

Transformación de *Beauveria bassiana* cepa Bb9112 con los genes de la proteína verde fluorescente y la proteasa *pr1A* de *Metarhizium anisopliae*

Transformation of *Beauveria bassiana* strain Bb9112 with the genes from the green fluorescent protein and the protease *pr1A* of *Metarhizium anisopliae*

CARMENZA E. GÓNGORA B.¹

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 15-21 (2004)

Resumen. Con el propósito, en un futuro, de producir cepas mejoradas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, se desarrolló un sistema de transformación del hongo basado en la resistencia al herbicida glufosinato de amonio, conferida por el gen *bar*. Se transformó la cepa *B. bassiana* Bb9112, caracterizada por su resistencia a luz UV, con el plásmido pBarGPE1, en el cual se clonó previamente el gen marcador que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). La selección de las colonias transformantes se hizo en medio mínimo conteniendo 25 µg/ml del herbicida glufosinato de amonio. La expresión de la proteína GFP se confirmó por observaciones al microscopio de luz UV en los protoplastos transformados y el micelio regenerado de estos protoplastos luego de la transformación. Pruebas de patogenicidad indicaron que no existen diferencias significativas con respecto al porcentaje de patogenicidad de la cepa no transformada y las cepas transformadas con estos genes. Con el fin de aumentar la patogenicidad de la cepa Bb9112 contra la broca del café, se realizó la transformación de ésta con el plásmido pBarGPE1-*pr1A*, que contiene un gen de proteasa tipo subtilisina (*pr1A*) aislado de *Metarhizium anisopliae*. En la cepa transgénica la presencia del gen *pr1A* se identificó por PCR. La expresión de la proteína se confirmó por isoelectrofoque y actividad enzimática.

Palabras clave: Entomopatógeno. Gen marcador. Gen de selección. Patogenicidad. Broca del café.

Summary. In order to produce an improved strain of the entomopathogen *Beauveria bassiana*, fungus transformation system was developed based on resistance to the herbicide glufosinate ammonium, conferred by the *bar* gene. *B. bassiana* strain Bb 9112, characterized by its resistance to UV light, was transformed with the plasmid pBarGPE1, previously cloned with the marker gene coding for green fluorescent protein (GFP). Transformed colonies were selected in a minimal medium containing 25 µg/ml of the herbicide glufosinate ammonium. The expression of the protein GFP in the transformed protoplasts and the mycelium regenerated from those protoplasts was confirmed by UV light microscopy. Pathogenicity tests indicated no significant differences in percent pathogenicity between the transformed and non-transformed strains. In order to increase the pathogenicity of Bb9112 against the coffee berry borer, it was transformed with the plasmid pBarGPE1-*pr1A* containing a subtilisin - protease gene (*pr1A*) isolated from *Metarhizium anisopliae*. In the transgenic strain the presence of the *pr1A* gene was identified by PCR. The expression of the protein was confirmed by isoelectrofocuss and enzymatic activity.

Key words: Entomopathogen. Marker gene. Selection gene. Pathogenicity. Coffee berry borer.

Introducción

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* ha sido ampliamente usado como controlador biológico de insectos (Ferron 1978). Sin embargo, los experimentos de control biológico empleando hongos entomopatógenos han originado frecuentemente resultados inconsistentes y la tardanza en producción de mortalidad en comparación con insecticidas químicos ha detenido el desarrollo comercial de estos productos. Debido a esto, las consideraciones de la sostenibilidad de un hongo entomopatógeno con propósitos comerciales inevitablemente conlleva a mejorar su desempeño como biocontrolador.

En el caso del ecosistema cafetero colombiano, *B. bassiana* juega un papel importante en el control de *Hypothenemus hampei*; este hongo se encuentra infectan-

do naturalmente la broca del café 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 dosis de $1 \times 10^{8-12}$ esporas por árbol, las cuales causan 80-90% de mortalidad en los insectos (Posada 1998). Sin embargo, el uso de esta concentración de esporas es costoso y una de las formas de reducir el costo de estas dosis altas es aumentar la virulencia y patogenicidad de las cepas de *B. bassiana*. De esta manera, sería posible reducir la dosis de esporas requerida para controlar el insecto. Por otra parte, la mortalidad del insecto se obtendría más rápidamente, disminuyendo así el daño que causa el insecto a los frutos.

El primer paso para la producción de un hongo mejorado, a través de transformación genética, es el desarrollo de métodos eficientes de transformación y la manera

más apropiada de evaluar los métodos de transformación genética de un organismo es el uso de genes marcadores y genes de selección. Los genes marcadores codifican enzimas que no están presentes en las cepas no transgénicas; su expresión puede ser visualizada fácilmente sin el requerimiento de ensayos costosos o complicados enzima- sustrato. Las mediciones cuantitativas de los niveles enzimáticos son posibles y fáciles. La actividad específica de las proteínas no compete con otras enzimas presentes en las células y no interfiere con el metabolismo normal del organismo. Los genes de selección confieren resistencia a sustancias tóxicas, codificando productos que permiten la supervivencia de los organismos transformantes en medios tóxicos, que generalmente contienen antibióticos o herbicidas. Sólo los organismos transformantes tienen la habilidad de sobrevivir en estos medios.

