

GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA LA TRANSFORMACIÓN Y EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*

Ma. Elena Zavala, Alfredo Herrera-Estrella, Martha Bibbins. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla km 1.5, Tepetitla, Tlaxcala. CP 90700. Fax: 01 (248) 4870765. marthadbm1104@yahoo.com.mx

Palabras clave: Control Biológico, *Metarhizium*, proteasas

Introducción. El control biológico se ha considerado como una alternativa viable frente al uso de insecticidas químicos, por los efectos tóxicos y el conocido daño que producen estos últimos en animales y humanos. Dentro de los agentes de control biológico, los microinsecticidas representan por sí solos, o en combinación con los insecticidas químicos, una opción para el control de plagas. Sin embargo es necesario contar con cepas que presenten características de patogenicidad mejoradas con la finalidad de poder competir contra un buen insecticida de origen químico. Existen diferentes reportes que indican que las proteasas producidas por hongos entomopatógenos se encuentran dentro de las principales enzimas que definen la patogenicidad.

Los objetivos del presente trabajo fueron la construcción de vectores que contienen el gen de la proteasa bajo la regulación de dos promotores que permiten altos niveles de expresión de este gen y la generación de cepas mejoradas de *Metarhizium anisopliae*.

Metodología. La cepa GMV702 de *M. anisopliae* fue mantenida en PDA a 29°C y esporulada a temperatura ambiente con fotoperiodos 12:12. Los plásmidos utilizados para las clonaciones fueron pCR2.1 TOPO (Invitrogen) y pBHT2 (Cinvestav, U. Irapuato). Amplificaciones por PCR de la secuencia del gen de proteasa de *M. anisopliae* fueron hechas a partir de DNA genómico (1), con los oligos: AH-G131/G-1494. Las extracciones de DNA plasmídico fueron hechas según Birboim y Dolly (2). Las amplificaciones del promotor mínimo *prb1* y del promotor constitutivo *pki*, fueron utilizando los oligos AH-G133/AH-G134 y EUEN/G-1495, respectivamente. EcoRI, BamHI y PstI fueron utilizadas para los análisis de restricción. La transformación por *Agrobacterium* fue siguiendo el protocolo (3). Las transformantes fueron evaluadas mediante ensayos cualitativos de actividad de proteasas en medio sólido.

Resultados y Discusión. Dos diferentes construcciones fueron generadas en el plásmido Ti pBHT2 mediante la amplificación y clonación del gen de proteasa *pr1A* de *M. anisopliae*, bajo el control de los promotores: *pki* (promotor constitutivo del gen de la piruvato kinasa de *Trichoderma reesei*), y *prb1* (promotor mínimo de la proteasa de *T. harzianum*) (Fig. 1). La cepa de *M. anisopliae* fue transformada con dichas construcciones vía *Agrobacterium tumefaciens* y la actividad de proteasa modificada se determinó en placa.

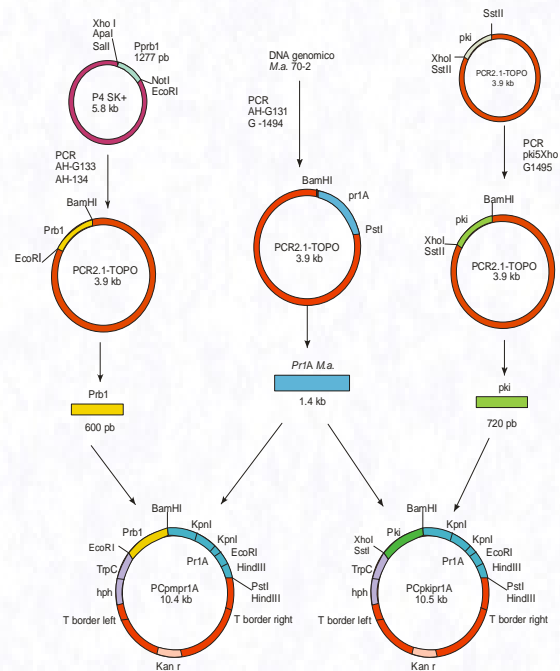


Fig. 1. Generación de vectores de transformación: pCmpriA y pCkpiA.

Conclusiones. La generación de vectores que contengan genes insecticidas bajo una región promotora que permita tener altos niveles de expresión de estos genes de forma controlada, abre la puerta para generar cepas mejoradas y con esto, la posibilidad de producir un microinsecticida más potente para ser empleado en el control de insectos que atacan cultivos de importancia económica, como la Broca del Café.

Agradecimiento. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

Bibliografía.

1. Raeder, U. y Broda, P. 1985. Rapid Preparation of DNA From Filamentous Fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 17-20.
2. Birboim, H. y Doly, J. 1979. Extraction Procedure For Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6):1513-1523.
3. Fang, W., Zhang, Y., y Yang, X. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *J. Inver. Path.* 85: 18-24.