

Tesis de Posgrado

Dos nuevos genes de *Beauveria bassiana* : Una quitonasa y una proteína de transporte que podrían estar relacionados con la patogenicidad

Berretta, Marcelo Facundo

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Berretta, Marcelo Facundo. (2001). Dos nuevos genes de *Beauveria bassiana* : Una quitonasa y una proteína de transporte que podrían estar relacionados con la patogenicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3397_Berretta.pdf

Cita tipo Chicago:

Berretta, Marcelo Facundo. "Dos nuevos genes de *Beauveria bassiana* : Una quitonasa y una proteína de transporte que podrían estar relacionados con la patogenicidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3397_Berretta.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DOS NUEVOS GENES DE *Beauveria bassiana*:
-UNA QUITOSANASA Y UNA PROTEÍNA DE TRANSPORTE-
QUE PODRÍAN ESTAR RELACIONADOS CON LA PATOGENICIDAD**

AUTOR: Lic. MARCELO FACUNDO BERRETTA

DIRECTOR: Dr. OSCAR GRAU

**Tesis para optar al título de DOCTOR de la
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

2001

Nº 3 3 9 7 .3

Dedico este trabajo a
mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar Grau, por su guía y su apoyo permanentes.

Al Dr. Roberto Lecuona, por brindarme su experiencia y su consideración.

A ambos, por su confianza y por la oportunidad recibida.

Al Dr. Rubén Zandomeni, por su generoso aporte cotidiano a la realización de este trabajo, y por sus enseñanzas.

A la Dra. Leticia Alvarado, por su excelente predisposición.

A los Dres. Osvaldo Rosetti y Héctor Torres, por su deferencia en permitirme utilizar instalaciones de los institutos bajo su dirección.

A Nancy López, Irma Fuxa, Roberto Civitillo (CNIA-INTA Castelar) por su colaboración.

Al personal del Insectario y del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (IMYZA), por su asistencia y cooperación.

A Estela Favret, por los pedidos de bibliografía.

A todo el personal del IMYZA y de la administración del ex-CICA, por el trato recibido.

A Selma Gago-Zachert (IBBM, La Plata), por su gran ayuda durante estos años.

A Mario Poli, Francisco Sacco, Claudio Robredo (Instituto de Genética) y María Rosa González (CNIA), por los favores recibidos.

A mis compañeros Federico, Paula, Silvia, Juana, Gustavo, Natalia, Livio, Carla, Graciela, Dana y Muriel, por su paciencia y su cooperación.

A Alicia Cap, por el privilegio de contar con su consideración profesional y personal.

A mis amigos Félix Atencio y Julio Edelstein, por todo lo compartido.

A mis amigos Ricardo Dewey y Alberto Díaz Añel, por sus consejos y por transmitirme su experiencia.

A Pedro Miscow, por su diligencia y su generosidad.

A Gabriela Pacheco, por el esfuerzo compartido y por su acompañamiento.

A mi familia, por todo.

INDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
ABREVIATURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Control Microbiano de insectos.....	2
1.2. Patología de insectos.....	3
1.3. Hongos entomopatógenos.....	4
1.4. Micoinsecticidas.....	5
1.5. <i>Beauveria bassiana</i>	8
1.6. Potencial del hongo <i>B. bassiana</i> para el control del insecto plaga <i>Diatraea saccharalis</i> en Argentina.....	9
1.7. Ciclo de vida de <i>B. bassiana</i>	10
1.8. Patogenicidad, virulencia y agresividad.....	12
1.9. Caracterización de cepas.....	13
1.10. Patogénesis.....	16
1.11. Degradación enzimática de quitina.....	19
1.12. Degradación enzimática de quitosano.....	21
1.13. Estudio genético de la virulencia. <i>Differential display</i>	24
OBJETIVOS	26
2. MATERIALES Y METODOS	27
2.1. Mantenimiento y producción de <i>B. bassiana</i>	28
2.2. Cría en laboratorio de <i>D. saccharalis</i>	28
2.3. Preparación de cutícula.....	29
2.4. Cultivos diferenciales.....	30
2.5. Purificación de ARN total.....	30
2.6. RT-PCR. <i>Differential display</i>	32
2.6.1. Tratamiento del ARN total con ADNasa.....	32
2.6.2. Transcripción reversa (RT).....	32
2.6.3. Amplificación de ADNc por PCR.....	33
2.6.4. Electroforesis.....	33
2.6.5. Recuperación de bandas de geles de poliacrilamida.....	34
2.7. Clonado de fragmentos de PCR.....	35
2.7.1. Ligación.....	35
2.7.2. Preparación de células electrocompetentes.....	35
2.7.3. Transformación.....	36
2.7.4. Selección y análisis de transformantes.....	36
2.8. Purificación de ADN plasmídico (miniprep).....	37
2.9. Secuenciación.....	37
2.10. <i>Northern blot</i>	38

INDICE

2.10.1. Geles desnaturalizantes para ARN.....	38
2.10.2. Transferencia a membrana.....	39
2.10.3. Marcación de sondas.....	39
2.10.4. Hibridación.....	40
2.10.5. Autoradiografía.....	40
2.11. <i>Southern blot</i>	40
2.11.1. Protocolo estándar de extracción de ADN.....	41
2.12. Construcción de una genoteca de ADN genómico de <i>B. bassiana</i> en vector λ	42
2.12.1. Principios teóricos.....	42
2.12.1.1. Generalidades.....	42
2.12.1.2. Vectores de clonado de sustitución.....	42
2.12.1.3. ADN inserto.....	43
2.12.2. Metodología.....	43
2.12.2.1. Preparación de protoplastos.....	44
2.12.2.2. Protocolo de extracción de ADN de alto peso molecular.....	44
2.12.2.3. Digestión parcial de ADN.....	45
2.12.2.4. Fraccionamiento por tamaño de la digestión parcial de ADN.....	46
2.12.2.5. Clonado en fago λ . Titulación de fagos recombinantes.....	46
2.13. <i>Screening</i> de la genoteca.....	47
2.14. Preparación de lisado de fago.....	47
2.15. Purificación de ADN de fagos recombinantes.....	48
2.16. Análisis de secuencias.....	48
3. RESULTADOS.....	50
3.1. Cultivos diferenciales.....	51
3.2. <i>Differential display</i>	52
3.3. Recuperación y análisis de fragmentos diferenciales.....	55
3.4. Construcción de una genoteca de <i>B. bassiana</i>	58
3.5. <i>Screening</i> de la genoteca y análisis de restricción de fagos recombinantes.....	61
3.6. Análisis del gen de la quitosanasa.....	67
3.7. Comparación de las quitosanasas fúngicas.....	72
3.8. Análisis de agrupamiento de las quitosanasas.....	73
3.9. Análisis del gen de la proteína Mfs.....	77
4. DISCUSION.....	81
5. CONCLUSIONES.....	93
6. BIBLIOGRAFIA.....	94

RESUMEN

La búsqueda de genes relacionados con la patogenicidad de *Beauveria bassiana*, se llevó a cabo siguiendo la estrategia de estudiar la expresión de una cepa virulenta del hongo, cultivada *in vitro*, en condiciones nutricionales similares a las que este patógeno se encuentra sometido durante la penetración del hospedante. Para ello se utilizó como única fuente orgánica de crecimiento, una preparación de la cutícula del insecto *Diatraea saccharalis*, el sustrato natural cuya degradación es requerida para el establecimiento de la infección. Se aplicó la técnica de *Differential display* para la detección de genes que se expresaran en forma diferencial bajo esta condición. Por comparación entre los productos de amplificación de ADNc, obtenidos por RT-PCR del ARN extraído del hongo cultivado con cutícula, o sin ella, se detectaron fragmentos únicamente presentes en el primer caso. Los patrones de bandas se obtuvieron utilizando un *primer* oligo-dT, en combinación con decámeros de secuencia arbitraria. Se desarrolló una metodología que consistió en la marcación de los productos de PCR con grupos fluorescentes, y su análisis en un sistema de secuenciación automática. Los fragmentos amplificados diferencialmente fueron utilizados como sondas, para estudiar el nivel de expresión de los transcritos correspondientes, por la técnica de *northern*. Paralelamente, se determinó el número de copias de los genes respectivos, en el genoma de *B. bassiana*, mediante la técnica de *southern*. Se construyó una genoteca de ADN genómico de *B. bassiana* en un vector de sustitución derivado del fago λ . El *screening* de la misma con una sonda de expresión diferencial, permitió identificar un gen que codifica para una proteína deducida de 495 aminoácidos. La secuencia de la misma, presentó homología con una familia de proteínas de transporte a través de membrana, de especificidades diversas. Adyacente a dicho gen, en posición aguas arriba de la secuencia genómica, se identificó otro gen de copia única y de expresión concertada con el anterior, que codifica para la enzima quitosanasa. Con la secuencia del ADNc se comprobó la existencia de dos intrones en la estructura primaria del gen. La proteína deducida, de 232 aminoácidos, presenta 74% de identidad de secuencia con la misma enzima de otro hongo entomopatógeno, *Metarhizium anisopliae*. Otras tres secuencias fúngicas completan el grupo de quitosanasas eucariotas conocidas, separado de las enzimas de origen bacteriano, por análisis de agrupamiento en base a similitud de secuencia. Se propone la participación de esta enzima en la degradación de la cutícula de los insectos, por parte de los hongos entomopatógenos.

ABSTRACT

A virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* was cultured *in vitro* under nutritional conditions resembling those encountered by the pathogen during penetration of the host. This strategy was followed to study the expression of fungal genes related to pathogenicity. The fungus was grown with the cuticle of the insect *Diatraea saccharalis* as the sole source of carbon and nitrogen. The degradation of this substrate is needed for the infection to be accomplished. The Differential display technique was used to detect genes that were differentially expressed under this culture condition. The cDNA amplification products obtained by RT-PCR of the mRNA extracted from the fungus cultured with, or without cuticle, were compared. By this means, fragments only present in the former condition, were detected. The banding patterns were obtained by using an oligo-dT primer in combination with 10-mer primers of arbitrary sequence. Original protocols were developed to perform the analysis on an automated DNA sequencer, through the incorporation of fluorescent labels in the PCR products. The differentially amplified fragments were used as probes to study the expression level of the corresponding genes by northern. The southern technique was used to estimate the copy number of the genes within the genome. A λ derived cloning vector was employed in the construction of a genomic library of the fungus. The screening of this library with a differential probe allowed for the detection of a gene encoding a protein of 495 amino acids. The deduced sequence of this protein shows similarity to members of a family of membrane transporters with diverse specificities. Another gene is located immediately upstream. This one was also found to be overexpressed in culture on cuticle. It encodes the enzyme chitosanase. The cDNA sequence evidenced the existence of two introns in the primary structure of the gen. The deduced protein has 232 amino acids, and it shows 74% identity with the same enzyme of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. The other three chitosanase genes from eukaryotic origin, which are known to date, belong to fungi. They cluster together and remain separate from the bacterial proteins, when their sequences are compared. The enzyme produced by entomopathogenic fungal species is a good candidate to participate in the degradation of the insect cuticle.

ABREVIATURAS

aa: aminoácido.
AcO: ion acetato.
ADN: ácido deoxiribonucleico.
ADNasa: deoxiribonucleasa.
ADNc: ADN copia.
AMV: virus de la mieloblastosis aviaria.
ARN: ácido ribonucleico.
ARNasa: ribonucleasa.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.
ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.
b: base.
°C: centigrado.
cm: centímetro.
Da: dalton.
dATP: deoxiadenosina trifosfato.
ddNTP: dideoxinucleósido trifosfato.
dNTPs: deoxinucleósidos trifosfato.
DO: densidad óptica.
DTT: ditioneitol.
EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético.
g: gramo.
h: hora.
ha: hectárea.
IPTG: isopropil-tio- β -D-galactósido.
kDa: kilodalton.
kg: kilogramo.
kpb: kilo par de bases.
kV: kilovolt.
l: litro.
M: molar.
Mb: megabase.
 μ Ci: microcurie.
 μ F: microfaradio.
 μ l: microlitro.
 μ m: micrometro.
 μ M: micromolar.
mg: miligramo.
min: minuto.
ml: mililitro.
mm: milímetro.
mM: milimolar.
MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propansulfónico.
ng: nanogramo.
nm: nanometro.
 Ω : ohm.
oligo-dT: oligodeoxitimidina.
pb: par de bases.

pfu: unidad formadora de placa.

pl: punto isoeléctrico.

PM: meso molecular

poli A: poliadenosina.

rpm: revoluciones por minuto.

S: coeficiente de sedimentación.

SDS: dodecil sulfato de sodio.

seg: segundo.

TBE: Tris-borato-EDTA.

TE: Tris-EDTA.

U: unidad.

UV: ultravioleta.

V: volt.

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido.

INTRODUCCION

1.1. Control Microbiano de insectos

La producción agrícola es afectada por las considerables pérdidas de rendimiento y calidad que causan los insectos, ya sea por consumo directo de los cultivos o indirectamente, facilitando la infección por fitopatógenos. El nivel de producción actual de alimentos no podría mantenerse sin programas de control de insectos, los cuales se basan principalmente en la aplicación de insecticidas químicos. Sin embargo, el empleo masivo de insecticidas químicos resulta inconveniente en varios aspectos: contaminación ambiental, riesgos de intoxicación, selección de plagas emergentes por resistencia genética, y erradicación de enemigos naturales, los cuales constituyen parte del control natural de las plagas. Tal situación ha llevado a un replanteo de las tácticas de control con el objeto de reducir y adecuar el uso de insecticidas químicos. Esto significa emplear productos selectivos, menos tóxicos, aplicándolos a las dosis apropiadas y complementándolos con otros métodos de control. Diversas prácticas que responden a esta estrategia han dado origen al Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual se basa en principios esencialmente ecológicos, considerando todo el agroecosistema, y no solamente la especie vegetal afectada. El concepto de MIP fue articulado originalmente entre los entomólogos (Stern *et al.*, 1959), para luego extenderse progresivamente a la protección vegetal en un sentido amplio.

El MIP es una estrategia comprendida dentro de la visión sostenible o sustentable de la agricultura, y entre las tácticas que involucra para el control de insectos se cuentan el control químico, las prácticas culturales, las modificaciones del comportamiento de la plaga, los cultivares resistentes, y el control biológico. Las posibilidades del control biológico se relacionan con el uso de los enemigos naturales de las plagas: predadores, parásitos, parasitoides y patógenos. En particular, el uso o manejo de patógenos de insectos (entomopatógenos) para reducir las poblaciones y los efectos de las plagas, define una rama del control biológico conocida como control microbiano. En dicha categoría de organismos se incluyen a virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos; los mismos se consideran con mayor potencialidad de éxito que otros enemigos naturales de las plagas, para ser utilizados como alternativa de control, debido a su persistencia en el ambiente en ausencia de hospedantes y a su breve tiempo generacional.

1.2. Patología de insectos

Las primeras investigaciones sobre entomopatógenos fueron impulsadas en beneficio de la actividad económica referida a la cría del gusano de seda y de la abeja, dando nacimiento de esta forma, a la patología de insectos. Esta disciplina abarca el estudio de los principios generales de las enfermedades de los insectos: etiología, patogénesis, sintomatología y epizootiología.

Las aplicaciones de la patología de insectos son de dos tipos principales: el uso de agentes (físicos, químicos y biológicos) para el control de insectos perjudiciales y la supresión de enfermedades de insectos comercialmente útiles (profilaxis y terapéutica). El primer caso comprende a los insectos que ocasionan daños en cultivos agrícolas (plagas) y a los vectores de enfermedades de animales y humanos. Por lo tanto, las áreas de mayor impacto de esta aplicación son la agricultura y la medicina.