1 Ph. D. Disciplina de Entomología, Cenicafé, Plan Alto, Chinchiná, Caldas, Colombia. Tel.: 68-506550 Ext. 332. E-mail: Carmenza.gongora@cafedecolombia.com

La transformación de *B. bassiana* con genes de selección y marcadores no sólo permitirá la identificación eficiente de las cepas transformadas, sino que también facilitará el seguimiento de los procesos de infección y patogenicidad de estas cepas en condiciones de laboratorio y campo. En laboratorio, un requerimiento clave en el estudio de la interacción entomopatógeno-hospedero es la habilidad de detectar el hongo dentro del tejido del insecto. Cepas transformadas conteniendo genes de selección o marcadores proveerán una nueva herramienta de detección y los medios para monitorear el desarrollo del hongo y la interacción con el hospedero. En el campo, estos genes permitirán la recuperación e identificación de cepas del hongo asperjadas en el campo, lo cual conllevará al entendimiento de los procesos de transmisión, infectividad y persistencia del hongo en el medio ambiente.

Como genes de selección, el gen *bar* se ha usado en sistemas de transformación de hongos entomopatógenos. El gen aislado de *Streptomyces hygroscopicus* confiere resistencia a los herbicidas bialafós y glufosinato de amonio. Los herbicidas en cuestión, contienen como ingrediente activo fosfinothricin, un análogo de ácido glutámico, el cual inhibe la actividad de la enzima glutamina sintasa, la cual causa muerte de las células por acumulación de amonio. El gen *bar* codifica la enzima fosfinothricin acetiltransferasa, la cual inactiva fosfinothricin al acetilarlo (Avalos *et al.* 1989).

Como gen marcador, el cDNA que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) (Chalfie *et al.* 1994), ha sido exitosamente expresada en un amplio número de organismos. Esta proteína aislada de *Aequorea victoria*, la cual confiere bioluminiscencia a invertebrados acuáticos del orden Cnidaria, está compuesta de 238 aminoácidos. El uso amplio de esta proteína se debe a su fácil identificación: oxígeno y luz azul o ultravioleta son los únicos requerimientos para visualizar la proteína. GFP ha sido expresada en hongos basidiomicetes como es el caso de *Ustilago maydis* (Spelling *et al.* 1996), y hongos filamentosos como *Aureobasidium pollulans* (Vanden Wymelenberg *et al.* 1997), *Cochliobolus heterostrophus* (Maor *et al.* 1998), y los entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus* (Cantone y Vandenberg 1999) y *Metarhizium anisopliae* (Inglis *et al.* 2000) y no se ha manifestado que tenga efectos negativos en el hongo o interfiera con sus procesos patogénicos.

La literatura menciona la transformación de *B. bassiana* con genes de selección como es el caso del gen de β tubulina resistente a (MBC) aislado de *Neurospora crassa*, el cual confiere resistencia al fungicida 1,2 benzimidazol carbamato (MBC) (Pfeifer, y Khachatourians 1992). De igual forma, Daboussi *et al.* (1989) demuestran la transformación del hongo con el gen *nia* D. Thorvilson y San Francisco (2001) registran el uso del gen β

glucoronidasa (GUS) como gen marcador en un sistema de transformación de *B. bassiana*. Sin embargo, hasta ahora no se ha indicado la transformación de este hongo con GFP, *bar* o genes involucrados en procesos de patogenicidad.

Luego del desarrollo de un sistema eficiente de transformación, el siguiente paso consiste en la producción de cepas con incremento en su patogenicidad. St. Leger y colaboradores (1996) han clonado varios genes que están involucrados en los procesos de infección y patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*. Uno de los genes que se expresan cuando el insecto es atacado, codifica una proteasa tipo subtilisina denominada *Pr1A*, la cual solubiliza la cutícula proteínica del insecto, permitiendo la penetración de las hifas del hongo en el insecto y el acceso a los nutrientes necesarios para su crecimiento.

La transformación de *M. anisopliae* con *pr1A* (St. Leger *et al.* 1996, 1997) resultó en el desarrollo de un hongo entomopatógeno mejorado genéticamente. Cuando la cepa fue transformada y copias adicionales del gen codificando esta proteasa fueron insertadas en el genoma del hongo, la cepa resultante produjo la proteína durante el proceso de infección y colonización del insecto, y ésta fue también secretada por el hongo en la hemolinfa del insecto *Manduca sexta*. La presencia de esta proteína en la hemolinfa, activó en éste el sistema inmunológico de fenoloxidasas. El efecto tóxico combinado de *pr1A* junto con los productos de la reacción de fenoloxidasas causó, en los insectos expuestos al hongo transformado, una reducción del 25% en el tiempo de muerte y reducción de 40% en el consumo de alimento, comparado con los insectos infectados con el hongo no transgénico. Además, los insectos infectados con el hongo transformado mostraron una rápida mecanización y los cadáveres resultantes fueron un sustrato pobre para la esporulación del hongo.

El objetivo de este estudio fue llevar a cabo la modificación genética de *B. bassiana* empleando vectores de transformación para hongos, que contienen como marcadores selectivos el gen *bar* y el gen marcador que codifica GFP y la proteasa *pr1A*. Las cepas obtenidas serán usadas para realizar, en condiciones de laboratorio, el seguimiento de los procesos de infección y patogenicidad hongo vs. insecto y dilucidar los procesos de transmisión, infectividad y persistencia del hongo en condiciones de campo. Este estudio permitirá investigar el mantenimiento, estabilidad, proliferación y los efectos patogénicos de *B. bassiana* a través del uso de estos genes. Se cree que los genes marcadores selectivos no deben tener efecto alguno sobre la patogenicidad del hongo a menos que debido al sitio de inserción en el genoma, puedan interferir con algún gen involucrado en los procesos de patogenicidad. Este trabajo permitirá dilucidar esta afirmación.

Materiales y Métodos

Ingeniería de los vectores de transformación

El vector de transformación pBarGPE1 (Pall 1993) se obtuvo del Fungal Genetics Stock Center, Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center. El plásmido se extrajo y purificó de cultivos de *E. coli*.

