se desconocen, las cuales pueden ser muy similares a la *prIJ* de *M. anisopliae*. En las investigaciones de hongos entomopatógenos, *M. anisopliae* ha sido modelo global para patogenicidad, mientras que *B. bassiana* ha sido menos estudiada. Hasta el momento, en esta última solo se ha hecho la clonación de una proteasa Pr1 (Joshi *et al.* 1995) y se ha deducido su secuencia de aminoácidos, demostrando que es similar a la proteasa Pr1 de *M. anisopliae*. Otra proteasa de *B. bassiana* similar en un 83,3% a la Pr1 antes descrita, ha sido registrada por Fang *et al.* (2002).

En eventos de transformación utilizando el promotor constitutivo "*gpdA*", St. Leger *et al.* (1996), Migheli *et al.* (1998) y Screen *et al.* (2001) registran la obtención de transformantes con incremento de actividad proteolítica con respecto al control sin transformar. En este caso de tres transformantes que fueron positivos por PCR para el gen *prIA*, dos de ellos Bb9205-*prIA*A3 y A4 demostraron expresión del gen *prIA* y producción constitutiva de la proteasa cuando fueron comparados con la cepa control Bb9205 sin transformar, bajo condiciones de crecimiento inducidas y no inducidas. Esto apoya la observación de Covert y Cullen (1992), de que los hongos filamentosos son a menudo permisivos con respecto a la expresión de genes foráneos. De igual forma, St. Leger y Joshi (1997) y St. Leger *et al.* (1995) aseguran que los plásmidos son integrados dentro del genoma frecuentemente en múltiples copias, algunas veces en loci homólogos. En esta investigación es sorprendente que con tan pocos transformantes obtenidos se hayan encontrado cepas que presentarían una buena expresión de proteínas, teniendo en cuenta que St. Leger *et al.* (1996) hablan que de 40 transformantes de *M. anisopliae* obtenidos para el gen *prIA*, sólo 12 (30%) expresaron constitutivamente la proteasa Pr1.

Ninguno de los tres transformantes identificados por PCR para el gen *prIJ*, demostró incremento de actividad proteolítica, debido a que la transformación es un proceso completamente aleatorio; sin embargo, a pesar de haber obtenido tan pocos transformantes se podría considerar: 1) La probabilidad de que en estos hongos transformados se hubiera presentado el fenómeno de silenciamiento de genes dependiente de homología (HDGS), eventos de recombinación homóloga han sido registrados por Inglis *et al.* (1999), en *F. fumosoroseus* y por Cogoni y Mancino

(1997, citado por Catalanotto *et al.* 2000) en *Neurospora crassa*. 2) El efecto de posición, en el que los genes pueden integrarse en lugares del genoma que nunca son transcritos (Cantone y Vandenberg 1999b). 3) Exceso en el número de copias del gen, el cual puede causar un silenciamiento (Carthew 2001). Para el caso del único transformante obtenido para el gen *ste1*, éste expresó la proteína, nuevamente reiterando lo aleatorio del proceso de transformación.

Alteraciones fenotípicas se presentaron en uno de los transformantes Bb9205-*prIA*-A3 que demostró mayor actividad proteolítica, pero disminuyó su capacidad de esporulación, probablemente por la integración del plásmido en diferentes posiciones dentro del genoma. Resultados similares fueron registrados por St. Leger *et al.* (1996) en *M. anisopliae* transformado con el gen Pr1 y Upchurch *et al.* (1994) en *Cercospora kikuchii* transformado con el gen *bar*.

El incremento en la patogenicidad de Bb9205-*prIA* del 21,7% de mortalidad y una disminución del 16,3% en el tiempo de muerte de la broca con una dosis de 1×10^5 esporas/ml en comparación al control sin transformar, es atribuido a que la proteasa Pr1 es esencial para la penetración de la cutícula y es un determinante de patogenicidad (Charnley y St. Leger 1991). Lo anterior unido al hecho de que aproximadamente el 70% de la cutícula del insecto es proteína (Charnley y St. Leger 1991; Bidochka y Khachatourians 1992; Griesch y Vilsinskas 1998), resultó en mejoramiento de la actividad biocontroladora de la cepa Bb9205. Resultados similares fueron obtenidos por St. Leger *et al.* (1996) en la transformación de *M. anisopliae* con el gen Pr1. Es importante resaltar que en esta investigación se presentó incremento de mortalidad del insecto, lo cual no se registró en el trabajo de St. Leger *et al.* (1996).