Para los insectos -como para cualquier otro grupo biológico-, las enfermedades constituyen un factor de gran importancia en el comportamiento de los individuos y en las fluctuaciones de sus poblaciones. Por su parte, toda práctica de control microbiano implica modular la dinámica de una enfermedad infecciosa en la población de un insecto, con el objeto de estimular el desarrollo de dicha enfermedad y de potenciar su efecto como factor de mortalidad de la plaga cuya reducción se persigue.

En la **Figura 1** se esquematiza la relación entre el objeto de estudio de la patología de insectos y su aplicación en el área del control biológico.

Tipo de enfermedad	Agente o daño	Control
No Infecciosas	Físico Químico Nutricional Metabólico Genético Neoplásico Teratológico	
Infecciosas	Virus Bacterias Hongos Protozoos Nemátodos Parasitoides (insectos) Predadores	Microbiano Biológico

Figura 1. Clasificación de agentes causales de mortalidad en insectos en base al tipo de enfermedad que ocasionan y a su empleo en el control biológico. (Modificado de Steinhaus, 1963).

1.3. Hongos entomopatógenos

Los tipos de relaciones existentes entre hongos e insectos incluyen desde asociaciones fortuitas a todo el espectro de categorías definidas como simbiosis, mutualismo, comensalismo, parasitismo y patogénesis. Teniendo en cuenta que los insectos constituyen aproximadamente el 80% de las especies animales conocidas, es evidente que la dinámica de estas relaciones es enormemente intensa y compleja.

Los hongos entomopatógenos constituyen un grupo de aproximadamente 700 especies pertenecientes a distintos géneros (Roberts y Humber, 1981; Samson *et al.*, 1988), que causan mortalidad natural en insectos. Se los puede encontrar ocupando los hábitats más variados. El primer trabajo experimental sobre estos microorganismos fue desarrollado por el italiano Agostino Bassi (1835), quien demostró que el hongo *Beauveria bassiana* era la causa de una enfermedad del gusano de seda (*Bombyx mori* L.) conocida como “muscardina blanca”. Considerado en un contexto histórico, este hallazgo reviste singular importancia ya que se reconoce como la primera evidencia en favor del desarrollo de la teoría del origen microbiano de las enfermedades transmisibles (Carruthers y Hural, 1990).

Con respecto a su utilización como agentes de control microbiano, la característica distintiva de los hongos entomopatógenos es la de infectar al insecto hospedante por penetración a través del tegumento. Esto constituye un modo de acción “por contacto”, independiente del hábito alimenticio del insecto, y por lo tanto, amplía el potencial espectro de aplicación de los hongos con respecto al de los demás entomopatógenos, que en su mayoría actúan “por ingestión” (Papierok, 1991; Roberts *et al.*, 1991). El carácter patogénico de los hongos, además, involucra una serie de eventos fisiológicos que considerados en conjunto, permiten suponer que la aparición de resistencia en insectos susceptibles sea menos probable (Hegedus y Khachatourians, 1995). En la actualidad, las investigaciones sobre este tema reflejan la tendencia general al desarrollo de micoinsecticidas, es decir, productos formulados en base a hongos entomopatógenos, destinados a su utilización como insumos de la producción agrícola, para la sanidad animal, o en la prevención de enfermedades humanas.

1.4. Micoinsecticidas

Dado que en el proceso temporal de las enfermedades microbianas de los insectos participan múltiples interacciones hospedante-patógeno-ambiente, la intervención sobre cada una de ellas, ofrece distintas posibilidades de manejo. En lo que respecta al patógeno, su incorporación al ambiente puede significar una introducción nueva (cepa exótica), si el mismo no se encontraba presente previamente, o el incremento de una población preexistente (cepa nativa) a niveles requeridos para su acción eficaz. Además, la estrategia de control puede basarse en obtener una reducción progresiva del insecto con el transcurso del tiempo, o lograr un fuerte decrecimiento de la plaga en un determinado momento. En este último caso el efecto requerido es similar al de un insecticida químico, y para ello se emplean los llamados insecticidas microbianos o bioinsecticidas. El “principio activo” de un bioinsecticida consiste en un patógeno con alta virulencia y de rápida multiplicación, presentado bajo una formulación que asegure su eficacia y permita su fácil almacenamiento y su aplicación a altas dosis. El caso más difundido es el de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (aislada en 1902 por Ishiwata, en Japón, y en 1915 por Berliner, en Alemania). Su lanzamiento comercial como bioinsecticida comenzó

en Francia, en 1938, para convertirse desde entonces en el insecticida microbiano más comercializado en todo el mundo (Luthy *et al.*, 1982).

Con respecto a los hongos entomopatógenos, su empleo en el campo comenzó a fines del siglo XIX con los trabajos de Metschnikoff, referidos al uso de *Metarhizium anisopliae* para el control de larvas de *Anisoplia austriaca* (Ignoffo y Anderson, 1979). A partir de entonces son innumerables las experiencias realizadas en distintos países para controlar plagas de la agricultura extensiva y en invernáculos. En América Latina existen varios ejemplos de programas nacionales sobre la utilización de estos hongos (Feinsilver, 1995; Valencia, 1995), principalmente en Brasil, donde más se ha trabajado en el tema (Alves y Lecuona, 1996; Azevedo, 1998).

La mayoría de las tecnologías disponibles para producir hongos entomopatógenos están orientadas principalmente a la producción de conidios, ya que éstos son las partículas infectivas por excelencia debido a su mayor virulencia y a su resistencia a condiciones ambientales adversas (Thomas *et al.*, 1987). Los niveles de inóculo a liberar en el campo para lograr un efectivo control, alcanzan generalmente valores de 10^{12} conidios/ha (Ferron, 1981; Burges y Hall, 1982). De allí que los hongos más usados sean los entomopatógenos no obligados, es decir, aquéllos que pueden cultivarse *in vitro*, y principalmente los deuteromycetes, ya que son los menos exigentes en sus requerimientos nutricionales y pueden producirse por procesos fermentativos industriales que proporcionan altos rendimientos a bajos costos. Una vez producida, la biomasa fúngica se formula de una manera tal que permita mantener su viabilidad y virulencia durante el período de almacenamiento y comercialización, además de facilitar su aplicación y maximizar los resultados en el campo. En general, la información existente sobre formulaciones de micoinsecticidas no es de dominio público, sino que es mantenida bajo reserva por las empresas que los comercializan. Actualmente, los sistemas de producción de hongos entomopatógenos cuentan con un grado de desarrollo aceptable a costos competitivos. En la **Tabla 1** se listan ejemplos de micoinsecticidas comerciales.

Tabla 1. Productos comerciales a base de hongos entomopatógenos.

Agente	Nombre comercial	Compañía	País	Insecto
<i>Aschersonia aleyroides</i>	Asheronija	All Union. Ins. Agr. Microbiol.	Ex-URSS	Aleurodes
<i>Beauveria bassiana</i>	Biotrol FBB	Nutrilita Products	USA	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Cydia pomonella</i>
	Boverin	Glavmikro Bioprum	Ex-URSS	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Cydia pomonella</i>
	Boverol	-	Rep. Checa	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
	ANG-6178	Abbott Labs.	USA	<i>Dendrolimus sp.</i>
	Ostrinyl	Natural Plant Prot.	Francia	<i>Ostrinia nubilalis</i>
	Formula comercial	-	China	<i>Dendrolimus sp.</i>
	AF-4	Mycotech	USA	<i>Coleoptera spp.</i>
	BotaniGard	Mycotech	USA	Plagas de invernáculo
	Naturalis-L	Troy Bioscience	USA	Plagas de algodón
Naturalis-O	Troy Bioscience	USA	Plagas de plantas ornamentales	
<i>Beauveria brogniartii</i>	Betel	Natural Plant Prot.	Francia	<i>Hoplochelus marginalis</i>
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Mycar	Abbott Labs.	USA	<i>Phyllocoptruta oleivora</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Biotrol FMA	Nutrilita Products	USA	<i>Mahanarva posticata</i>
	Metaquino	Codecap, IAA	Brasil	<i>Mahanarva posticata</i>
	Combio	Equilibr. Control. Biol.	Brasil	<i>Mahanarva posticata</i>
	Bio-1020	Bayer	Francia	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>
<i>Metarhizium flavoviride</i>	Formula comercial	IIBC	Inglaterra	Langostas
<i>Verticillium lecanii</i>	Vertalec	Koppert	Países Bajos	Pulgones
	Mycotal	Koppert	Países Bajos	Aleurodes
	Verticillin	-	Ex-URSS	Aleurodes
	Thriptal	Bridet	Suiza	Aleurodes
	MicroGermin F	Chr. Hansen's BioSys	Dinamarca	Aleurodes Thrips

Fuente: Todorova, 1998.

1.5. *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill es un hongo entomopatógeno cosmopolita perteneciente al grupo de los deuteromycetes u hongos imperfectos, así llamados por su falta de reproducción sexual o fase perfecta del ciclo de vida. Esta clasificación carece de valor taxonómico formal, ya que es una forma artificial de reunir, debido a su carácter asexual, organismos pertenecientes a los phyla *Ascomycota* o *Basidiomycota* (reino *Fungi*). Por sus características somáticas, a saber: micelio ramificado e hifas septadas con poros, *Beauveria* pertenece a los ascomycetes filamentosos.

Los hongos se definen como organismos eucariotas, productores de esporas, sin clorofila, con nutrición por absorción, con reproducción sexual y/o asexual, con estructuras somáticas filamentosas, ramificadas y con pared celular, llamadas hifas (Alexopoulos *et al.*, 1996). La taxonomía de hongos se ha visto influida durante los últimos años por el éxito y la difusión de los análisis filogenéticos. Con la ruptura de la tradición de clasificar a todos los organismos vivientes en tres reinos, Whittaker (1969) propuso la adición del reino *Fungi* en un intento de establecer un grupo monofilético para los hongos. Debido a la utilización de una cantidad cada vez mayor de datos moleculares para inferir filogenias, los hongos se clasifican actualmente en tres grupos diferentes: los reinos monofiléticos *Fungi* y *Stramenopila*, y cuatro phyla del grupo polifilético protista (Barr, 1992; Patterson y Sogin, 1992). Sin embargo, considerados en conjunto, estos organismos comparten los tipos de hábitat y el modo de nutrición.

De acuerdo a la terminología en uso para describir las fases del ciclo de vida de los deuteromycetes, “anamorfo” es el micelio que se reproduce mitóticamente por medio de esporas asexuales no móviles, llamadas conidios. Eventualmente, si se identifica una fase sexual, se aplica el término “teleomorfo” al micelio que produce esporas sexuales por meiosis. Dentro del grupo, los patrones de desarrollo de los conidios proporcionan una base para la clasificación. Los conidios pueden estar ausentes, formarse directamente a partir de hifas somáticas o de células conidiógenas dispuestas sobre ramificaciones hifales llamadas conidióforos, los cuales a su vez pueden disponerse en forma individual o formando estructuras complejas, según las especies. Si bien no se reconoce un sistema jerárquico de clasificación, se siguen usando los nombres de algunos taxones históricamente

definidos en base a estos caracteres. Dentro de los deuteromycetes, *Beauveria* se incluye en el grupo de los hyphomycetes o productores de conidios en células conidiógenas no agregadas. En particular, el género se define por la presencia de células conidiógenas simpodiales, con una parte basal hinchada terminando en un raquis en zig-zag. Se reconocen seis especies dentro del género, definidas principalmente en base a la forma de los conidios (Mugnai *et al.*, 1989). No se ha establecido una conexión cierta entre *Beauveria* y algún morfo sexual conocido, pero se cree que su teleomorfo correspondería a alguna especie de *Cordyceps* (Humber, 1997).

1.6. Potencial del hongo *B. bassiana* para el control del insecto plaga *Diatraea saccharalis* en Argentina

El “barrenador del tallo”, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) es una importante plaga americana de los cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar. En Argentina, constituye la plaga del maíz de mayor incidencia, ocasionando depresiones en el rendimiento que alcanzan valores de hasta un 20% (Dagoberto *et al.*, 1981). Su importancia se debe al tipo de daño que ocasiona, a su aparición frecuente y a su amplia distribución en el área maicera. Los daños provocados por el barrenado interior del tallo se pueden manifestar como vuelco de la planta, desprendimiento de la espiga, destrucción del grano o disminución de su calidad. Los métodos químicos convencionales presentan escasa efectividad de control debido al hábito de la plaga. Por lo tanto, para disminuir su incidencia, tradicionalmente se ha recurrido a prácticas culturales, siendo las más difundidas la cosecha anticipada y la incorporación profunda del rastrojo de la planta, donde el insecto inverna como larva. Actualmente se cuenta con maíces transgénicos para la toxina de *B. thuringiensis*, activa contra lepidópteros.

Se ha observado que en varias localidades del área maicera argentina, *B. bassiana* es causante de un alto nivel de mortalidad natural de las larvas invernantes del barrenador (Dagoberto y Lecuona, 1982; Lecuona, 1990). Este hecho impulsó el estudio del potencial uso del hongo como bioinsecticida contra esta plaga. Para ello, en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA Castelar (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) se mantiene una colección de aislamientos nativos de *B. bassiana* y se lleva a cabo la cría del insecto en laboratorio.

1.7. Ciclo de vida de *B. bassiana*

El desarrollo de la micosis de *B. bassiana* ejemplifica el proceso infeccioso de los deuteromycetes en general. Se ha propuesto una serie de diez etapas sucesivas para describir dicho proceso y sistematizar su estudio (Roberts y Humber, 1981). Estas son: adhesión de los conidios al tegumento, germinación, penetración, multiplicación en el hemocele, producción de toxinas, muerte del insecto, colonización total del interior del hospedante, salida hacia el exterior, esporulación sobre la superficie del cadáver y diseminación en el medio (**Figura 2**). Las tres primeras etapas involucran el reconocimiento de señales químicas y topográficas por parte del patógeno, lo cual induce la diferenciación de estructuras y mecanismos que le permiten atravesar las barreras estructurales y evitar las respuestas de defensa del hospedante (Hajek y St Leger, 1994).

La adhesión ha sido correlacionada con la especificidad hospedante-patógeno, aunque esto no se ha podido confirmar en todos los casos estudiados. En el fenómeno intervienen propiedades fisicoquímicas de las superficies en contacto, pero también funciones activas del conidio en la fase pregerminativa. La germinación estaría condicionada, en principio, a la capacidad de aprovechamiento nutricional de componentes superficiales de la cutícula, como lípidos y metabolitos simples secretados por el insecto. En experimentos *in vitro* se ha observado que los conidios requieren una fuente de carbono para germinar, mientras que el crecimiento de las hifas en su estado temprano de elongación, demanda además, una fuente de nitrógeno (Smith y Grula, 1981). Por otro lado, el hongo debe superar la acción inhibitoria potencial de algunas de dichas sustancias. Con relación a esto, se ha observado inhibición de la germinación causada por la fracción polar de lípidos cuticulares (Smith y Grula, 1982).

Generalmente, el extremo del tubo germinativo se diferencia en una porción ensanchada llamada apresorio, que se adhiere por medio de mucílago a la superficie de la cutícula. A partir del apresorio se desarrolla una hifa especializada que penetra en la cutícula del hospedante mediante la acción combinada de procesos físicos y enzimáticos (ver patogénesis).

Una vez en el interior del insecto, el hongo se multiplica principalmente por formas unicelulares libres llamadas blastosporas e inicia la producción de toxinas.