El gen de la proteasa tipo subtilisina *pr1A* de *M. anisopliae* var. *acridum*, identificada en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (USA) con el número de acceso AJ251925.1 se obtuvo del Dr. Ray St-Leger, Departamento de Entomología, University of Maryland, College Park, MD, USA. El gen había sido previamente clonado en el sitio múltiple de clonación del vector pBluescript SK (pBS) (Stratagene, La Jolla) entre los sitios de restricción EcoRI y Xho I. El plásmido se amplificó y el gen *pr1A* se separó del plásmido pBS por digestión con las enzimas de restricción Sma I y BamH I. Luego fue ligado en el sitio múltiple de clonación del vector pBarGPE1 bajo el control del promotor de *gpdA* y la región terminadora del gen *trpC* (ambos provenientes de *Aspergillus nidulans*), generándose el vector de transformación pBarGPE1-*pr1A*. Células competentes de *E. coli* se transformaron con la solución de la ligación, las colonias bacterianas que contenían el plásmido recombinante se identificaron y el plásmido se amplificó y secuenció. Los resultados de la secuencia mostraron que el gen estaba correcto.

El gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) se clonó en el vector pBarGPE1 de la misma manera descrita para la proteasa *pr1A* y fue obtenido del Dr. Ray St-Leger.

Cepa de *Beauveria bassiana*

La cepa de *B. bassiana* Bb9112 aislada en Caldas, Colombia, de un lepidóptero de la familia Geometridae, se escogió para desarrollar los trabajos de transformación debido a que mostraba una patogenicidad superior al 85% contra la broca del café y resistencia a luz U.V.

Producción de protoplastos

Esporas obtenidas a partir de un cultivo del hongo crecido en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) por 15 días a 27°C, se resuspendieron en 10 ml de Tween estéril al 0,02%. Con esta suspensión se inocularon 100 ml de Líquido Sabouraud Dextrosa (LSD) suplementado con 0,1% de extracto de levadura. El cultivo creció a 27°C y 120 rpm por 36 h. El micelio se recuperó por filtración a través de una capa de miracloth estéril y se lavó con agua desionizada estéril. El micelio se incubó por 3h, en agitación lenta en 20 ml de una solución 1,2 M sorbitol y 50 mM MES, que contenía 0,8% Novozyma 234 y 0,3% B-glucuronidasa. La presencia de protoplastos se verificó por observaciones al

microscopio. La solución de micelio y protoplastos se filtró, a través de una capa de miracloth estéril y los protoplastos se precipitaron por centrifugación a 2.000 *gpm* y 4°C, posteriormente se lavaron 2 veces por resuspensión y centrifugación en 20 ml de solución osmótica STC (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 20 mM CaCl₂). Finalmente, los protoplastos se resuspendieron a una concentración de 1x10⁸ protoplastos/ml de STC, obteniéndose 1 a 5 ml de protoplastos en total.

Transformación de *Beauveria bassiana* con los vectores pBarGPE1-*pr1A*, pBarGPE1-GFP

La transformación del hongo con pBarGPE1-*pr1A*, y pBarGPE1-GFP se hizo usando una solución de 200 μ l de protoplastos a 1 x 10⁸ protoplastos/ml. A ésta se adicionaron 50 μ g de DNA plasmídico en un volumen de 50-100 μ l, se incubó en hielo por 30 min. Luego, se agregaron 50 μ l de polietilenglicol₃₀₀₀ (PEG) al 60%, en STC y se incubó en hielo por 10 min. Finalmente, se adicionó 1 ml de la solución de PEG y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La solución se resuspendió en 4 ml RM (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄ y 0,3% NaNO₃), para obtener un volumen final de 5 ml de transformantes. Estos 5 ml de transformantes se dividieron en 2 tubos falcon de 50 ml conteniendo cada uno 2,5 ml; a cada tubo se le adicionaron 47,5 ml de RM líquido con Bacto-agar al 1%, a una temperatura de 35°C. 10 ml de esta solución se sirvieron en cajas de Petri. Estas cajas, con los protoplastos transformantes en medio mínimo, se incubaron por 18 a 24 h y luego se cubrieron con 10 ml de RM con Bacto-agar al 1% y glufosinato de amonio a una concentración final de 25 μ g/ml [Finale (5% ingrediente activo) AgrEvo USA. Wilmington DE].

Evaluación de las colonias de *B. bassiana* transformadas

Identificación de los genes de transformación por PCR. En las colonias transformantes, se identificó la presencia de los genes *bar*, *pr1A* y GFP, por amplificación usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las cepas se aislaron y crecieron en medio LSD con adición de 0,1 % de extracto de levadura y glufosinato de amonio. El micelio se recuperó por filtración al vacío, se lavó y maceró en nitrógeno líquido. La extracción de DNA se llevó a cabo siguiendo el método de Jürgen *et al.* (1999).

Los genes se amplificaron con reacciones de PCR en un volumen de 50 μ l, conteniendo 500 ng de ADN fúngico, 1X PCR buffer, 25 pmoles de iniciadores, 0,2 mM de cada deoxinucleótido, 2,0 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerasa. Ciclo de PCR: 94°C x 5 min, 94°C x 1 min, 55°C x 1 min, 72°C x 1 min, (40 ciclos), 72°C x 5 min.

Las secuencias de los iniciadores que se usaron para la amplificación fueron:

```
Gen bar: 5'-3' ATGCGCCCAGAACGACGCC. 3'-5' GCAGGACCGGACGGGGCG
Gen pr1A: 5'-3' TCTTCTCACTTCTCCCA. 3'-5' TTAGGCACCGTTGTAGGCA
GFP: 5'-3' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
3'-5' TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
```

Las reacciones de PCR, se corrieron en geles de agarosa al 1% y tras observación bajo luz UV se determinó la presencia de las bandas con un tamaño molecular correspondientes al esperado para cada gen.