Un incremento de la actividad biocontroladora utilizando proteasas también ha sido obtenida en otros hongos biocontroladores, como ha sido descrito por Flores *et al.* (1997), quienes transformaron *Trichoderma harzianum* con el gen de la proteasa *prb1*.

Con respecto a la patogenicidad del transformante Bb9205-*ste1*, se planteó la hipótesis de que el incremento de actividad esterolítica mejoraría la patogenicidad de *B. bassiana* 9205 contra la broca del café, basados en el hecho de que las esterases son las primeras en ejercer su acción para degradar la cutícula del insecto. El transformante Bb9205-*ste1* incrementó su actividad esterolítica pero no mejoró significativamente su patogenicidad contra la broca al ser comparada con la cepa Bb9205 no transgénica. Sin embargo, el incremento de la actividad esterolítica en la cepa Bb9205-*ste1* puede facilitar la acción de otras enzimas como las proteasas, lo que se demostró al dismi-

nuir en un 9,5 % el tiempo que tarda el hongo en causar la mortalidad de la broca.

Las cepas transgénicas generadas mostraron estabilidad genética bajo condiciones selectivas, por más de seis generaciones.

Finalmente, se demostró que la transformación de Bb9205 con el gen *pr1A* y expresión constitutiva de esta proteasa mejoró la actividad biocontroladora de esta cepa contra *H. hampei*. Se requiere información adicional de la cepa Bb9205 transformada con el gen *ste1* ya que en este estudio no se cuantificó la actividad enzimática esterolítica, ni tampoco se obtuvieron más transformantes para comparar y poder establecer que no existen diferencias significativas en la patogenicidad de transformantes Bb9205-*ste1* y la cepa Bb9205 no transformada.

Con respecto a las perspectivas de este trabajo es conveniente producir más transformantes para los tres genes evaluados en este estudio, ya que la cantidad obtenida fue muy poca, lo cual limita las conclusiones del estudio y se hace necesario evaluar el efecto sinérgico de estos genes con otros genes implicados en patogenicidad, teniendo en cuenta el hecho de que la mezcla de varias enzimas puede ser necesaria para una eficiente degradación de la cutícula del insecto en la interacción entomopatógena, plaga.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a Cenicafé y a Colciencias por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