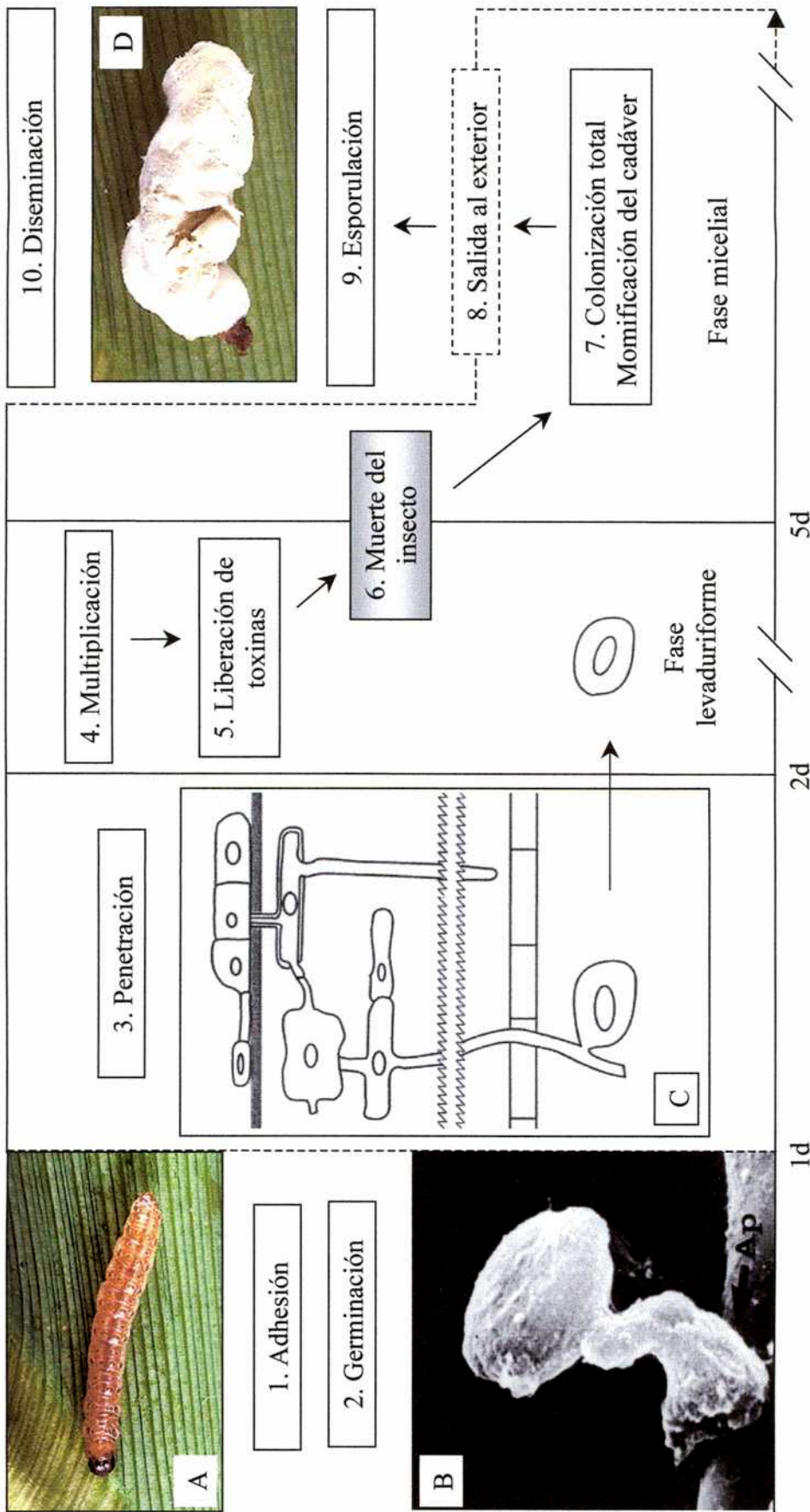


Figura 2. Ciclo de infección de *Beauveria bassiana* sobre el insecto *Diatraea saccharalis*. Los números (1-10) indican las etapas sucesivas del proceso (ver texto). Los números seguidos de la letra "d", en la base del gráfico, indican la secuencia temporal, en días. (A) Larva sana de *D. saccharalis*. (B) Conidio de *B. bassiana* germinando sobre la cutícula del hospedante, con formación de apresorio terminal (Ap). (C) Esquema de la penetración de la cutícula. (D) Cadáver del insecto cubierto con micelio esporulado. (---) Límite del crecimiento dentro del hospedante.

Los principales metabolitos secundarios de este tipo que se conocen son una clase de péptidos cíclicos genéricamente llamados destruxinas (Roberts, 1969).

La muerte del insecto parasitado ocurre antes de que el hongo colonice todo el interior del hospedante. Luego de la muerte, el micelio invade todos los tejidos, transformando al cadáver en una momia resistente a la descomposición bacteriana. Cuando la temperatura y la humedad son las adecuadas, las hifas emergen con formación de conidios y el insecto muerto toma la coloración blanca característica de los mismos. En los hongos, los conidios generalmente tienen un mayor potencial de dispersión, pero su viabilidad es menor que la de las esporas producidas por reproducción sexual. Para los entomopatógenos asexuales como *B. bassiana*, el cadáver momificado del insecto constituye una verdadera forma de resistencia a condiciones climáticas adversas, y sirve como medio de diseminación.

B. bassiana también crece en forma saprofítica, un hábito de gran valor adaptativo ante la ausencia de hospedantes. De hecho, se ha sugerido que ésta puede ser la condición ancestral del género (Evans, 1988). Por lo tanto, se pueden aislar cepas del suelo, en donde el hongo sobrevive en forma de conidio en ausencia de hospedantes, por períodos variables dependientes de la cepa y de las condiciones ambientales.

1.8. Patogenicidad, virulencia y agresividad

Las posibilidades de interacción entre una cepa de un hongo entomopatógeno y el espectro potencial de hospedantes en la naturaleza, pueden llevar a diferentes grados de desarrollo de la enfermedad, debido a las características individuales de los organismos intervinientes y a factores poblacionales y ambientales.

Siguiendo la terminología empleada por Nelson (1977), se entiende por patogenicidad a la habilidad del hongo para provocar una enfermedad, lo que constituye un atributo cualitativo. La determinación de la capacidad infectiva del patógeno sobre un hospedante se basa en el resultado de ensayos de laboratorio bajo condiciones controladas (bioensayos). En un bioensayo se utilizan cargas de inóculo generalmente altas, tales como las que pueden alcanzarse en el campo por la aplicación de un micoinsecticida.

Por su parte, la virulencia se refiere a la intensidad o grado de la enfermedad, y es cuantificable en términos de la respuesta del insecto a inóculos conocidos,

quedando expresada como porcentaje de mortalidad, concentración letal media (LC_{50}) o dosis letal media (LD_{50}). Por otro lado, la agresividad está referida al tiempo requerido por una cepa para ocasionar la muerte del hospedante a partir del momento de la infección, y puede expresarse como tiempo letal medio (LT_{50}).

1.9. Caracterización de cepas

Se puede establecer un paralelismo entre el estudio de las enfermedades fúngicas de las plantas y las de los insectos, en el sentido de la diversidad existente dentro de una misma especie del patógeno con respecto a su especificidad de hospedante y a su virulencia. El conocimiento sobre estos aspectos tiene aplicación directa en el desarrollo de estrategias de manejo, con el objetivo de controlar al fitopatógeno (hongo) en un caso, o al hospedante (insecto), en el otro. Históricamente, el campo de la fitopatología ha sido mucho más estudiado y se han establecido para los hongos una serie de categorías taxonómicas intraespecíficas: biotipo, raza, variedad, etc. (Macleán *et al.*, 1993); las mismas no tienen un correlato en los hongos entomopatógenos, por la falta de suficientes conocimientos como para sistematizar las posibles variantes. Sin embargo, también entre estos últimos existe una gran diversidad a nivel de cepas con relación a la patogenicidad. Estas variantes no siempre se asocian con otros caracteres cuantificables como los morfológicos y los fisiológicos. Además, los caracteres morfológicos generalmente presentan un escaso o nulo nivel de variación.

Durante los últimos años, los estudios para caracterizar cepas de *B. bassiana* se han orientado a la búsqueda de marcadores genéticos apuntando a los siguientes objetivos:

- 1) seguir una cepa liberada al ambiente y diferenciarla de cepas nativas diferentes, para evaluar su efectividad, diseminación y persistencia.
- 2) asistir a los procesos de selección y mejoramiento de cepas.
- 3) controlar la estabilidad genética de una cepa en el tiempo, dentro de un esquema productivo.

Las metodologías empleadas para detectar variabilidad genética han incluido isoenzimas, serología y más recientemente, las técnicas de análisis de ADN, siendo estas últimas las más informativas para identificar cepas y establecer relaciones de distancia genética entre ellas (Michelmore y Hulbert, 1987; Macleán *et al.*, 1993).

Isoenzimas. La técnica se basa en la separación electroforética en geles, de proteínas de extractos crudos, seguida de la visualización por tinción, de actividades enzimáticas específicas. Mugnai *et al.* (1989) combinaron datos isoenzimáticos y de morfología de conidios para establecer la actual clasificación de especies dentro del género *Beauveria*. En general, se ha evidenciado una alta variabilidad dentro de las poblaciones naturales, no obstante lo cual, también se ha observado cierta homogeneidad entre cepas provenientes de un mismo hospedante o de un mismo origen geográfico (Poprawski *et al.*, 1988; Tigano *et al.*, 1990; St Leger *et al.*, 1992a; Lecuona *et al.*, 1996).

Inmunoquímica. Shimizu y Aizawa (1988) determinaron por seroaglutinación tres tipos serológicos diferentes a partir de 68 cepas de *B. bassiana*. Resultados más informativos fueron obtenidos por Tan y Ekramoddoullah (1991), quienes lograron diferenciar cinco cepas en base a los perfiles antigénicos obtenidos por *Western immunoblotting* y ELISA.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Las variantes RFLP resultan de los diferentes tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción y revelados por hibridación con una sonda marcada. Kosir *et al.* (1991) diferenciaron por este método una mutante de laboratorio, de la cepa parental, usando sondas genómicas. Hegedus y Khachatourians (1993a) identificaron variaciones a nivel de especie con sondas mitocondriales.

Cariotipo electroforético. Mediante la técnica de electroforesis de campo pulsante desarrollada por Schwartz y Cantor (1984), Pfeifer y Khachatourians (1993) determinaron un complemento haploide de $n=8$ cromosomas para una cepa de colección. El tamaño estimado fue de 2,9 Mb para el menor de los cromosomas y de 8,1 Mb para el mayor, con un tamaño total del genoma de aproximadamente 40 Mb. Sin embargo, la técnica es muy laboriosa, implica largos tiempos de electroforesis y sus resultados muchas veces se ven afectados por la dificultad en la preparación de las muestras, todo lo cual hace que sea poco apropiada para aplicarla en forma extensiva al estudio comparativo de cepas.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Desde su desarrollo (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), esta técnica se ha utilizado ampliamente para obtener *fingerprints* y detectar variabilidad en todo tipo de organismos. La metodología RAPD, basada en la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*),

utiliza un único *primer* de secuencia arbitraria para amplificar un conjunto de fragmentos de ADN que resulta característico del genoma bajo estudio. Con esta técnica se ha obtenido un gran poder resolutivo en la diferenciación de cepas de *B. bassiana* (Bidochka *et al.*, 1994; Urtz y Rice, 1997; Berretta *et al.*, 1998). En la **Figura 3** se muestran patrones RAPD de cepas de *B. bassiana*.

Ante la necesidad de desarrollar un análisis diagnóstico de identidad de una cepa, podría resultar conveniente por su practicidad, sensibilidad y especificidad, extender a varios *loci* el tipo de análisis desarrollado por Hegedus y Khachatourians (1993b, 1996), que se basa en una PCR específica, para detectar a partir de un insecto muestreado, la identidad de la cepa infectante.

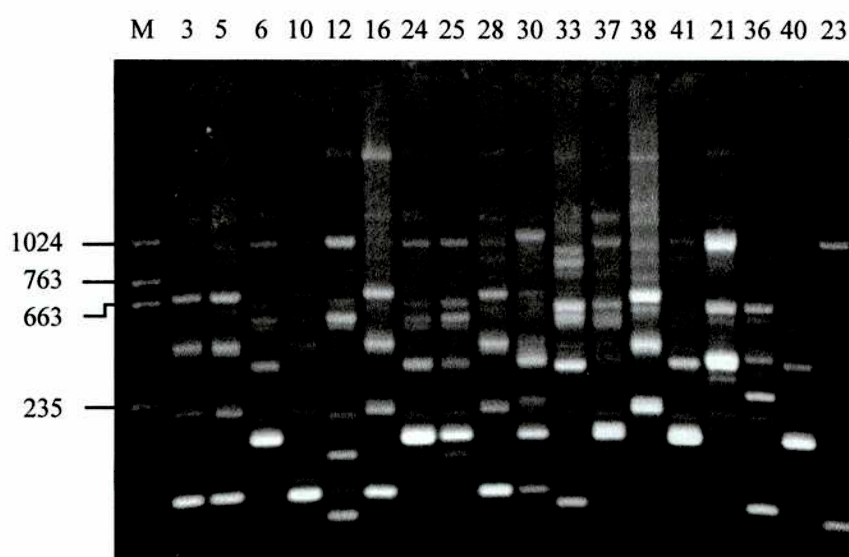


Figura 3. Patrones de amplificación de cepas de *Beauveria bassiana* obtenidos mediante la técnica de RAPD con el primer 5'-GTGATCGCAG (Berretta *et al.*, 1995). Los números de las calles del gel identifican las cepas de la colección IMYZA-INTA Castelar. Las cepas 33, 36, 38, 40 y 41 son aislamientos provenientes de Brasil; el resto son provenientes de Argentina. M: marcador de peso molecular (valores consignados en pb).

1.10. Patogénesis

B. bassiana y *M. anisopliae* se han convertido en organismos modelo de la patogénesis fúngica en insectos, sobre todo para el estudio de los aspectos relacionados al mecanismo de penetración a través del tegumento, condición que se requiere durante las primeras etapas del proceso infectivo, para el establecimiento de la micosis. Dicha penetración resulta de la acción combinada de la presión mecánica que ejercen las hifas en crecimiento sobre la superficie cuticular, y de la degradación enzimática de sus componentes estructurales.

La cutícula forma el exoesqueleto de los insectos (de los artrópodos en general) y se extiende como recubrimiento de estructuras internas (sistema respiratorio, tractos digestivo y reproductivo, y conductos glandulares). Estructuralmente, le confiere al organismo una cubierta de sostén que sirve como punto de inserción de los músculos principales, y funcionalmente, constituye una barrera de permeabilidad y de defensa. Existen zonas de la cutícula que se encuentran esclerosadas formando placas o escleritos, entre las cuales la cutícula adquiere una forma membranosa, blanda y flexible, que permite la articulación de las distintas partes del cuerpo. Este sistema estructural ha significado un gran potencial evolutivo para los insectos, como lo demuestra la diversidad de adaptaciones morfológicas que han desarrollado. La cutícula es una secreción compleja de las células epidérmicas que se encuentra sometida a regulación hormonal, con variaciones dependientes de las especies, del estadio de desarrollo y de la región del cuerpo considerada. Consta de dos porciones diferenciadas: una capa superficial llamada epicutícula y otra capa subyacente denominada procutícula. La epicutícula está constituida principalmente por lípidos, tiene un espesor del orden de 1 μm , y representa una fracción relativamente insignificante en relación a la masa total. La procutícula, en cambio, puede alcanzar varios mm de espesor. Esta porción, formada por el complejo quitina-proteína, puede presentar una apariencia homogénea o puede estar diferenciada en una capa esclerosada externa (exocutícula), una parte media (mesocutícula) y una parte interna (endocutícula). Su contenido de quitina varía entre 25% y 40%; el resto corresponde a la fracción proteica. Debajo de la cutícula se extiende la epidermis unilaminar, que a su vez está separada de la hemolinfa por la membrana basal.