Identificación de las proteínas *pr1A* en las cepas transformadas

Medición de la actividad enzimática proteolítica por espectrofotometría. Los niveles de proteasas totales producidas por las colonias transformadas y no transformadas se cuantificaron a través de ensayos de actividad enzimática. Para esto, las colonias se sembraron en medio ASD. Inóculos de esporas procedentes de colonias transformadas y no transformadas, obtenidos de un cultivo de 15 días, se recolectaron y con éstas, se inocularon 50 ml de medio mínimo esterilizado (0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄, 50% agua de grifo) suplementado con 1% (p/v) de quitina de caparazón de cangrejo (Sigma) y 50 ml de medios básicos suplementado con 1% (p/v) de quitina de caparazón de cangrejo más 1% de N-Acetil glucosamina (Sigma). Los cultivos se incubaron en agitación a 120 rpm por 72 h; 200 μ l de una muestra del cultivo se tomaron cada 12 h. La actividad proteolítica se evaluó usando como sustrato el péptido succinil-(alanina) 2-prolil-fenilalanina (Sigma) (St.Leger *et al.* 1987). Para esto, a 90 μ l de 0,1 M Tris HCL a pH 8,0 se adicionaron 10 μ l de la muestra libre de solutos y 8 μ l del sustrato al 1 mM in DSO. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro a 405 DO.

Identificación de proteasas por isoelectroenfoque (IEF)

La presencia de las proteínas y su actividad proteolítica también se determinó a través de separación de las proteínas por electroforesis de isoelectroenfoque (IEF) y degradación de gelatina (Bidochka y Khachatourians 1994). Para esto, las cepas de *B. bassiana* transformadas y no transformadas crecieron en medio mínimo líquido, suplementado con 1% (p/v) de quitina de caparazón de cangrejo o quitina al 1% (p/v) más N-acetilglucosamina al 1% (p/v) durante 48 horas. 25 ml del medio de cultivo se concentraron por ultracentrifugación usando unidades de ultrafiltración Centricon con membranas de exclusión de 10kDa (Amicon). Se preparó un gel de poliacrilamida al 5% más anfolitos 3/10 Bio-lyte al 2%. 2 ml de las muestras concentradas se aplicaron sobre el gel y se separaron por isoelectroenfoque usando una cámara mini-IEF-cell modelo 111 (Bio-Rad). La separación se llevó a cabo a 100 V por 15 min, seguido de 200 V por 15 min y 450 V por 1 h. La presencia de las proteasas se

visualizó al poner en contacto el gel con una película para radiografía, la cual está recubierta de una capa de gelatina.

Pruebas de patogenicidad cepas transformadas con la proteína verde fluorescente

Se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad, con las cepas transformadas con la proteína verde fluorescente. Las cepas transformadas crecidas en medio ASD más glufosinato de amonio a una concentración de 25 μ g/ml y las cepas control no transformadas se sometieron a control de calidad, de tal manera que se evaluaron las siguientes características: 1) germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 h, 2) porcentaje de pureza mayor del 90%. La germinación, la pureza y viabilidad, así como las pruebas de patogenicidad (15 individuos por tratamiento con 4 repeticiones) se determinaron siguiendo el método descrito por Vélez *et al.* (1997).

Resultados y Discusión

Cepas transformadas con la proteína verde fluorescente

Luego de la transformación, se observó la solución de protoplastos putativamente transformados bajo el microscopio y se detectó la presencia de protoplasto verde fluorescente (Fig. 1). De 5-10 días luego de la transformación, las colonias putativamente transformadas empezaron a desarrollarse en el medio selectivo (Fig. 2). Inicialmente, dos colonias crecidas en medio mínimo con 25 μ g/ml del glufosinato de amonio, que mostraron fluorescencia verde bajo el microscopio de luz-UV, fueron subcultivadas en SDA. El crecimiento de las colonias se siguió diariamente. Cuan-

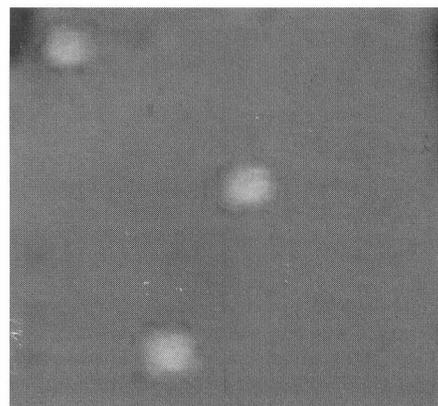


Figura 1. Expresión de GFP en protoplastos transformados de *Beauveria bassiana* Bb 9112 con el plásmido pBarGPE-GFP. Microscopía con luz UV (40x).

do se observó la esporulación de los cultivos, las esporas se subcultivaron en medio fresco. Los subcultivos se hicieron por 3 generaciones. En la tercera generación, se aisló el DNA genómico del micelio y una amplificación por PCR de los genes *bar* y GFP se realizó usando iniciadores específicos para cada uno de éstos. Ambos genes se amplificaron por PCR en las cepas transgénicas pero no en el tipo silvestre Bb9112 (Fig. 3). En las cuatro cepas transformadas, identificadas como T1-1, T1-2, T2-2 y T2-3, el gen GFP se amplificó por PCR (Fig. 4). En el micelio de las 4 cepas, la expresión de la proteína GFP se confirmó por observaciones al microscopio de luz UV. Sin embargo, el grado de expresión de la proteína verde fluorescente no es el mismo en todo el micelio y en algunos casos

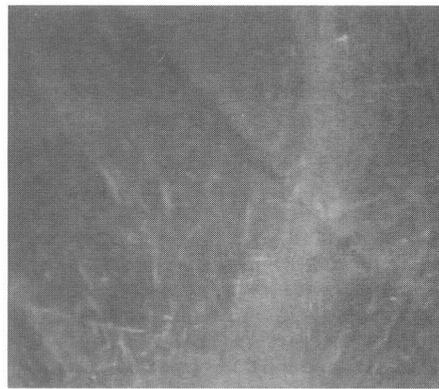


Figura 2. Expresión de GFP en una colonia transformada de *Beauveria bassiana* Bb 9112 con el plásmido pBarGPE-GFP. Microscopía con luz UV (2,5x).