Literatura citada

- BARRETO, C. C.; ALVES, L. C.; ARAGAO, F. J.; RECH, E.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN M.H. 1997. High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. FEMS Microbiology Letters 156: 95-99..
- BERNIER, L.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K.; CLARKSON, J. M. 1989. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. FEMS Microbiology Letters 60: 261-266.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. 1988. N acetyl-D glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied Environmental Microbiology 54: 2699-2704.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticle components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology 59: 165-173.
- CANTONE, F. A.; VANDENBERG, J. D. 1999a. Use of the green fluorescent protein for investigation of the *Paecilomyces fumosoroseus* in insect host. Journal of Invertebrate Pathology 74: 193-197.
- CANTONE, F. A.; VANDENBERG, J. D. 1999b. Genetic transformation and mutagenesis of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Journal of Invertebrate Pathology 74: 281-288.
- CARTHEW, R. W. 2001. Gene silencing by double-stranded RNA. Cell Biology 13: 244-248.
- CATALANOTTO, C.; AZZALIN, G.; MACINO, G.; COGONI, C. 2000. Gene silencing in worms and fungi. Nature 404: 245.
- CHARNLEY, A. K. 1991. Microbial pathogens and insect pest control. Letter Applied of Microbiology 12: 149-157.
- CHARNLEY, A. K.; ST. LEGER, R. J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. p. 267-287. En Cole G T & Hoch H C (eds.). The fungal spore and disease initiation in plants and animals, London, Plenum.
- COVERT, S. F.; CULLEN, D. J. 1992. Heterologous protein expression in filamentous fungi. p. 66-77. En Leatham, G. F. (eds.). Frontiers in Industrial Mycology. Chapman & Hall, New York.
- ESTRADA, M.; VELEZ, P.; MONTOYA, E. C.; BUSTILLO, A. 1999. Esporulación, germinación y patogenicidad de aislamientos monoespóricos de *Beauveria bassiana*. Cenicafé 50 (1):49-65.
- FANG, W. G.; ZHANG Y. J.; YANG X. Y.; WANG Z. K.; PEI, Y. 2002. Cloning and characterization of cuticle degrading enzyme CDEP-1 from *Beauveria bassiana*. Yi Chuan Xue Bao, 29(3): 278-82. (Resumen en: NCBI Data Base. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Consultado en abril de 2003).
- FERRON, P. 1978. Biological control of insects pests by entomopathogen fungi. Annual Review of Entomology 23:409-442.
- FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. Current Genetics 31: 30-37.
- FLOREZ, M. C.; LOPEZ, J. C.; MONTOYA, E. C. 2000. Regeneración de protoplastos y pruebas de fusión en *Beauveria bassiana*. Memorias XXVII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. p. 107. Medellín.
- GOETTEL, M. S.; ST. LEGER, R. J.; BHAIRI, S.; JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. 1990. Pathogenicity and grow of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. Current Genetics 17: 129-132.
- GÓNGORA, C. 2004. Transformación de *Beauveria bassiana* cepa Bb9112 con los genes de la proteína verde fluorescente y la proteasa *pr1A* de *Metarhizium anisopliae*. Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 15-21.
- GRIESCH, J.; VILSINSKAS, A. 1998. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Biocontrol science and technology 8: 517- 531.
- INGLIS, P. W.; TIGANO, M. S.; VALADARES-INGLIS, C. 1999. Transformation of the entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (Deuteromycotina: phycomycetes) to benomyl resistance. Genetics and Molecular Biology 22 (1): 119-123.
- JOSHI, L.; ST. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M. J. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiology Letters 125: 211-217.
- JÜRGEN, W.; LENGELER, K. B.; KOTHE, E. 2001. An instant preparation method for nucleic acids of filamentous fungi. <http://www.fgsc.net/fgn43/wendlan.html>. Última modificación 7/25/96.
- MIGHELI, Q.; GONZÁLEZ, C. L.; DEALESSI, L.; CAMPONOGARA, A.; VIDAL, D. 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the b-1,4 endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. Biological control 88: 673-677.
- PETERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D. 1994. Biochemical techniques for filamentous fungi. IMI technical handbooks No 1. p.19. CAB International.
- PFEIFER, T. A.; KHACHATOURIANS, G. G. 1992. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. Applied Microbiology and Biotechnology 38: 376-381.
- POSADA, F. J. 1998. Production, formulation and application of *Beauveria bassiana* for control of *Hypothenemus hampei* in Colombia. p. 227. Ascot, University of London. Imperial College of Science, Technology and Medicine, Department of Biology, (Tesis: Doctor of Philosophy).
- REIS, M.; HENNING, M.; LIMA, F. J.; RECH, E.; SCHRANK, A. 1996. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters 142: 123-127.
- SCREEN, S. E.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. 2001. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* over expressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. Journal of Invertebrate Pathology 78 (4):260-266.
- ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L. 1997. The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. p. 365-409. En: LACEY, L. A. (eds.) Manual of techniques in insect pathology. San Diego, Estados Unidos. Academic Press.
- ST. LEGER R. J.; BIDOCHKA M. J.; ROBERTS, D. W. 1994. Isoforms of the cuticle-degrading PR1 proteinase and the production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. Archives of Biochemistry and Biophysics 313: 1-7.
- ST. LEGER, R. J.; SHIMIZU, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; ROBERTS, D. W. 1995. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. FEMS Microbiology Letters 131: 289-294.
- ST. LEGER, R. J.; JOSHY, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. 1996. Construction of an

improved mycoinsecticide over expressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 6349-6354.

UPCHURCH, R. G.; MEADE, M. J.; HIGHTOWER, R. C.; THOMAS, R. S.; CALLAHAN, T. M. 1994. Transformation of the fungal soybean pathogen *Cercospora kikuchii*

with the selectable marker *bar*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4592-4595.

VALADARES-INGLIS, M. C.; INGLIS, P. W. 1997. Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviridae* strain CG423 to benomyl resistance. *FEMS Microbiology Letters* 155: 199-202.

VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, M.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Boletín Técnico Cenicafé* No. 17. 4-13.

Recibido: Dic. 15/2003

Aceptado: Jul. 05/2004