Las tres categorías de enzimas (en su forma extracelular) capaces de degradar los componentes mayoritarios de la cutícula de los insectos (proteínas, quitina y lípidos) fueron detectadas en *B. bassiana* por cultivo en placa (Gabriel, 1968) y en medio líquido (Leopold y Samsinakova, 1970). El primer aporte sobre la significación que tiene este sistema multienzimático para la invasión del tegumento *in vivo*, fue dado por Samsinakova *et al.* (1971), quienes obtuvieron un 50% de degradación de la cutícula aislada de *Galleria mellonella*, tras su incubación con fluido extracelular de un cultivo de *B. bassiana*. Estos autores, y posteriormente Smith *et al.* (1981), observaron que dicho proceso de degradación requería de un orden de acción enzimática secuencial: una actividad proteolítica seguida de una actividad quitinolítica. Este resultado, que obtuvieron trabajando con enzimas comerciales de distinto origen, fue posteriormente confirmado por experimentos del mismo tipo en los que se utilizaron enzimas purificadas de *M. anisopliae* (St Leger *et al.*, 1986a). La organización macromolecular de la cutícula explica esta característica referida a su degradación, ya que en ella las fibras de quitina se encuentran “enmascaradas” por proteínas y sólo quedan expuestas y accesibles a la acción de un sistema quitinolítico, si las proteínas han sido hidrolizadas previamente.

Tanto *B. bassiana* como *M. anisopliae* son capaces de crecer *in vitro* a expensas de cutícula como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. En estas condiciones la aparición de las enzimas mencionadas en el medio de cultivo, responde al mismo orden de secuencia que es requerido para la degradación del sustrato, lo que sugiere que dichos organismos habrían desarrollado este sistema de regulación como adaptación para la degradación de la cutícula del hospedante *in vivo* (St Leger *et al.*, 1986b). Un caso análogo ocurre en hongos fitopatógenos en relación a la producción secuencial de pectinasas y celulasas para la degradación de la pared celular vegetal (Cooper, 1984).

Algunas de estas enzimas han sido caracterizadas a distintos niveles. La más estudiada es la endoproteasa alcalina PrI de *M. anisopliae*, la cual se detecta rápidamente en sobrenadantes de cultivos en cutícula. Esta enzima es una serín proteasa de la subclase de las subtilisinas, que exhibe un amplio espectro de actividad proteolítica y una especificidad de quimoelastasa (St Leger *et al.*, 1986c, 1987). Su mecanismo de acción involucra un paso de adsorción al sustrato por medio de uniones iónicas no específicas, seguido de la catálisis, la cual libera

péptidos con una extensión promedio de cinco residuos. Se sintetiza como preproenzima, y el polipéptido maduro secretado tiene un peso molecular de 28,6 kDa. La enzima alcanza a degradar hasta 30% de la proteína cuticular, lo que representa una mayor efectividad que la obtenida en la degradación del mismo sustrato con otras enzimas relacionadas, como la proteinasa K (St Leger *et al.*, 1986c, 1992b).

La síntesis de esta enzima está regulada a nivel transcripcional mediante un sistema de represión-desrepresión. Es reprimida en condiciones de amplia disponibilidad de carbono o nitrógeno, y es sintetizada rápidamente en medio mínimo. Este tipo de regulación ejerce un control catabólico sobre la infección *in vivo*, durante la cual, la enzima es sintetizada como respuesta a la falta de nutrientes sobre la superficie del hospedante (St Leger *et al.*, 1989).

PrI se detectó *in situ* sobre la cutícula de *Manduca sexta*, después de 16 h de inoculación con conidios, coincidentemente con la formación del apresorio en el extremo de los tubos germinativos, y también en la secreción de las hifas durante las instancias iniciales de la penetración de la procutícula (Goettel *et al.*, 1989).

Las evidencias más fuertes en favor del rol de PrI en el parasitismo derivan de dos tipos de experimentos llevados a cabo con larvas de *M. sexta*. El primero de ellos consistió en inocular los insectos con una suspensión de conidios que incluía un inhibidor específico de la enzima; como resultado se obtuvo un 30% menos de mortalidad acumulada a los 5 días post-infección, en comparación con el control (St Leger *et al.*, 1988). En el segundo, se usó una cepa de *M. anisopliae* transformada con copias adicionales del gen *Prl* bajo las órdenes de un promotor constitutivo. Con esta cepa se obtuvo una reducción de 25% en el LT_{50} (St Leger *et al.*, 1996a).

B. bassiana produce una proteasa (*BbPrI*) que presenta 54% de identidad de secuencia con la de *M. anisopliae*, y cuyo modo de acción y control regulatorio son muy similares (Joshi *et al.*, 1995). Esto sugiere que la participación de esta enzima en la degradación de la cutícula constituye un mecanismo de acción conservado de la patogénesis.

En contraste con la abundante información existente sobre las proteasas, las enzimas quitinolíticas han sido mucho menos estudiadas en hongos entomopatógenos. Sin embargo, su participación en el proceso de degradación del tegumento también se considera como factor determinante de la infección; esto surge de la observación de la mayor penetración de *M. anisopliae* en insectos

tratados con un inhibidor de la síntesis de quitina endógena (Hassan y Charnley, 1989).

B. bassiana produce múltiples formas isoenzimáticas de quitinasas en el sobrenadante de cultivos con quitina; las mismas fueron detectadas por electroforesis de proteínas extracelulares totales, por un procedimiento de revelado específico para dicha actividad (St Leger *et al.*, 1993). Un sistema de regulación mediado por los productos de degradación del sustrato, actuaría en forma concertada sobre la síntesis del conjunto de enzimas a través de un mecanismo de inducción-represión. Un estudio de localización ultraestructural de la quitinasa producida mayoritariamente por *M. anisopliae*, evidenció que la enzima es secretada por las hifas en etapas avanzadas de la penetración de la cutícula (St Leger *et al.*, 1996b). Este resultado es consistente con los experimentos de cultivo *in vitro* con cutícula, y refleja que la expresión de la enzima se relaciona con la accesibilidad del sustrato, una vez que queda expuesto por la degradación de la proteína circundante.

1.11. Degradación enzimática de quitina

La quitina es un polímero no ramificado formado por residuos *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unidos por enlaces β -(1,4). Es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, de la que se diferencia en que el hidroxilo del C-2 es reemplazado por un grupo *N*-acetilo. La quitina es producida por los artrópodos (en cantidades masivas por los de origen marino), los hongos, y también se la encuentra en algunos protozoos y diatomeas. Se cree que en los organismos en los que se la encuentra, la quitina se halla sólo como fracción polisacáridica unida covalentemente a otras sustancias, como por ejemplo proteína, y en esta forma se la designa como quitina nativa (Hackman y Goldberg, 1965).

Las uniones β -(1,4) generan un ordenamiento en zig-zag entre los puentes de oxígeno vecinos de la cadena, y como consecuencia, las moléculas adquieren una forma extendida y rígida, lo cual permite que se empaqueten en forma paralela, manteniéndose unidas por puentes de hidrógeno. Cuanto mayor es el empaquetamiento, más cristalina es la estructura; la naturaleza insoluble de este sustrato implica que las enzimas que participan en su degradación sean extracelulares.

La quitina es degradada por sistemas enzimáticos que se han encontrado en microorganismos, animales y plantas (Flach *et al.*, 1992). Las enzimas quitinolíticas se dividen tradicionalmente en dos categorías principales (I. U. B., 1984): endoquitinasas (EC 3.2.1.14), y *N*-acetil glucosaminidasas (EC 3.2.1.30) o *N*-acetil hexosaminidasas (EC 3.2.1.52); también se ha propuesto la existencia de una tercera clase, las exoquitinasas (Robbins *et al.*, 1988). Las formas endo hidrolizan uniones internas de la cadena, liberando oligómeros (2-3 residuos) que son los sustratos principales de las otras actividades. Dada la naturaleza compleja en que se encuentra la quitina en su estado natural (cutícula de insectos, pared celular de hongos), la mayoría de los organismos quitinolíticos producen una familia de quitinasas, cada una con distinta especificidad de sustrato y producto.

En la clasificación general de glicohidrolasas establecida originalmente por Henrissat (1991) en base a la similitud de sus secuencia aminoacídicas, las quitinasas se agrupan en dos familias: 18 y 19 (Henrissat y Bairoch, 1996). Esta clasificación ha sido propuesta como herramienta para inferir relaciones estructurales, evolutivas y de mecanismos de acción para esta clase de enzimas. Con respecto al mecanismo de la catálisis, las glicohidrolasas son de dos tipos básicos: las enzimas que retienen la configuración del carbono anomérico y las que la invierten. Ambos mecanismos implican una hidrólisis ácida con participación de dos residuos críticos: un donador de protón y un nucleófilo. Las enzimas de la familia 18 actúan por un mecanismo de retención, mientras que las de la familia 19 son invertasas.

La amplia distribución de las quitinasas en diferentes organismos responde a roles fisiológicos diversos. En insectos y hongos, su función se relaciona en general con el desarrollo de la cutícula y la morfogénesis de la pared celular, respectivamente (actividad autolítica); en bacterias, para nutrición (actividad *scavenging*); en plantas, como respuesta de defensa (actividad heterolítica). Esta correspondencia de funciones a grupos de organismos, representa una simplificación de las distintas combinaciones que pueden presentarse en la naturaleza, como en el caso del micoparasitismo de insectos.

1.12. Degradación enzimática de quitosano

El quitosano es el polímero de glucosamina (GlcN) derivado de la quitina por deacetilación total o parcial. Se lo encuentra en algunos hongos, conteniendo una proporción de hasta un 50% de residuos acetilados. En su estado natural, este tipo de polímero probablemente no se encuentra en su forma totalmente deacetilada, tal como es definida por el término quitosano usado en sentido estricto, sino con proporciones variables de residuos acetilados. A su vez, se ha señalado que la quitina nativa también presentaría algún grado de heterogeneidad en los monómeros de la cadena, dado que por degradación enzimática, produce GlcN en una proporción de 1 residuo de cada 6 o 7 residuos de GlcNAc; para Rudall (1963), este hecho explica el espaciamiento de 3,1 nm que se observa en la estructura de la molécula mediante difracción de rayos X.

Las quitosanasas (EC 3.2.1.132) son una clase de enzimas que hidrolizan quitosano total o parcialmente acetilado. Algunos de los hongos que contienen quitosano en su pared celular (zygomycetes) son patógenos oportunistas del hombre; el consiguiente interés por combatirlos, llevó al descubrimiento de las quitosanasas en microorganismos capaces de degradar la pared celular de dichos hongos (Monaghan *et al.*, 1973). Estas enzimas exhiben distintas especificidades de sustrato. De acuerdo al estado actual del conocimiento sobre el tema, la característica que las distingue de otras enzimas que presentan actividad similar, es que no degradan uniones entre dos residuos GlcNAc. El resto de las uniones en las posibles combinaciones de dos residuos adyacentes en los copolímeros de GlcN y GlcNAc, son susceptibles de ser clivadas de acuerdo a la quitosanasas particular de que se trate. Las enzimas estudiadas se clasifican en tres subclases en base a dicha especificidad de clivaje (**Figura 4**).

	Subclase I (<i>Streptomyces</i> sp. N174)	Subclase II (<i>Bacillus</i> sp. No 7-M)	Subclase III (<i>B. circulans</i> MH-K1)
Productos de degradación			
Enlaces clivados	GlcN-GlcN GlcNAc-GlcN	GlcN-GlcN	GlcN-GlcN GlcN-GlcNAc

Figura 4. Clasificación de las quitosanasas en tres subclases de acuerdo a los productos de degradación del sustrato quitosano parcialmente acetilado. (○) GlcNAc. (●) GlcN. (⊖, ●) Extremos reductores correspondientes al subsitio D de seis sitios sucesivos de unión de monosacárido (A-F) en el sitio activo de la enzima.

Se han encontrado quitosanasas en bacterias, hongos y recientemente, en plantas. La **Tabla 2** resume las propiedades de las enzimas purificadas de origen microbiano. Todas ellas son endoglicosidasas extracelulares, reguladas por distintos grados de inducibilidad.

El primer gen clonado de una quitosanasa fue el de la bacteria *Bacillus circulans* (Ando *et al.*, 1992). La secuencia de aminoácidos deducida para la proteína evidenció la falta de homología con otras glicosidasas conocidas. Hasta el año 2000 sólo se habían secuenciado cinco genes, cuyas proteínas se clasificaron en tres nuevas familias de glicosidasas. Las familias 46 y 80 reúnen enzimas bacterianas, y la familia 75, enzimas fúngicas. Las enzimas de la familia 46 son invertasas. Se ha determinado la estructura tridimensional de dos quitosanasas miembros de dicha familia: la de *Streptomyces* sp. N174 (Marcotte *et al.*, 1996), y la de *B. circulans* MH-K1 (Saito *et al.*, 1999).

Tabla 2. Clasificación y propiedades de quitosanasas purificadas de microorganismos.

Organismo	Flia. ^a	Sub-clase ^b	CMC ^c	PM (kD)	pI	pH	Actividad Máxima		Referencia
							Temp. (°C)	% GlcNAc en quitosano	
<i>Myxobacter</i> AL-1			Si	31	9	5; 6,8	70	3	Hedges y Wolfe, 1974.
<i>Streptomyces</i> sp. n°6			No	29		4,5-6,5	60	0-30	Price y Storck, 1975.
<i>Penicillium islandicum</i>		I	No	30	4,2	4,5-6	45	30-67	Fenton y Eveleigh, 1981.
<i>Bacillus circulans</i> MH-K1	46	III		30		6,5	50	20	Yabuki <i>et al.</i> , 1988.
<i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037		III	Si	35	9,7	8			Ohtakara, 1988.
<i>Bacillus megaterium</i> P1			Si	43		4,5-6,5	50	20	Pelletier y Sygush, 1990.
<i>Nocardia orientalis</i>		III	No	26	4	5-6	50	33	Sakai <i>et al.</i> , 1991.
<i>Bacillus</i> sp. No 7-M		II	Si	41		6	50	0	Izume <i>et al.</i> , 1992.
<i>Streptomyces</i> N174	46	I	No	29,5	7,5	5,5	65	1-21	Boucher <i>et al.</i> , 1992.
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	75		No	36		5,6	40	30	Shimosaka <i>et al.</i> , 1993.
<i>Acinetobacter</i> sp. CHB101			No	37		5-9	65	20	Shimosaka <i>et al.</i> , 1995.
<i>Matsubacter chitosanotabidus</i>	80		No	34	9,6	4	30-40	10	Park <i>et al.</i> , 1999.
<i>Bacillus</i> sp. CK4	46		No	32		7,5	55	0-50	Yoon <i>et al.</i> , 2000.

^a Familias en la clasificación de glicohidrolasas basada en la similitud de secuencia aminoacídica (Henrissat y Coutinho, 2001).

^b Subclases en la clasificación de quitosanasas basada en los productos de degradación de quitosano (Saito *et al.*, 1999).

^c Hidrólisis de carboximetilcelulosa.

1.13. Estudio genético de la virulencia. *Differential display*

Como se ha mencionado, las características morfológicas de *B. bassiana* son casi siempre invariantes entre cepas distintas dentro de la especie, sin embargo, su variabilidad genética ha sido puesta en evidencia originalmente, por otros criterios tales como virulencia, especificidad de hospedante, o exigencias ecológicas. En los últimos años, los métodos de caracterización basados en marcadores moleculares han permitido desarrollar criterios de identificación a nivel de cepa con el consiguiente aporte a los estudios de taxonomía y ecología de este microorganismo. Por otra parte, la comprensión de los mecanismos de patogénesis depende de la identificación y caracterización de los productos génicos involucrados en la progresión de la infección; sin embargo, la utilidad de los marcadores moleculares para estudiar su asociación con caracteres de interés tal como la patogenicidad, resulta limitada por la falta de reproducción sexual en esta especie. Si bien se han logrado avances significativos, el conocimiento actual sobre el tema es muy limitado. Dicha tarea se hace difícil de abordar con métodos de experimentación fisiológicos o bioquímicos, debido a la complejidad de las interacciones hospedante-patógeno. Por lo tanto, se requiere el desarrollo y la aplicación de técnicas de biología molecular que permitan analizar el tema con un enfoque de genética reversa (Khachatourians, 1996; Clarkson y Charnley, 1996). La profundización de las investigaciones en este aspecto contribuirá a eficientizar la producción de micoinsecticidas, a través de la identificación de determinantes patogénicos que resulten de utilidad ya sea para asistir a la selección de cepas naturales (Leal *et al.*, 1997) o para mejorar cepas por manipulación genética (St Leger *et al.*, 1996a).