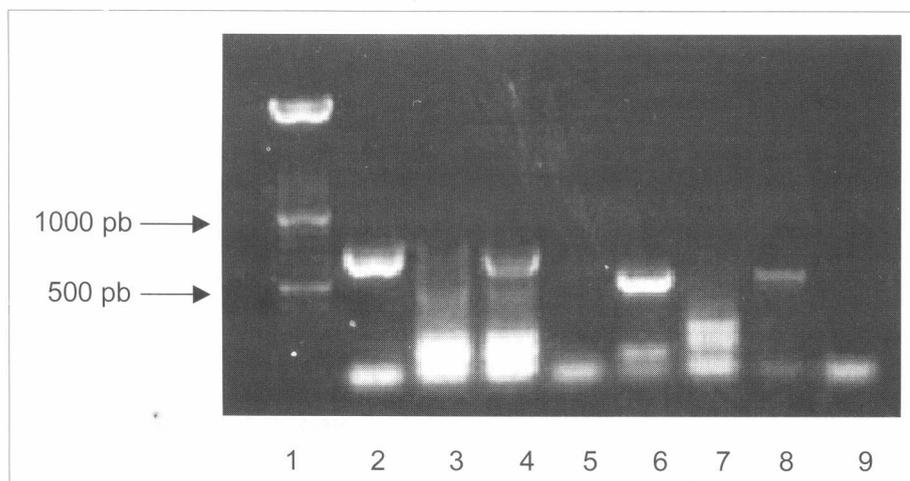


Figura 3. Separación en agarosa de los productos de PCR de los genes GFP y *bar* amplificados en cepas de *B. bassiana* transformadas con pBarGPE1-GFP. Una banda de 742 pb indica la presencia del gen GFP. Una banda de 537 pb indica la presencia del gen *bar*. Líneas 2 a 5 contienen las muestras amplificadas con los iniciadores para GFP. Línea 1 fue cargada con 500 ng de DNA marcador de peso molecular XIV (Boehringer). Línea 2 contiene la reacción del plásmido pBarGPE1-GFP. Línea 3 fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea 4 fue cargada con la reacción de una cepa transgénica. Línea 5 fue cargada con la solución maestra sin DNA. Líneas 6 a 9 contienen muestras amplificadas con iniciadores del gen *bar*. Línea 6 fue cargada con la reacción de pBarGPE1-GFP. Línea 7 fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea 8 fue cargada con la reacción de una cepa transgénica. Línea 9 fue cargada con solución maestra sin DNA.

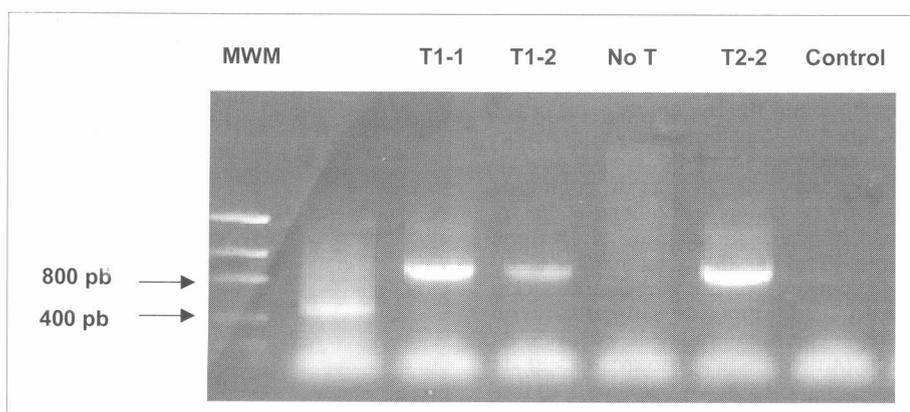


Figura 4. Separación en agarosa de los productos de PCR de los genes GFP en cepas de *B. bassiana* transformadas con pBarGPE1-GFP. Una banda de 742 pb indica la presencia del gen GFP. Línea MWM fue cargada con 500 ng de DNA marcador de peso molecular (Low DNA Mass ladder) (Gibco). Línea T1-1, T1-2 y T2-2 contiene la amplificación de cepas transformadas. Línea NT fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea Control fue cargada con la solución maestra sin DNA.

se observan partes de micelio y esporas que no expresan la proteína; esto se puede deber a vejez del micelio, o a que los cultivos no son puros. Por esta razón, se ha iniciado un proceso de producción de cultivos monoespóricos a partir de estas cepas transformantes, con el propósito de producir cultivos puros que expresen la proteína de una manera uniforme. Estos cultivos están siendo sometidos a pruebas de control de calidad y patogenicidad sobre la broca del café.