El estudio del carácter entomopatogénico puede arrojar resultados de mayor provecho mediante la caracterización de múltiples genes de distintos patógenos, utilizando preferiblemente varios hospedantes como modelo. La disponibilidad de un banco de genes de estas características abre la posibilidad de crear nuevas combinaciones génicas que puedan expresarse en hongos u otros microorganismos entomopatógenos, como así también en plantas, generando nuevas herramientas para el control de plagas (St Leger, 1995).

Una aproximación muy difundida para identificar genes de patogenicidad en microorganismos es el estudio de la expresión diferencial de genes que se activan en respuesta a señales del hospedante (Hensel y Holden, 1996). Dentro de esta

estrategia, una alternativa es el uso de la técnica de *screening* conocida como *Differential display* (Liang y Pardee, 1992); la misma puede aplicarse directamente para la identificación y clonado de genes que se expresan en forma diferencial, en sistemas en los que se excluye la presencia de ARN del hospedante. Basada en la RT-PCR (*reverse transcription-PCR*), dicha técnica consiste en la transcripción reversa y la amplificación sistemática del extremo 3' terminal de una población de ARNm con dos *primers*: un oligo-dT anclado al inicio de la cola de poli A de los ARNm (eucariotas), y un decámero de secuencia arbitraria. Los productos de amplificación de ADNc así obtenidos, se resuelven por electroforesis en geles de poliacrilamida, dando como resultado un patrón de bandas. Por comparación con el patrón resultante de una muestra de ARN diferente del mismo organismo o tipo celular (condición diferencial de cultivo, estadio de desarrollo, etc.), pueden detectarse aquellos fragmentos únicamente presentes en la muestra de interés.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificación de genes relacionados con la patogenicidad de *B. bassiana* a través de su expresión diferencial en cultivo.

Objetivos parciales

- a- Obtención de patrones de amplificación de ARN mensajeros provenientes de dos condiciones de cultivo diferentes.
- b- Aislamiento y caracterización de fragmentos de ADN copia diferenciales resultantes del objetivo anterior.
- c- Determinación de la secuencia codificante completa de los genes correspondientes a dichos fragmentos.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Mantenimiento y producción de *B. bassiana*

En el presente trabajo se utilizó la cepa de *B. bassiana* Bb10 (Colección IMYZA-INTA), aislada en 1990 de un ejemplar de *D. saccharalis*, recolectado en la localidad de Elortondo (Provincia de Santa Fe, Argentina). La misma se conserva como micelio esporulado en tubos con medio agarizado completo, a 4°C, y es mantenida por repiques periódicos (Lecuona, 1996). Esta rutina incluye el pasaje de la cepa a través del hospedante, para evitar la posible pérdida de virulencia por el mantenimiento *in vitro*.

Para inocular los distintos medios líquidos de cultivo se utilizaron conidios obtenidos por crecimiento del hongo en placa con medio completo. Las placas se sembraron a alta densidad y se incubaron a 26°C durante dos semanas, a cuyo término se obtuvo completa esporulación sobre su superficie. Los conidios se suspendieron en una solución acuosa estéril de Tween 80 0,01%, y se desagregaron por agitación en un tubo con perlas de vidrio. El agregado de este tensioactivo permite dispersar los conidios en fase acuosa a pesar de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de los mismos. La concentración de conidios en la suspensión se determinó por recuento al microscopio en una cámara de Malassez.

Medio agarizado completo

KH₂PO₄ 0,4 g
Na₂HPO₄ 1,4 g
MgSO₄ 0,6 g
KCl 1 g
NH₄NO₃ 0,7 g
Glucosa 10 g
Extracto de levadura 5 g
Agar 15 g
Agua destilada csp 1 l

2.2. Cría en laboratorio de *D. saccharalis*

La cría de este insecto se realiza en cámaras acondicionadas a una temperatura de 26°C, humedad relativa de 60% y fotofase de 14 h (Crespo *et al.*, 1996). Periódicamente se incorporan nuevos individuos a la colonia de cría, los cuales son recolectados como larvas o pupas dentro de los tallos de sus plantas hospedantes, o bien como adultos obtenidos en trampas de luz.

La cría de adultos se efectúa en tubos plásticos de 25 cm de altura y 11 cm de diámetro; como base y tapa de los mismos se utilizan cajas de Petri de 15 cm de diámetro. Los tubos contienen interiormente papel sulfito humedecido (se emplea como sustrato de oviposición) y alimento para adultos. Este tipo de jaula permite colocar en su interior 30 pupas, manteniendo una relación de sexos de 2 hembras: 1 macho.

Los trozos de papel conteniendo las posturas adheridas se desinfectan con una solución de hipoclorito de sodio 0,1% durante 3 min, luego se enjuagan con agua destilada, se dejan secar, y se colocan en un recipiente cerrado con dieta para larvas. Completados los estadios larvarios, las pupas de las que emergerán los adultos son retiradas, sexadas (el tamaño de las hembras es mayor que el de los machos) y colocadas en las jaulas para adultos.

Alimento para adultos

Sacarosa 30 g
 Acido sórbico 1 g
 Acido ascórbico 1 g
 Benzoato de sodio 1 g
 Agua destilada 1 l

Dieta para larvas

Harina de poroto alubia 100 g
 Harina de maíz 35 g
 Germen de trigo 35 g
 Extracto de levadura 30 g
 Acido sórbico 1 g
 Acido ascórbico 5 g
 Benzoato de sodio 2 g
 Agar 30 g
 Formaldehído 2 ml
 Agua destilada 1 l

2.3. Preparación de cutícula

Grupos de aproximadamente 600 larvas de tercer estadio de desarrollo (L3) se separaron de la cría masiva de *D. saccharalis* y se transfirieron a cajas de poliestireno de 29 cm × 23 cm × 6 cm, conteniendo 1 kg de dieta para larvas distribuida homogéneamente en sus pisos. Las mismas se mantuvieron en las condiciones de cría durante 10 días, período durante el cual las larvas alcanzaron el último estadio de desarrollo (L5). Luego, las larvas fueron recolectadas y procesadas inmediatamente como se describe a continuación, o almacenadas a -70°C para ser usadas posteriormente.

La cutícula se extrajo siguiendo el método utilizado por Smith *et al.* (1981) para larvas de la isoca de la espiga del maíz (*Heliotis zea*): las larvas se hirvieron en SDS 1% (1,2 ml/larva) durante 4 h, en agitación. Este tratamiento solubiliza los

tejidos internos, mientras que el exoesqueleto permanece como residuo insoluble, conservando su arquitectura intacta. En consecuencia, la cutícula se observa como una lámina delgada y transparente, con la forma original de la larva. Químicamente, esta estructura consiste en el complejo de unión covalente quitina-proteína. La cutícula obtenida como producto del tratamiento de las larvas con SDS, se lavó por sucesivos pasajes en agua destilada y se secó en estufa a 60°C. Para su utilización en el medio de cultivo se molió en un mortero hasta obtener un polvo fino.

2.4. Cultivos diferenciales

Se preparó una suspensión de conidios como se describe en el apartado 2.1; la misma se lavó, y se ajustó a una concentración de 10^8 conidios/ml. Un mililitro de esta suspensión se usó para inocular 100 ml de medio de cultivo líquido. Se formularon dos medios de cultivo, con la misma fracción basal de sales minerales (Thomas *et al.*, 1987). A uno de ellos se agregaron glucosa y nitrato como nutrientes solubles (medio NS), y al otro se agregó 1% de cutícula molida de *D. saccharalis* (medio CUT). Ambos cultivos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA), a 26°C, por 3 días. El micelio se recuperó por centrifugación a 5.000 rpm por 10 min (rotor Kontron A.6.14), se lavó con solución fisiológica estéril, y se procesó para extraer el ARN total inmediatamente.

Medio NS

Glucosa 5%

KNO₃ 1%

KH₂PO₄ 0,5%

MgSO₄ 0,2%

Micronutrientes (cantidades por 100 ml de medio): CaCl₂·2H₂O, 5 mg; FeCl₃·6H₂O, 1 mg; MnSO₄·H₂O, 0,25 mg; ZnSO₄·7H₂O, 0,25 mg; CuSO₄·5H₂O, 50 µg; CoCl₂·6H₂O, 20 µg; Na₂MoO₄·2H₂O, 20 µg.

2.5. Purificación de ARN total

Se siguió el método de extracción de ARN total con tiocianato de guanidina (Chomczynsky y Sacchi, 1987). El tiocianato de guanidina es un potente desnaturalizante de proteínas y su uso se recomienda para trabajar muestras con altos niveles de ARNasa endógena. El protocolo se basa en la extracción selectiva del ARN en la fase acuosa (pH 4) de un sistema líquido bifásico, con una fase

orgánica de fenol/cloroformo. El agua y las soluciones acuosas empleadas -excepto la solución desnaturizante y las que contienen Tris- se trataron con dietil pirocarbonato (DEPC).

El micelio crecido en cada medio se recuperó por centrifugación del cultivo durante 10 min a 5.000 rpm (rotor Kontron A.6.14), y se lavó con solución fisiológica estéril. El exceso de líquido en el *pellet* se escurrió sobre un papel de filtro, y el micelio se molió con N₂ líquido en un mortero. El polvo congelado resultante se transfirió inmediatamente a un tubo conteniendo solución desnaturizante (1 ml/0,1 g de micelio), y la mezcla se homogeneizó por agitación. Luego se agregaron en el siguiente orden (volúmenes relativos a 1 ml de solución desnaturizante): 0,1 ml de NaAcO 2 M, pH 4, 1 ml de fenol saturado con agua y 0,2 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), agitando por inversión después de cada agregado. La mezcla se incubó 15 min en hielo y luego se centrifugó 20 min a 10.000 rpm (rotor Kontron A.8.24), a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN mediante el agregado de un volumen de isopropanol. Se incubó 30 min a -20°C y luego se centrifugó 10 min a 10.000 rpm, a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 300 µl de solución desnaturizante, se fraccionó en tres alícuotas, y cada una de ellas se reprecipitó con isopropanol como se describe en el paso anterior. Los *pellets* se lavaron con etanol 75%, se secaron, y cada uno se resuspendió en un solvente distinto: 1) agua tratada con DEPC, 2) formamida y 3) etanol 75%. Se conservaron a -70°C. Dichas alternativas se ensayaron para evaluar su influencia sobre el estado de conservación de las muestras, teniendo en cuenta además, que las muestras resuspendidas en formamida pueden sembrarse directamente en geles desnaturizantes. El ARN se cuantificó por absorbancia medida a 260 nm en un espectrofotómetro (Specord M500, Zeiss, Jena, Alemania).

Solución desnaturizante

Isotiocianato de guanidina 4 M

Citrato de sodio 25 mM, pH 7

Sarkosyl 0,5%

β-Mercaptoetanol 0,1 M

2.6. RT-PCR. *Differential display*

2.6.1. Tratamiento del ARN total con ADNasa

Las muestras de ARN en agua (hasta 10 µg) se llevaron a 50µl con buffer TE, pH 7,4 (concentración final 1X). A este volumen se le agregaron 50 µl de mezcla de reacción, 20 U de inhibidor de ribonucleasa RNasin® (Promega, Madison, WI, USA) y 1 U de ADNasa RQ1 libre de ARNasa (Promega). La mezcla se incubó 15 min a 37°C, y la reacción se detuvo agregando 25 µl de mezcla de terminación. Luego se extrajo con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y con cloroformo/isoamílico (24:1). El ARN se repurificó en forma estándar por precipitación con etanol, lavado y resuspensión en agua (Sambrook *et al.*, 1989). El mismo tratamiento se le aplicó a una muestra control que incluía además del ARN, 220 ng de ADN del fago λ digerido con *Hind*III. La desaparición del ADN en el control, como resultado del tratamiento, se controló en un gel de agarosa nativo teñido con bromuro de etidio, y por fluorometría.

<u>Buffer TE 1X, pH 7,4</u>	<u>Mezcla de reacción</u>	<u>Mezcla de terminación</u>
Tris-HCl 10 mM, pH 7,4	TE 1X, pH 7,4	NaAcO 1,5 M
EDTA 1 mM	MgCl ₂ 20 mM	EDTA 50 mM
	DTT 2 mM	SDS 1%

2.6.2. Transcripción reversa (RT)

Se usó un *primer* oligo-dT con una base de anclaje: 5' AAGCT₁₁A 3' (HTA, Liang *et al.*, 1994).

Para la transcripción reversa se ensayaron tres protocolos. Los resultados se compararon analizando en un gel de agarosa el producto marcado de una alícuota de cada reacción, incubada en presencia de [α -³²P]dATP. El protocolo adoptado se llevó a cabo en un volumen de reacción de 10 µl. La mezcla conteniendo 500 ng de ARN total y 100 ng de *primer* se calentó a 100°C durante 5 min y se enfrió rápidamente en agua-hielo. Luego se agregó hidroximetilmercurio a una concentración final de 20 mM y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregó la siguiente mezcla para completar el volumen final: 0,2 µl de β-mercaptoetanol, 0,2 µl de dNTPs 10 mM, 4 U de transcriptasa reversa AMV

(Promega), 10 U de RNasin® y 2 µl de buffer de la enzima 5X. La reacción se incubó 1 h a 42°C.

2.6.3. Amplificación de ADNc por PCR

Las reacciones de amplificación de cada muestra de ADNc se realizaron con *primers* decámeros arbitrarios (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) en combinación con el oligo-dT. Se usó un volumen de reacción de 10 µl, en tubos capilares en un ciclador térmico a aire (1605 air thermo-cycler, Idaho Technology, Idaho Falls, ID, USA). Se ensayaron distintas concentraciones de reactivos y condiciones de ciclado hasta alcanzar su optimización. En base a los resultados obtenidos, el ciclado se fijó en: desnaturalización inicial, 1 min a 94°C; 40 ciclos de: desnaturalización, 0 seg a 94°C, *annealing*, 5 seg a 40°C, extensión, 15 seg a 72°C; y extensión final, 2 min a 72°C. La mezcla de reacción consistió en Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, *primers* 0,5 µM cada uno, 0,1 U/µl de *Taq* ADN polimerasa, 500 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), y 0,1 µl de la reacción de RT como molde.

Para una rápida identificación de los *primers* informativos de bandas diferenciales entre los patrones de amplificación de los ARNm de ambas condiciones de cultivo, los productos de reacción se marcaron con fluorescencia para analizarlos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en un secuenciador automático. La marcación fluorescente se llevó a cabo mediante el agregado, en la mezcla de reacción de PCR, de uno de tres diferentes fluoróforos ([F]dUTPs, 2'-deoxiuridina 5'trifosfato marcada con los colorantes de tipo rodamina R110, R6G o TAMRA, PRISM™ dUTP *set*; PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a una concentración final de 1 µM (R110 y R6G) o 4 µM (TAMRA).

2.6.4. Electroforesis

Los productos de amplificación marcados con grupos fluorescentes se centrifugaron a través de columnas de filtración molecular de Sephadex G50 (Senti-Sep™; Princeton Separations, Princeton, NJ, USA) en una microcentrífuga a 3.200 rpm, por 2 min, para eliminar los [F]dUTPs no incorporados. Una fracción del eluato (0,8 µl) se mezcló con 3,7 µl de formamida y 0,5 µl del marcador de peso

molecular GeneScan-1000™, marcado con el colorante de rodamina ROX (Applied Biosystems). Los 5 µl resultantes se incubaron a 90°C por 2 min, luego se enfriaron rápidamente en agua-hielo, y se sembraron en geles de poliacrilamida 6%/urea 8,3 M/TBE 1X. Los geles se sometieron a 1.100 V por aproximadamente 3 h en un secuenciador automático ABI PRISM™ 373 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems). Se usó el programa GeneScan™ 672 para analizar los perfiles electroforéticos y asignar pesos moleculares a las bandas.

El resto del volumen de las reacciones con *primers* que revelaron fragmentos diferenciales, presentes únicamente en la condición de cultivo sobre cutícula, se resolvieron en geles del mismo tipo, aunque en este caso los geles se revelaron por tinción con nitrato de plata, con el propósito de recuperar dichos fragmentos (Doss, 1996). Terminada la electroforesis, el gel (adherido al vidrio tratado previamente con *bind silano*) se fijó con ácido acético 10%, durante 20 min. Luego de tres lavados con agua destilada, se transfirió a la solución de tinción, en la que se mantuvo en agitación, durante 30 min. Después de un breve lavado con agua (5-10 seg), el gel se reveló por inmersión en solución de revelado fría, hasta la aparición de las bandas. Finalmente se fijó en la misma solución inicial (2 min), se lavó dos veces con agua, y se transfirió a un papel de filtro, pudiéndose separar del vidrio mediante un breve pasaje por NaOH 10%.

TBE 1X

Tris base 90 mM
Acido bórico 90 mM
EDTA 2 mM

Solución de tinción

AgNO₃ 1 g
Formaldehído 37% 1,5 ml
Agua bidestilada 1 l

Solución de revelado

Na₂CO₃ 30 g
Tiosulfato de sodio 2 mg
Formaldehído 37% 1,5 ml
Agua bidestilada 1 l

2.6.5. Recuperación de bandas de geles de poliacrilamida

Los trozos escindidos del gel, conteniendo los fragmentos diferenciales, se rehidrataron por dos pasajes sucesivos en buffer TE, pH 7,6. Luego se disgregaron en 10 µl del mismo buffer, y una fracción de dicho volumen se utilizó para reamplificar los fragmentos, siguiendo el protocolo de PCR descrito en el apartado 2.6.3.

2.7. Clonado de fragmentos de PCR

Los fragmentos se clonaron con el sistema pGEM®-T (Promega). El vector es el plásmido pGEM-5Zf(+) cortado con *EcoRV*, con una timidina terminal agregada en ambos extremos 3'. De esta forma, sus extremos resultan compatibles con los extremos 3' de los fragmentos de PCR, en los que la *Taq* polimerasa agrega una adenosina sin dependencia de molde.

2.7.1. Ligación

La ligación se realizó con 1,5 U de ADN ligasa del fago T4, en un volumen final de reacción de 5 µl, en el buffer de la enzima, y se incubó 16 h a 4°C. Se utilizaron 25 ng del vector, y la cantidad del fragmento de ADN a clonar se ajustó a una relación molar inserto/vector de 3:1.

2.7.2. Preparación de células electrocompetentes

Se inoculó 1 l de medio LB con 10 ml de un cultivo de bacterias *Escherichia coli* DH5α crecido durante una noche. Las células se incubaron a 37°C con agitación, hasta alcanzar una $DO_{600}=0,5$ (la mayor competencia se logra en la fase de crecimiento exponencial temprana a media). En este punto, el cultivo se enfrió en agua-hielo durante 30 min y se centrifugó 15 min, en alícuotas de 200 ml, a 4.000 rpm (rotor Kontron A.6.14), a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 1 l de glicerol 10% estéril (helado). Se realizaron tres rondas adicionales de centrifugación-resuspensión en glicerol 10%, pero disminuyendo progresivamente los volúmenes de resuspensión hasta 2-3 ml finales. Las suspensiones de células así obtenidas se guardaron en alícuotas a -70°C para ser usadas inmediatamente después de ser descongeladas.

Medio LB

Triptona 1%

Extracto de levadura 0,5%

NaCl 0,5%

(Agar 1,5%, para medio sólido)

2.7.3. Transformación

Se empleó el sistema de electroporación utilizando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cuarenta microlitros de bacterias electrocompetentes se mezclaron con 1 μ l de reacción de ligación y se sometieron a un pulso de 2,5 kV en una cubeta de 0,2 cm de distancia entre electrodos. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 μ F y 200 Ω , respectivamente. El procedimiento se efectuó en frío, y una vez descargado el voltaje, las bacterias se resuspendieron con 960 μ l de SOC, y se incubaron 1 h a 37, antes de ser sembradas en placa.

SOC

Triptona 2%
Extracto de levadura 0,5%
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM
MgCl₂ 10 mM
MgSO₄ 10 mM
Glucosa 20 mM

2.7.4. Selección y análisis de transformantes

Después de la transformación, 100 μ l de la suspensión de bacterias se sembraron en placas con agar LB conteniendo ampicilina (100 μ g/ml), 40 μ l de X-gal (20 mg/ml, en N, N-dimetilformamida) y 4 μ l de IPTG (200 mg/ml). Las placas se incubaron una noche, a 37°C. Las colonias portadoras de plásmidos recombinantes se identifican por su color blanco (en ellas no se manifiesta actividad β -galactosidasa debido a la inactivación insercional del péptido de complementación α), mientras que las colonias transformadas con plásmidos no recombinantes desarrollan color azul. El IPTG actúa como inductor no metabolizable de la enzima, y el X-gal como sustrato cromogénico.

Los clones positivos fueron controlados para la presencia del inserto en el plásmido, por amplificación por PCR. Se utilizaron *primers* complementarios a los promotores de los fagos T7 y SP6, que flanquean al sitio de clonado múltiple del plásmido (MCS). Como molde para la reacción, se utilizó el sobrenadante de una suspensión de bacterias, obtenida por repique de una colonia en 50 μ l de buffer TE, y luego calentada a 100°C, durante 5 min.

2.8. Purificación de ADN plasmídico (miniprep)

Para la purificación de los plásmidos se usó el método de lisis alcalina, con un paso adicional de precipitación selectiva con polietilenglicol (PEG).

Con cada colonia transformada con el plásmido de interés se inocularon 5 ml de caldo *Terrific* con ampicilina (100 µg/ml). El cultivo se creció una noche, a 37°C, con agitación a 250 rpm. Tres alícuotas (de 1,5 ml cada una) del cultivo crecido, se centrifugaron sucesivamente en un mismo tubo de microcentrífuga por 1 min, y el *pellet* obtenido se resuspendió con 200 µl de buffer GTE. Se agregaron 300 µl de NaOH 0,2 N/SDS 1%; se mezcló por inversión y se incubó en hielo 5 min. La mezcla fue neutralizada con 300 µl de KAcO 3 M, pH 4,8. Después de 5 min de incubación en hielo, se centrifugó 10 min (esta centrifugación, como las que siguen, se efectuaron a máxima velocidad). El sobrenadante se incubó 30 min a 37°C con ARNasa A (20 µg/ml) y se extrajo dos veces sucesivas con cloroformo. El ADN se precipitó agregando 1 volumen de isopropanol a la fase acuosa y centrifugando 10 min. El *pellet* se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 32 µl de agua. Luego se agregaron 8 µl de NaCl 4 M y 40 µl de PEG 8.000 13%, y se incubó en hielo 20 min. Finalmente se centrifugó 15 min, a 4°C. El *pellet* de plásmido se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua.

Caldo *Terrific*

Triptona 1,2%
Extracto de levadura 2,4%
KH₂PO₄ 17 mM
K₂HPO₄ 72 mM
Glicerol 4 ml/l

Buffer GTE

Glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM, pH 8
EDTA 10 mM, pH 8

2.9. Secuenciación

Para las reacciones de secuenciación se utilizó el sistema *Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (PE Applied Biosystems) en un ciclador Perkin Elmer 9600, según las instrucciones del fabricante. El mismo se basa en el método de terminación de las cadenas mediada por la incorporación de dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). En este caso, cada ddNTP está marcado con uno de los cuatro colorantes fluorescentes de tipo rodamina: ROX, TAMRA, JOE y FAM. El ciclado amplifica las cadenas en forma lineal. Como *primers* se usaron los oligonucleótidos complementarios a los promotores de los fagos T7 y SP6, que flanquean al sitio de

clonado múltiple del plásmido, en reacciones separadas (secuencias directa y reversa). La cantidad de molde por reacción fue de 250 ng de plásmido. La preparación de las muestras y la electroforesis se llevaron a cabo esencialmente como se explica en el apartado 2.6.4. Los datos del gel se analizaron con los programas Sequencing Analysis y SeqEd 675 DNA Sequence Editor (Applied Biosystems).

2.10. Northern blot

Esta técnica permite determinar el tamaño y la cantidad relativa de moléculas específicas de ARNm en preparaciones de ARN total. Consiste en el fraccionamiento del ARN por tamaño, mediante electroforesis en gel desnaturante de agarosa, su transferencia a membrana (inmovilización), y la detección de la especie de interés por hibridación con una sonda marcada. La cuantificación por densitometría de la autoradiografía, permite hacer estimaciones comparativas de la cantidad de dicha secuencia, en distintas preparaciones.

2.10.1. Geles desnaturizantes para ARN

Las muestras de ARN total se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1%, con formaldehído como agente desnaturizante. En este sistema se pueden resolver moléculas de tamaño de entre 500 b y 10.000 b, evitando la formación de estructuras secundarias. El buffer usado tanto para la electroforesis, como para la preparación del gel y de las muestras, consistió en (concentraciones finales): MOPS 1X, formaldehído 2,2 M. Las muestras se ajustaron a 50% de concentración final de formamida, y antes de sembrarse se sometieron al siguiente tratamiento: calentamiento a 60°C por 15 min, seguido de enfriamiento rápido en agua-hielo. Finalmente, se les agregó 0,1 volumen de buffer de carga y 1 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml). Las soluciones se formularon con agua tratada con DEPC. Los geles sembrados con las muestras, se sometieron a 3-5 V/cm durante aproximadamente 5 h, a 4°C. El buffer se homogeneizó una vez, a la mitad de la electroforesis.

Buffer MOPS 10X

MOPS 0,4 M, pH 7

NaAcO 0,1 M

EDTA 10 mM

Buffer de carga

Glicerol 50%

EDTA 1 mM, pH 8

Azul de bromofenol 0,25%

Xilen cianol 0,25%

2.10.2. Transferencia a membrana

Una vez terminada la electroforesis, los geles desnaturalizantes para ARN se lavaron por sucesivos pasajes en agua para eliminar el formaldehído. El ARN se transfirió a una membrana de nylon cargado (Zeta-Probe® GT; Bio-Rad) durante una noche, mediante el sistema de transferencia por capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989), con buffer SSC 10X. Transcurrido el tiempo de la transferencia, la membrana se lavó brevemente con SSC 2X, luego se dejó secar a temperatura ambiente, y finalmente se sometió a 80°C por 30 min.

SSC 10X

NaCl 1,5 M

Citrato de sodio 0,15 M

2.10.3. Marcación de sondas

Los fragmentos de ADN usados como sondas (provenientes de amplificación por PCR o de la digestión de plásmidos) se purificaron a partir de geles de agarosa con el sistema Geneclean II® Kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA, USA). El trozo de gel conteniendo el fragmento se disolvió en 3 volúmenes de NaI 6 M a 50°C, y el ADN liberado se adsorbió sobre sílica, de la cual se eluyó con agua, después de varios lavados con etanol 50%. Para la marcación de los fragmentos se usó la técnica de *random priming* (NEBlot®Kit; New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA). Típicamente se marcaron 25-100 ng de ADN molde con 2 µCi [α^{32} P]dATP, en un volumen de reacción de 50 µl. Para minimizar el *background* en la hibridación, las sondas se centrifugaron a través de columnas de Sephadex G50 (Senti-Sep™, Princeton Separations), con el fin de eliminar el nucleótido radiactivo no incorporado. Luego se incubaron a 100°C por 5 min, seguido de rápido enfriamiento en agua-hielo, para finalmente incorporarlas a la solución de hibridación.

2.10.4. Hibridación

Las hibridaciones se realizaron en un horno de hibridación, a 55°C, por una noche. Las membranas se dispusieron en tubos de vidrio con solución de hibridación (150 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de membrana). Esta misma solución se utilizó como bloqueante en un paso de prehibridación de 30 min, luego del cual la solución se recambió, y se agregó la sonda. Completada la hibridación, las membranas se sometieron a tres lavados sucesivos, con concentraciones decrecientes de SSC. Los lavados se realizaron con agitación, durante 15 min cada uno; los dos primeros de ellos, a temperatura ambiente, y el último, a 65°C. Las soluciones de lavado son referidas al final de este apartado como 1ra, 2da, y 3ra, de acuerdo al orden en que fueron usadas.

Para poder utilizar las membranas en experimentos de rehibridación, las mismas se expusieron húmedas en plásticos sellados. La primera sonda hibridada se eliminó mediante un lavado con SSC 0,1X/SDS 0,5%, a 95°C.

Solución de hibridación

Na₂HPO₄ 0,12 M, pH 7,2
NaCl 0,25 M
SDS 7%
Formamida 28%

Soluciones de lavado (1ra, 2da, 3ra)

SDS 0,1%
SSC (2X, 0,5X, 0,1X)

2.10.5. Autoradiografía

Se empleó el sistema automatizado de detección de ³²P con un equipo InstantImager™ (Packard, Meriden, CT, USA). El mismo se utilizó para la cuantificación densitométrica de las imágenes obtenidas.

2.11. Southern blot

Esta técnica consiste en la inmovilización de ADN en membrana, y su posterior hibridación con una sonda marcada. El ADN puede ser transferido a la membrana a partir de un gel de agarosa, en el que se ha fraccionado por tamaño, por ejemplo, el producto de la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción. Para ser utilizado en los experimentos de *southern* genómico, el ADN se obtuvo mediante el protocolo descrito en el apartado 2.11.1. Luego se digirió con distintas enzimas de restricción (1 U/ μg de ADN) en los buffers respectivos, durante 1 h, a

37°C. Diez microgramos del producto de digestión se sembraron en geles de agarosa 1%. El ADN se depuró parcialmente sumergiendo el gel en HCl 0,25 M, durante 10 min, y se transfirió como se describe en el apartado 2.10.2, sólo que en este caso se utilizó NaOH 0,4 M como solvente de transferencia. Los procedimientos de hibridación y autoradiografía se realizaron como se describieron en los apartados anteriores.

2.11.1. Protocolo estándar de extracción de ADN

Se empleó la técnica descrita por Tigano-Milani *et al.* (1995), con algunas modificaciones. La misma se basa en la eliminación de los polisacáridos contaminantes de un lisado de la muestra, por medio de una extracción con cloroformo, en presencia del detergente no iónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

Como material de partida se utilizó micelio crecido en medio líquido. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers conteniendo 100 ml de medio completo inoculados con 1 ml de una suspensión de conidios (10^8 conidios/ml). Los mismos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm, durante 72 h, a 26°C. El micelio se recuperó por centrifugación del cultivo durante 10 min, a 5.000 rpm (rotor Kontron A.6.14), y se lavó con solución fisiológica estéril. El exceso de líquido en el *pellet* se escurrió sobre un papel de filtro, y el micelio se molió con N₂ líquido en un mortero. El polvo congelado resultante se transfirió inmediatamente a un tubo conteniendo buffer de lisis (5 ml/g de micelio), y la mezcla se homogeneizó por agitación. Luego se agregaron 0,5 ml de SDS 10% y se incubó 1 h a 37°C, con agitación ocasional. Posteriormente, se agregaron en el siguiente orden: 0,75 ml de NaCl 5 M y 0,625 ml de solución CTAB, homogeneizando la mezcla por inversión, después de cada agregado. Después de incubar la mezcla 30 min a 65°C, con agitación, se la dejó enfriar a temperatura ambiente, y se la extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa se incubó con ARNasa (10 µg/ml) durante 30 min, a 37°C, y se extrajo nuevamente como en el paso anterior. El ADN se precipitó de la fase acuosa con 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se recuperó directamente, adherido al extremo de una pipeta Pasteur sellada. Se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en buffer TE, para luego ser conservado a

-20°C. El ADN se cuantificó con un fluorómetro (DyNA Quant™200, Hoefler, San Francisco, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Buffer de lisis

Tris-HCl 50 mM, pH 8
NaCl 50 mM
EDTA 100 mM

Solución CTAB

NaCl 0,7 M
CTAB 10%

2.12. Construcción de una genoteca de ADN genómico de *B. bassiana* en vector λ

2.12.1. Principios teóricos

2.12.1.1. Generalidades

El requisito principal de una genoteca es que contenga la cantidad suficiente de clones que asegure la representación de una versión completa del genoma. La estrategia básica para lograrlo consiste en minimizar la cantidad de clones (por incorporación de fragmentos genómicos de gran tamaño), y maximizar la eficiencia de clonado. El número de clones independientes (N) que deben someterse a *screening* para aislar una secuencia particular, con una probabilidad P, puede estimarse en base a una distribución de Poisson, y viene dado por:

$$N = \ln(1-P) / \ln[1-(I/G)]$$

I= tamaño promedio de los fragmentos clonados

G= tamaño del genoma

Para un vector derivado del fago λ , I= 2×10^4 pb, y para *B. bassiana*, G= 4×10^7 (Pfeifer y Khachatourians, 1993). Por lo tanto, en este caso, N= 9.000 (con P= 0,99).