Patogenicidad de las cepas que expresan la proteína verde fluorescente

Se realizaron pruebas de patogenicidad por duplicado en diferentes épocas del año, evaluando las diferencias estadísticas entre las cepas Bb9112 no transgénicas y dos cepas transformadas con la proteína GFP, cepas T1-1 y T2-2. Los resultados se muestran en las tablas 1, 2 y 3. El análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%, y la prueba de Tukey, mostró que no existen diferencias significativas con respecto al porcentaje de patogenicidad sobre la broca del café causado por *B. bassiana* Bb9112 y las cepas transformadas. Tampoco se observaron diferencias con respecto al tiempo de mortalidad ni el comportamiento de las cepas. Esto indica que la inserción de los genes se produjo en lugares en el genoma que no interfieren con genes involucrados en los procesos de patogenicidad del hongo. En el caso de estudios preliminares, Thorvilson y San Francisco (2001) muestran que las cepas transformadas con el gen GUS fueron menos efectivas en matar a los insectos en condiciones de laboratorio; los autores aseguran que esto se puede deber al sitio de inserción del gen GUS en el genoma del hongo, el cual puede interferir con algún gen involucrado en la patogenicidad. En el presente estudio, el proceso de transformación con los genes marcadores no afectó los procesos patogénicos de las cepas.

Las cepas obtenidas en este estudio, transformadas con GFP pueden usarse en laboratorio para estudios de la interacción entomopatígeno-hospedero, ya que sería fácil la detección del hongo dentro del tejido del insecto. Por otra parte, se demuestra que estos genes no interfieren con los procesos patogénicos del hongo. Al nivel de campo, estas cepas marcadas permitirían monitorear el desarrollo del hongo y la interacción con el hospedero. En las pruebas de campo, la identificación de estos genes permitirá la recuperación de cepas asperjadas, lo cual conllevará al entendimiento de los procesos de transmisión, infectividad y persistencia del hongo en el medio ambiente.

Cepas transformadas con la proteasa *prIA*

Después de obtener transformantes expresando GFP, se realizó la transformación con el plásmido pBarGPE-*PrIA*. Los transformantes se seleccionaron por resistencia a

Tabla 1. Resultados de patogenicidad de *B. bassiana* Bb9112 y Cepa T1-1 sobre *H. hampei*

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad por <i>B. bassiana</i>	Porcentaje de mortalidad por otras causas	Porcentaje de mortalidad por contaminación	Tiempo de mortalidad
Bb9112	80 A*	8,33	5	6,22
Bb9112-T1-1	88 A*	1,6	8	6,02
Testigo	0 B*	18,0	3,3	0

* Tratamientos identificados con la misma letra no difieren estadísticamente.

Tabla 2. Resultados de patogenicidad de *B. bassiana* Bb9112 y Cepa T1-1 y T2-2 sobre *H. hampei*

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad por <i>B. bassiana</i>	Porcentaje de mortalidad por otras causas	Porcentaje de mortalidad por contaminación	Tiempo de mortalidad
Bb9112	80 A*	10	8	5,12
Bb9112-T1-1	88 A*	1,6	8	5,40
Bb9112-T2-2	88 A*	5	10	5,18
Testigo	6,66 B*	30	1,66	10

* Tratamientos identificados con la misma letra no difieren estadísticamente.

Tabla 3. Resultados de patogenicidad de *B. bassiana* Bb9112 y Cepa T2-2 sobre *H. hampei*

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad por <i>B. bassiana</i>	Porcentaje de mortalidad por otras causas	Porcentaje de mortalidad por contaminación	Tiempo de mortalidad
Bb9112	80 A*	8,3	5	6,03
Bb9112-T2-2	76,7 A*	11,6	6,6	6,22
Testigo	0 B*	18,0	3,33	0

* Tratamientos identificados con la misma letra no difieren estadísticamente.

25 μ g/ml de glufosinato de amonio. De 5 a 10 días luego de la transformación, diez colonias se aislaron de los medios selectivos y tres de estas colonias (*pr1A-1*, *pr1A-2* y *pr1A-3*) se seleccionaron para la identificación de la proteína *Pr1A*.

La actividad enzimática de las muestras se observa en la figura 5. Todas las cepas incluyendo el control (Bb9112 no transformado) produjeron una proteasa similar a la *Pr1A* de *M. anisopliae* durante el crecimiento en el medio con quitina, la cual induce la producción de *Pr1A*. Sin embargo, solamente las cepas transformadas produjeron proteasas cuando se cultivaron en el medio que contenía quitina más N-Acetil-glucosamida. En este medio, la N-Acetil-glucosamida reprime la síntesis de proteasa tipo *Pr1A* en cepas no modificadas. El resultado del experimento, implica que el *pr1A* se incorporó en el genoma de los transformantes y la proteína se sintetizó y secretó constitutivamente. Cuando se analizó por isoelectroenfoque y se identificó la actividad proteolítica, los medios de cultivo suplementados con 1% de quitina o 1% de la quitina más 1% de N-Acetil-glucosamina, donde habían crecido el hongo control y el transformado (*pr1A-2*), se encontró que la mayor cantidad de proteasas la produjo la cepa *Pr1A-2* creciendo en medio con quitina y N-Acetil-glucosamina. Este resultado confirma la

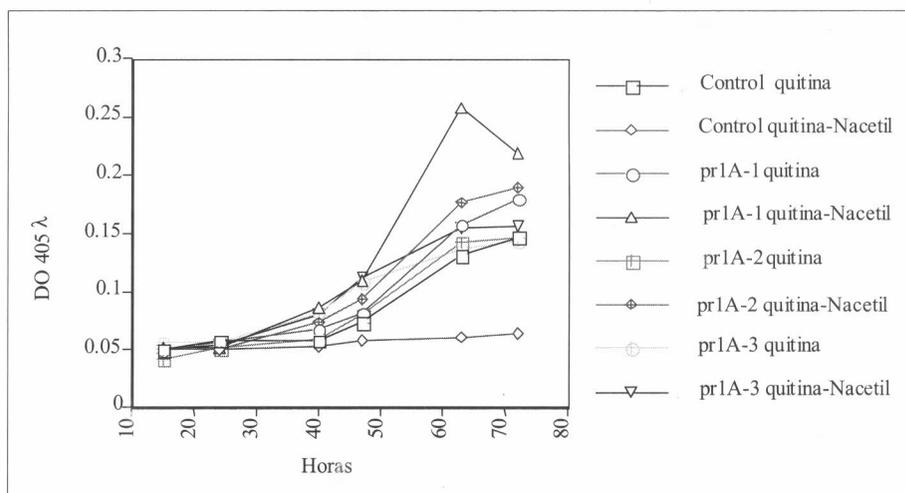


Figura 5. Actividad enzimática de *pr1A* a diferentes tiempos en la cepa Bb 9112 (control) y 3 cepas transformadas con pBarGPE1-*pr1A* en medio mínimo suplementado con quitina o quitina más N-acetil glucosamida.

transformación de la cepa y la producción constitutiva de la proteasa (Fig. 6).

La cepa *Pr1A-1* se subcultivó y luego de dos generaciones, el ADN genómico se aisló del micelio. Iniciadores específicos se usaron para la amplificación de los genes *bar* (no se muestra los datos) y *pr1A* (Fig. 7). Ambos genes se amplificaron en la cepa

transgénica pero no en el tipo silvestre 9112. La presencia del gen *pr1A* amplificado por PCR también se observa en las cepas *Pr1A-2* y *Pr1A-3* (Fig. 8). Se tienen 3 cepas transformadas con este gen.

La transformación de *B. bassiana* con los genes *bar-GFP* y *bar-pr1A* demuestra que se cuenta con un método de transforma-

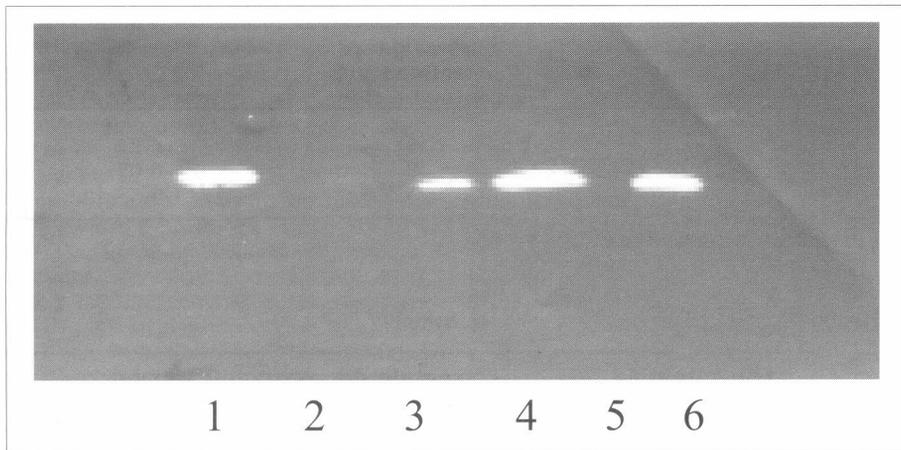


Figura 6. Actividad proteolítica del filtrado del cultivo de *B. bassiana* (Las proteasas presentes en el gel de isoelectroenfoque degradan la gelatina de la película, y se observa un halo transparente que indica actividad proteolítica específica de proteasa). Cepa Bb 9112 en medio básico suplementado con quitina (Línea 1 y 5) y medio básico suplementado con quitina más N-Acetil Glucosamida (Línea 2 y 6). Cepa *pr1A-2* transformada con pBarGPE1-*pr1A* en medio básico suplementado con quitina (Línea 3) y medio básico suplementado con quitina más N-Acetil Glucosamida (Línea 4).

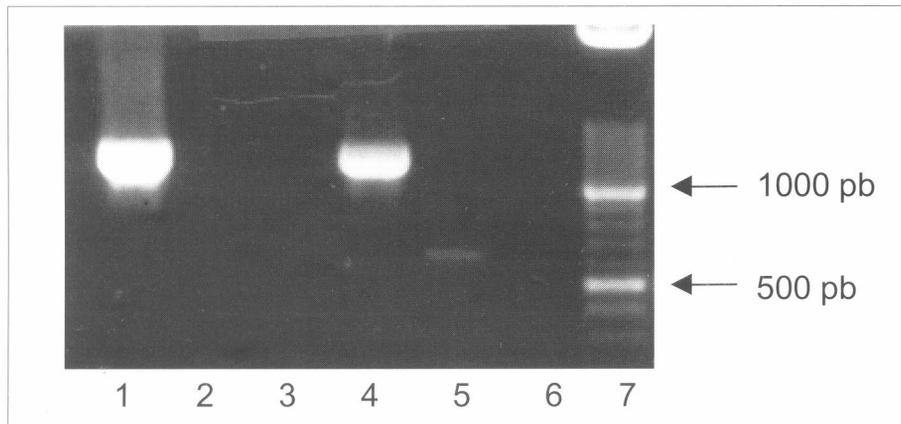


Figura 7. Separación en agarosa del gen *pr1A* amplificado por PCR. Una banda de 1189 bp indica la presencia del gen. Línea 1 contiene la reacción de PCR del plásmido pBarGPE1-*pr1A*. Línea 2 fue cargada con la reacción del plásmido pBarGPE-GFP. Línea 3 fue cargada con la reacción de la cepa no transformada 9112. Línea 4 contiene la reacción de la cepa *pr1A-1*. Línea 5 contiene la reacción de una cepa transformada con pBarGPE-GFP. Línea 6 contiene solución maestra sin DNA. Línea 7 contiene 500 ng de ADN marcador de peso molecular XIV (Boehringer).

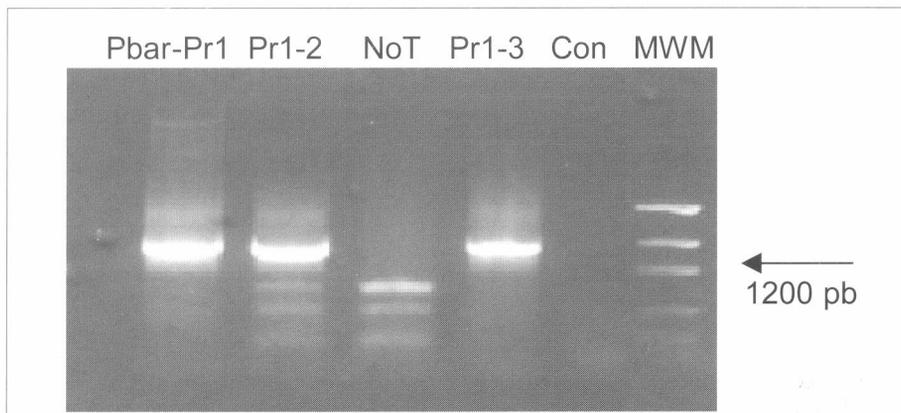


Figura 8. Separación en agarosa del gen *pr1A* amplificado por PCR. En cepas de *B. bassiana*. Una banda de 1189 pb indica la presencia del gen. Línea Pbar-Pr1 contiene la reacción del plásmido pBarGPE-GFP. Líneas pr1-2 y pr1-3 contiene la reacción de las cepas transformadas *pr1A-2* y *pr1A-3* respectivamente. Línea NoT fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea Con fue cargada con la solución maestra sin DNA. Línea MWM fue cargada con 500 ng de DNA marcador de peso molecular (Low DNA Mass ladder) (Gibco).

ción confiable y la selección con el gen *bar* es adecuada. Hasta el momento este es el primer trabajo que muestra el uso de estos genes para la transformación de *B. bassiana*.

Conclusiones

- Se logró llevar a cabo la modificación genética del hongo. Se cuenta con un método de transformación eficiente para *Beauveria bassiana*.
- El gen de selección (*bar*) y el gen marcadores GFP no afectan el grado de patogenicidad ni el comportamiento de las cepas de *B. bassiana* contra la broca del café.
- Estas cepas transgénicas se pueden usar para el seguimiento de los procesos de infección y patogenicidad sobre la broca del café en condiciones de laboratorio y campo. El siguiente paso es hacer el control de calidad de estas cepas y las pruebas de patogenicidad sobre la broca del café.

Agradecimientos

La autora agradece al Dr. Ray St. Leger por permitir el uso de los genes y a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y Colciencias por el apoyo financiero dado a este trabajo.

Literatura citada

- AVALOS, J.; GEEVER, R. F.; CASE, M. E. 1989. Bialaphos resistance as a dominant selectable marker. *Current Genetics* 16: 369-372.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. 1994. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 7-13.
- CANTONE, F. A.; VANDENBERG, J. D. 1999. Use of the green fluorescent protein for investigation of the *Paecilomyces fumosoroseus* in insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 193-197.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- DABOUSSI, M. J.; DJEBALLI, A.; GERLINGER, C.; BLAISEAU, P. L.; BOUVIER, I.; CASSAN, M.; LEBRUN, M. H.; PARISOT, D.; BRYGOO, Y. 1989. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* 15:453-456.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insects pests by entomopathogen fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
- INGLIS, P. W.; ARAGÃO, F. J. L.; FRAZÃO, H. B.; MAGALHÃES, VALADARES-INGLIS, P. M. C. 2000. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiology Letters* 191: 249-254.
- JÜRGEN, W.; LENGELER, K. B.; KOTHE, E. An instant preparation method for nucleic

- acids of filamentous fungi. <http://www.fgsc.net/fgn43/wendlan.html>. Fecha último acceso: Diciembre 1999.
- MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B. A.; SHARON, A. 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research* 102: 491-496.
- PALL, M. L.; BRUNELLI, J. P. 1993. A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites. *Fungal Genetics Stock . Fungal Genetics News Letter* 40: 49-62. <http://www.fgsc.net/fgn/pall.html>. Fecha último acceso: Diciembre 1999.
- 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. Ascot, University of London. Imperial College of Science, Technology and Medicine, Department of Biology, 227 p. (Tesis: Doctor of Philosophy).
- SPELLING, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular General of Genetics* 25: 503-509.
- ST. LEGER R. J. 1987. Characterisation of cuticle-degrading enzymes produced by the entomopathogens *Metarhizium anisoplae*. *Archives of Biochemistry and Biophysical* 253: 221-232.
- ST. LEGER, R. J.; JOSH, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Science* 93: 6349-6354.
- ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends in Biotechnology* 15: 83-95.
- THORVILSON, H.; SAN FRANCISCO, M. 2001. *Beauveria bassiana* as a Biocontrol Agent Against the Red Imported Fire Ant. <http://fireant.tamu.edu/research/ProgressReports/October2001/Thorvilson1.pdf>. Fecha último acceso: Agosto 2001.
- VANDEN WYMELENBERG, A. J.; CULLEN, D.; SPEAR, R. N.; SCHOENIKE, B.; ANDREWS, J. H. 1997. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. *Biotechniques* 23: 686-690.
- 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* 17: 4-13.

Recibido: Jun. 30/2002

Aceptado: Mar. 06/2003