2.12.1.2. Vectores de clonado de sustitución

Cuando λ inyecta su ADN en el huésped (infección), puede generar un ciclo lítico o lisogénico. En el primer caso, el fago produce gran cantidad de copias de su genoma, empaqueta las mismas en nuevas partículas virales, y ocasiona la lisis de la bacteria, liberando la progenie. En el segundo, se integra en el cromosoma bacteriano y acompaña su replicación. Para la lisogenización, se requiere entre otros, del producto del gen *cI* (represor de las funciones líticas). Los derivados de λ que se utilizan como vectores de clonación son *cI⁻*. El otro aspecto en el que se basa la

construcción del tipo de vectores derivados de λ , llamados de sustitución, es la posibilidad de eliminar un bloque de genes (algo más de un tercio del genoma) no esenciales para el crecimiento lítico, y reemplazarlo por ADN foráneo. Para llevar a cabo esta sustitución, una alternativa consiste en separar la región dispensable (*stuffer*), y ligar los segmentos externos purificados (brazos) al ADN que se pretende clonar. A esto le sigue el empaquetamiento *in vitro* de fagos viables, agregando extractos celulares con las proteínas del fago. Aunque la eficiencia del empaquetamiento es baja, la eficiencia de formación de placas de lisis en *E. coli*, es muy alta. Para el tipo de vector descrito, la selección de recombinantes se basa en el hecho de que existe una restricción en el tamaño del genoma para que éste pueda ser empaquetado (entre 78 y 105% del tamaño de λ silvestre).

2.12.1.3. ADN inserto

Los vectores de sustitución admiten insertos de ADN de entre 9 y 23 kpb. Una condición que debe cumplirse es que dichos fragmentos provengan del corte al azar del ADN genómico. Esto se logra por ruptura mecánica, pero también puede aproximarse por medio de una digestión parcial con una enzima de restricción de corte frecuente y no sesgado. Para cortar el ADN al azar en fragmentos dentro de dicho rango de tamaño, se requiere que el ADN de partida exceda las 100 kpb en promedio, para lo cual se debe utilizar un método de extracción que rinda ADN de alto peso molecular.

2.12.2. Metodología

Para obtener ADN de *B. bassiana* de alto peso molecular es necesario evitar la utilización de métodos mecánicos de ruptura de la pared celular, los cuales derivan en la fragmentación del ADN. Con el protocolo estándar de extracción descrito anteriormente, cuyo primer paso consiste en moler el micelio en un mortero con N₂ líquido, se obtiene ADN de aproximadamente 50 kpb de tamaño promedio. Como este tamaño resulta insuficiente para la presente aplicación, se siguió un procedimiento alternativo que consistió en preparar protoplastos (células desprovistas de pared) de *B. bassiana* y utilizarlos como material de partida en un

protocolo de extracción de ADN de alto peso molecular para células de mamífero (Sambrook *et al.*, 1989).

2.12.2.1. Preparación de protoplastos

Se empleó la técnica utilizada por Pfeifer y Khachatourians (1987) para la obtención de protoplastos de *B. bassiana* a partir de blastosporas, con algunas modificaciones. En particular, se utilizó una fuente de enzimas líticas diferente, y se partió de otra fase de crecimiento del hongo.

Se realizaron cultivos en erlenmeyers conteniendo 100 ml de medio completo inoculados con 1 ml de una suspensión de conidios (10^8 conidios/ml). Los mismos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm, durante 16 h, a 26°C. Al término de este período de cultivo, el tubo germinativo alcanza un desarrollo mínimo equivalente al diámetro del conidio. Los cultivos se centrifugaron a $10.000 \times g$, 10 min, a 4°C. Después de un lavado con buffer fosfato 0,02 M, pH 7, las células se preincubaron durante 30 min, en 50 ml de mezcla de preincubación, a 30°C, con agitación. La preincubación se lavó con buffer fosfato y se resuspendió en 10 ml de solución estabilizante. A esta suspensión se le agregaron 5 mg de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* y 1 mg de β -glucuronidasa (Sigma, St. Louis, MO, USA). La mezcla se incubó a 30°C, durante 4 h, con agitación. La formación de protoplastos se siguió por observación al microscopio del cambio de la forma de las células (de tubular a esférica) y de la sensibilidad de las mismas al SDS 0,1% (estallido).

Mezcla de preincubación
Buffer Tris-HCl 0,02 M, pH 7
DTT 0,01 M

Solución estabilizante
Buffer fosfato 0,02 M, pH 7
(NH₄)₂SO₄ 0,6 M

2.12.2.2. Protocolo de extracción de ADN de alto peso molecular

La mezcla de incubación con protoplastos se llevó al doble de volumen con buffer TBS helado y se centrifugó a $1.500 \times g$, 10 min, a 4°C. Luego se resuspendió en 5 ml de buffer TE, pH 8, y se agregaron 50 ml de buffer de extracción. Después de incubar 1 h a 37°C, se agregó proteinasa K, a una concentración final de 100 $\mu g/ml$, extendiendo la incubación por 3 h a 50°C, con agitación ocasional. La

preparación se sometió luego a tres extracciones fenólicas sucesivas. El ADN se precipitó de la fase acuosa mediante el agregado de 0,2 volúmenes de $(\text{NH}_4)_2\text{AcO}$ 10 M y 2 volúmenes de etanol. El ADN precipitado se recuperó directamente, adherido al extremo de una pipeta Pasteur sellada. Se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en buffer TE, en un tubo de microcentrífuga. Para ello, el tubo se agitó durante una noche en una plataforma oscilante, a temperatura ambiente, y luego se conservó en heladera.

Buffer TBS

Tris-HCl 20 mM, pH 7,4

NaCl 0,1 M

KCl 2 mM

Buffer de extracción

Tris-HCl 10 mM, pH 8

EDTA 0,1 M, pH 8

ARNasa A 20 $\mu\text{g/ml}$

SDS 0,5%

2.12.2.3. Digestión parcial de ADN

Con el objeto de establecer la concentración óptima de la enzima *Sau3AI* para generar fragmentos de digestión parcial del ADN en un rango de tamaño de 9-23 kpb, las condiciones de reacción se optimizaron en pequeña escala. Para ello, se prepararon reacciones de 50 μl en el buffer de la enzima, conteniendo 1 μg de ADN y cantidades variables de enzima (2,6-0,01 U). Las reacciones se incubaron 30 min a 37°C y se detuvieron mediante el agregado de 1 μl de EDTA 0,5 M y 10 μl de buffer de siembra. Los resultados se observaron por electroforesis en un gel de agarosa 0,4% sometido a 2 V/cm durante 16-20 h. El mismo se tiñó con bromuro de etidio y se reveló al UV. Identificada la concentración de enzima que produjo la máxima intensidad de fluorescencia en el rango de tamaño deseado para el producto de la digestión, dicha concentración se consideró como el doble de la óptima que luego se usó en mayor escala. Esta corrección contempla el desfase que existe entre la distribución de intensidad de fluorescencia en un gel y la abundancia relativa de los fragmentos de cada tamaño (Seed *et al.*, 1982). Para la reacción en gran escala, se usaron 100 μg de ADN a la misma concentración, manteniendo las condiciones de tiempo y temperatura idénticas a las de la reacción en pequeña escala.

Buffer de siembra

Sacarosa 38%

EDTA 67 mM

Azul de bromofenol 0,1%

2.12.2.4. Fraccionamiento por tamaño de la digestión parcial de ADN

Los fragmentos de ADN, que como producto de la digestión parcial se encuentran fuera del rango de tamaño requerido, deben eliminarse para evitar el clonado en tándem de insertos menores. Los métodos aplicables al fraccionamiento por tamaño son de dos tipos: ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y electroforesis preparativa en gel de agarosa. En el primer caso, se colectan fracciones y se conserva la de interés. En el segundo, se corta la región correspondiente del gel, y el ADN se recupera por alguno de varios métodos alternativos. En el presente trabajo, se ensayaron distintos procedimientos. Finalmente, el ADN digerido se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (1%) y se cortó la porción conteniendo los fragmentos del tamaño requerido; la misma fue definida por comparación con la migración del marcador de peso (λ HindIII). El ADN se extrajo tratando el trozo de gel con la enzima β -agarasa I (New England BioLabs, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.12.2.5. Clonado en fago λ . Titulación de fagos recombinantes

El vector de clonado usado fue LambdaGEM®-11 Genomic Cloning Vector (Promega), un derivado del λ EMBL3 (Frischauff *et al.*, 1983). Este sistema utiliza el método de selección de fagos recombinantes basado en la restricción de tamaño para el empaquetamiento. De acuerdo a la descripción dada por el fabricante, el vector ha sido digerido con *Bam*HI y defosforilado. Posteriormente se ha sometido a una segunda digestión con *Eco*RI, y los fragmentos *Bam*HI-*Eco*RI han sido eliminados para minimizar aún más la posibilidad de religación de los brazos con el fragmento *stuffer*.

Para determinar las condiciones óptimas de ligación se prepararon reacciones en pequeña escala en un volumen final de 10 μ l, con 3 U de ADN ligasa del fago T4, 200 ng del vector y cantidades variables del inserto genómico (3-1:1, relación molar inserto/vector). Las mismas se incubaron 5 h a temperatura ambiente.

Para cada reacción, 1 volumen de ligación se mezcló con 5 volúmenes de extracto de empaquetamiento. Las reacciones de empaquetamiento se incubaron 3 h a temperatura ambiente y luego se diluyeron en buffer de fago para la titulación de *pfu* (unidades formadoras de placa) en la cepa permisiva de *E. coli* LE392, provista

en el mismo *kit*. Cien microlitros de la reacción diluida se incubaron con igual volumen de una suspensión de bacterias, a 37°C, durante 30 min, para permitir la adsorción del fago a las bacterias. Luego, los 200 µl resultantes, se agregaron a 3 ml de *top* agarosa fundida, mantenida a 45°C, y la mezcla se vertió sobre una placa de agar LB, precalentada a la misma temperatura. Una vez solidificada la *top* agarosa, las placas de agar se incubaron a 37°C hasta que las placas de lisis alcanzaran un desarrollo visible pero no confluyente.

Para preparar la suspensión de bacterias usada en el paso anterior, se inocularon 3 ml de medio LB suplementado con maltosa 0,2% y MgSO₄ 10 mM con una colonia crecida previamente en agar LB. El cultivo se incubó a 37°C, con agitación, hasta alcanzar una DO₆₀₀= 0,6.

Buffer de fago

Tris-HCl 20 mM, pH 7,4
NaCl 100 mM
MgSO₄ 10 mM

Top agarosa

Triptona 1%
NaCl 0,5%
Agarosa 0,6%

2.13. Screening de la genoteca

Para la transferencia a membrana de las placas de lisis se siguió el procedimiento descrito por Ausubel *et al.*, (1994). Las placas de titulación se enfriaron 1 h en heladera y luego se transfirieron a filtros circulares de nylon cargado (Zeta-Probe® GT; Bio-Rad) del mismo diámetro. Los filtros se depositaron sobre la superficie de la *top* agarosa, dejando transferir 10 min, a temperatura ambiente. Luego, se dejaron secar y se sometieron a tres pasajes sucesivos de 2 min cada uno, por las siguientes soluciones: 1) NaOH 0,2 M, 2) Tris-HCl 0,4 M, pH 7,6/SSC 2X, 3) SSC 2X. Para evitar el lavado de la transferencia durante estos tratamientos, los filtros se depositaron invertidos sobre papeles absorbentes impregnados con dichas soluciones. Finalmente los filtros se sometieron a 80°C por 30 min. La hibridación con la sonda marcada y la autoradiografía, se realizaron como se describe en los apartados 2.10.4 y 2.10.5, respectivamente.

2.14. Preparación de lisado de fago

Las placas de fago individuales se levantaron del agar usando una punta de pipeta automática a la manera de un sacabocado. El taco de agar se expelió dentro de

un tubo de microcentrífuga conteniendo 100 µl de buffer de fago y se dejó una noche en heladera. Con 20 µl del fago eluido se infectaron bacterias (500 µl de suspensión) como se describió para la titulación de fago. El cultivo infectado se transfirió luego a un erlenmeyer conteniendo 100 ml de medio LB con MgSO₄ 10 mM, precalentado a 37°C. El cultivo se incubó a dicha temperatura, en un agitador orbital, a 150 rpm, durante 5 h. Luego se le agregaron 500 µl de cloroformo y se agitó 15 min adicionales. Finalmente se centrifugó 10 min a 8.000 ×g, y el sobrenadante se conservó en heladera.

2.15. Purificación de ADN de fagos recombinantes

El lisado obtenido en el paso anterior se incubó 30 min a 37°C con ARNasa y ADNasa, cada enzima a una concentración final de 1 µg/ml. Luego se agregaron 5,8 g de NaCl y 9,3 g de PEG 8.000, agitando hasta lograr su disolución completa. Se incubó en hielo 1 h y se centrifugó 20 min a 10.000 ×g, a 4°C. El *pellet* de fagos se resuspendió en 10 ml de buffer de fago y se centrifugó nuevamente por 2 min. El sobrenadante se llevó a concentraciones finales de SDS y EDTA de 0,1% y 5 mM, respectivamente, y se incubó 15 min a 68°C. Posteriormente se extrajo sucesivamente con fenol/cloroformo (1:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con un volumen de isopropanol, se lavó con etanol 70%, se resuspendió en buffer TE, y se conservó a -20°C.

2.16. Análisis de secuencias

Las secuencias de ADN se editaron con los programas Sequencing Analysis y SeqEd 675 DNA Sequence Editor (Applied Biosystems). Para su comparación con las bases de datos del GenBank, se utilizó la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; Altschul *et al.*, 1990), mantenida por el National Institute of Health, accediendo a través de Internet.

Los programas utilizados para los distintos cómputos y análisis predictivos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, se detallan para cada caso, en la sección **Resultados**.

El alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas se realizó con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), mantenido por el European

MATERIALES Y METODOS

Bioinformatics Institute. Para los cálculos de identidades se utilizó el programa GeneDoc v 2.5 (Nicholas y Nicholas, 1997). En el análisis de agrupamiento se empleó el paquete PHYLIP v3.5C (Felsenstein, 1993); el árbol de distancia se construyó con el método *Neighbor-Joining*, en base a la matriz de distancia obtenida con el programa PROTDIST (usando la matriz PAM001).

RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo comprenden el desarrollo de un sistema de experimentación aplicable al estudio del mecanismo de acción patogénica de *B. bassiana* sobre un insecto hospedante, con el objetivo de identificar genes que se expresan al inicio del proceso infeccioso. Para simplificar el análisis se trabajó sobre un modelo *in vitro*, excluyendo la presencia del hospedante. Dicho modelo consistió en el cultivo del hongo con sustratos alternativos, atendiendo al carácter diferencial de los transcritos expresados en el caso de su crecimiento a expensas de la cutícula del insecto. Este criterio se adoptó en base en el conocimiento previo de que la infección está sometida a regulación, por control nutricional del crecimiento del hongo. Se aplicó entonces, la técnica de *differential display*, adaptada en este caso, al uso de marcación fluorescente para analizar los patrones de amplificación en un sistema de detección automática. Operativamente, este sistema resultó ventajoso en cuanto a la cantidad y precisión de los datos que se obtuvieron. Los pasos siguientes, consistieron en analizar cada fragmento aislado, para finalmente proceder a la búsqueda del gen respectivo a uno de ellos, en una genoteca, cuya construcción fue parte del trabajo realizado. En el clon genómico se descubrió la presencia de un segundo gen que correspondió al criterio de búsqueda original.

3.1. Cultivos diferenciales

Con el procedimiento utilizado para la obtención de la cutícula de *D. saccharalis*, descrito en la sección **Materiales y Métodos**, se alcanzó un rendimiento promedio de 1,1 mg/larva. Este material se obtuvo en cantidad suficiente para la formulación del medio de cultivo procesando larvas del último estadio de desarrollo (L5), después de un período de cría de 17 días, a partir de la eclosión de los huevos. La **Figura 5 (B)** muestra el producto final del tratamiento de una larva de *D. saccharalis*, antes de ser molido para su incorporación al medio de cultivo; el mismo consiste básicamente en el complejo de unión covalente quitina-proteína (Smith *et al.*, 1981).

El crecimiento de *B. bassiana* en el medio mínimo adicionado con 1% de cutícula molida como fuente de carbono y nitrógeno (medio CUT), fue comparable al obtenido en el medio con glucosa y nitrato (medio con nutrientes solubles, NS). En este último caso el rendimiento de biomasa fue de 2,5 mg/ml (peso seco), mientras que en presencia de cutícula, el mismo no pudo ser cuantificado debido a la presencia del material insoluble sin degradar presente en el medio. En ambos casos, se observó al microscopio la presencia de micelio y de las formas unicelulares libres llamadas blastosporas, que son producidas por el hongo cuando se lo cultiva en medios líquidos.

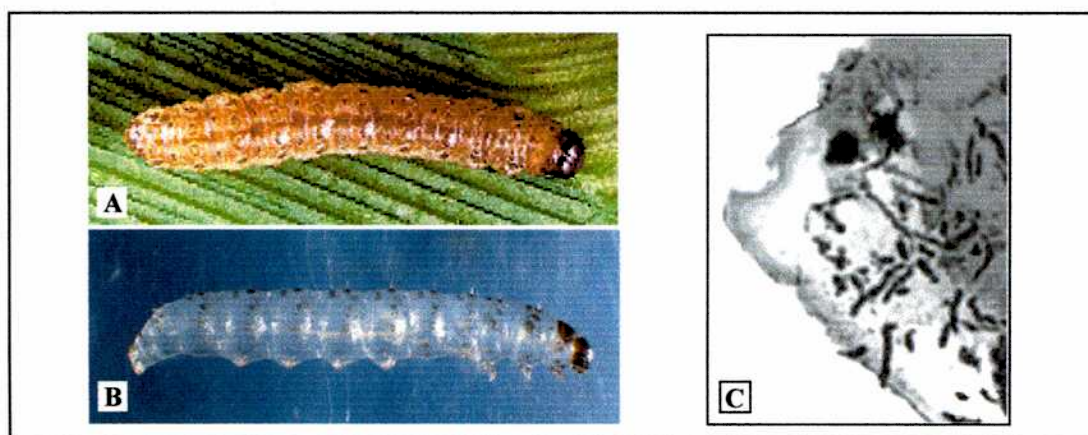


Figura 5.

(A) Larva de quinto estadio de *D. saccharalis* (2x).

(B) Aspecto de la larva después de ser hervida en SDS 1% durante 4 h. El material residual de dicho tratamiento conserva la forma original de la larva.

(C) Crecimiento de *B. bassiana* sobre una partícula de B molido, e incorporado al medio de cultivo mínimo (600x).

3.2. *Differential display*

En el sistema en estudio, en el que se excluyó la presencia de ARN del hospedante, la técnica de *Differential display* pudo aplicarse directamente para la comparación de los productos de RT-PCR derivados de los ARNm del hongo, crecido en los dos medios de cultivo.

La detección de transcritos diferenciales mediante esta técnica presupone el *screening* sistemático de *primers* arbitrarios en combinación con un oligo-dT, para el relevamiento de las muestras sometidas a análisis comparativo. Para acelerar la

búsqueda de *primers* informativos se desarrolló una metodología de PCR con incorporación de dUTPs fluorescentes ([F]dUTPs) en los productos de amplificación del ADNc, la cual no había sido descrita previamente para esta aplicación. Con esta marcación, los productos de reacción resultaron aptos para ser resueltos y analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida, en un secuenciador automático. Mediante el procesamiento automático de los patrones electroforéticos se obtuvieron valores de peso molecular y de intensidad de señal para cada banda, en referencia a un marcador de peso molecular interno, sembrado en cada calle del gel.

De acuerdo con la pequeña cantidad de producto requerida para el análisis automatizado, el volumen de reacción de PCR se estandarizó en 10 μ l, y el ciclado se llevó a cabo en tubos capilares, en un ciclador térmico a aire.

La reacción de amplificación del ADNc se optimizó con referencia a la cantidad y el nivel de amplificación de los fragmentos resultantes, hasta obtener patrones con resolución e intensidad de señal adecuados para el análisis en este sistema. En la **Figura 6** se muestra la variación en el registro obtenido a partir de distintas concentraciones de reactivos en la reacción de PCR.

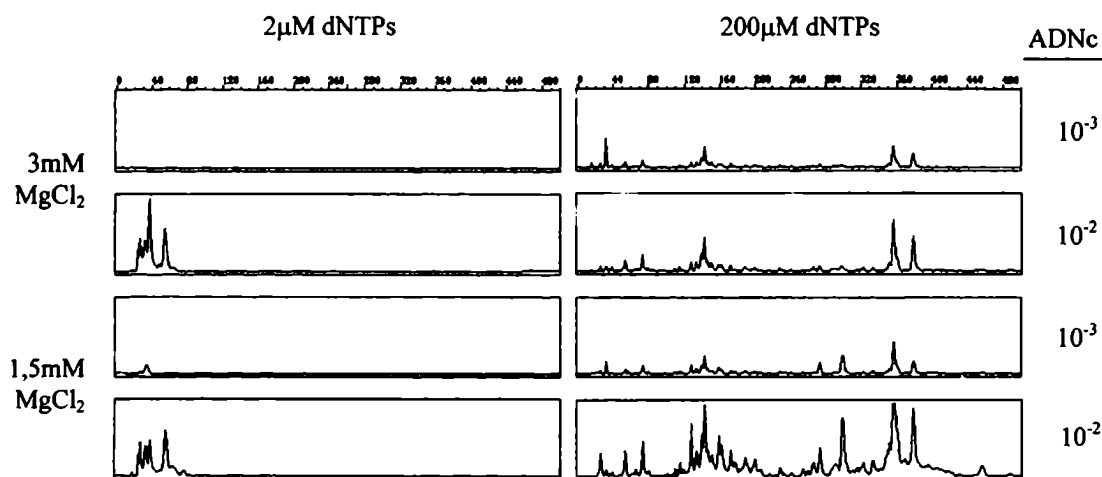


Figura 6. Fluorogramas producidos por el programa GeneScan 672, de ocho reacciones de PCR realizadas con las concentraciones indicadas de reactivos. Los valores de ADNc indican la relación de volumen de molde (reacción de RT) con respecto al de la PCR. Los picos en cada panel representan las bandas de las calles de un gel de poliacrilamida. Como molde de PCR se usó ADNc de *B. bassiana* cultivado en medio NS. Los *primers* usados fueron el oligo-dT 5'-AAGCT₁₁A, y el decámero arbitrario 5'-GTGATCGCA. Los números en los paneles superiores indican peso molecular, en pb.

La baja concentración de dNTPs propuesta originalmente por los autores de la técnica de *Differential display* para evitar amplificaciones inespecíficas, resultó en la ausencia de señal detectable. Para aumentar el nivel de amplificación se requirió usar una concentración de dNTPs de 200 μ M.

Con el protocolo optimizado se logró obtener alta reproducibilidad en los patrones de amplificación obtenidos con una misma combinación de *primers*, al utilizar como molde preparaciones independientes de ADNc, a partir de una misma muestra de ARN (Figura 7).

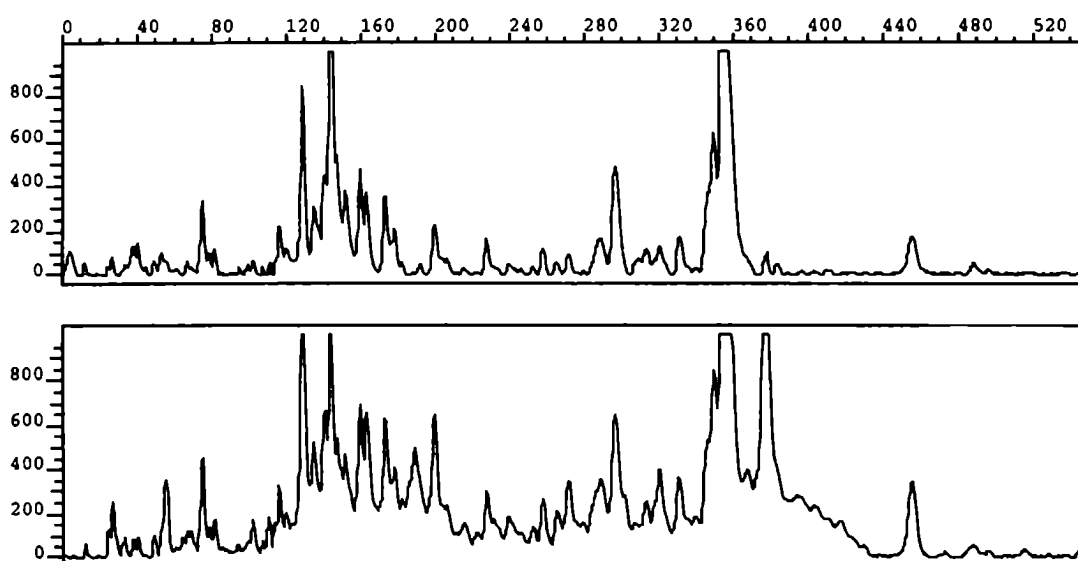


Figura 7. Fluorogramas de dos reacciones de RT-PCR independientes a partir de una misma muestra de ARN total de *B. bassiana*, cultivado en medio NS. Los números de la parte superior indican peso molecular, en pb. Los números de la izquierda, indican nivel de amplificación, en unidades arbitrarias. Los *primers* usados fueron los mismos que se indican en la Figura 6.

Una vez optimizado el protocolo, se procedió a la búsqueda de *primers* que generaran fragmentos de amplificación diferenciales, presentes sólo en la condición de cultivo en cutícula. Se ensayaron 51 *primers* arbitrarios en combinación con el oligo-dT con una base A de anclaje, 3' terminal: 5'-AAGCT₁₁A (HTA; Liang *et al.*, 1994).

3.3. Recuperación y análisis de fragmentos diferenciales

La presencia de bandas de amplificación diferencial se detectó con el sistema automático, y posteriormente, las reacciones respectivas se corrieron por segunda vez en un gel de poliacrilamida convencional, que se reveló por tinción con nitrato de plata. Las bandas fueron escindidas del gel, reamplificadas, y clonadas como se describe en la sección **Materiales y Métodos**. Los fragmentos se secuenciaron y se utilizaron como sondas en ensayos de *northern* y *southern*. La técnica de *northern* se usó para confirmar la naturaleza diferencial de la expresión de los ARNm correspondientes a los fragmentos. El análisis de *southern* se realizó para inferir la cantidad de copias en el genoma, de los genes correspondientes a cada fragmento.

De ocho fragmentos secuenciados, todos, resultaron ser producto de la amplificación combinada del oligo-dT con el decámero respectivo. Esto implica que con el protocolo adoptado, se limitó la amplificación de fragmentos generada por el decámero solamente; dichos fragmentos son revelados indistintamente como parte del patrón de bandas, cuando la marca se incorpora homogéneamente, a diferencia de lo que ocurre cuando se usa un oligo-dT marcado.

Un inconveniente que suele presentarse frecuentemente con esta técnica, se evidenció al secuenciarse tres clones de cada fragmento; en dos casos se observó que el fragmento clonado representaba al menos dos secuencias distintas, como resultado de la amplificación de bandas diferentes del mismo tamaño.

Las secuencias de los fragmentos se compararon con las bases de datos del GenBank siguiendo distintas estrategias de búsqueda de homología con la herramienta BLAST. La búsqueda de homologías en esta instancia no arrojó resultados significativos excepto para un fragmento (descartado como falso positivo en el ensayo de *northern*) correspondiente al ARNm de la fenilalanil-ARNt sintetasa.

Para las dos muestras de ARN, los valores de intensidad de la señal de hibridación obtenida en los experimentos de *northern*, usando cada fragmento como sonda, se normalizaron en base a la cantidad de ARN ribosomal de cada muestra. Para ello, las membranas se rehibridaron con una sonda del gen del ARN de la subunidad ribosomal menor de *B. bassiana* (**Figura 8**). Dicha sonda, de aproximadamente 1 kpb, se obtuvo por PCR con *primers* que se diseñaron en base a regiones de secuencia conservada de este gen (Dams *et al.*, 1988). El fragmento

amplificado se secuenció parcialmente y se confirmó que correspondiera al producto esperado.

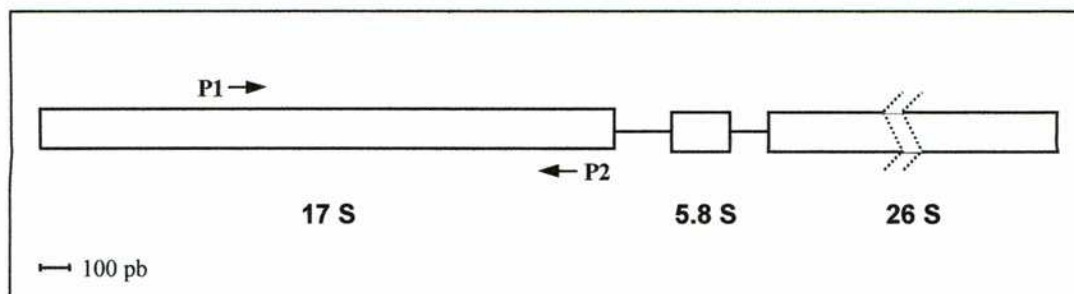


Figura 8. Esquema de la organización de los genes ribosomales eucarióticos. Los valores *S* corresponden a genes fúngicos. Las flechas indican la ubicación de los *primers* (P1 y P2) utilizados para la amplificación de la sonda ribosomal. P1: 5'-CAGCAGCCGCGGTAA; P2: 5'-ACGGGCGGTGTGTAC.

Para estimar experimentalmente los tamaños de los ARN ribosomales de *B. bassiana*, se usó un marcador de peso molecular de ARN (*RNA marker* G319, Promega). Se determinó un valor aproximado de 1800 b para el de la subunidad menor (17 S) y de 2900 b para el de la subunidad mayor (26 S) (**Figura 9**). Dichos valores se usaron en los experimentos de *northern* como marcadores internos.

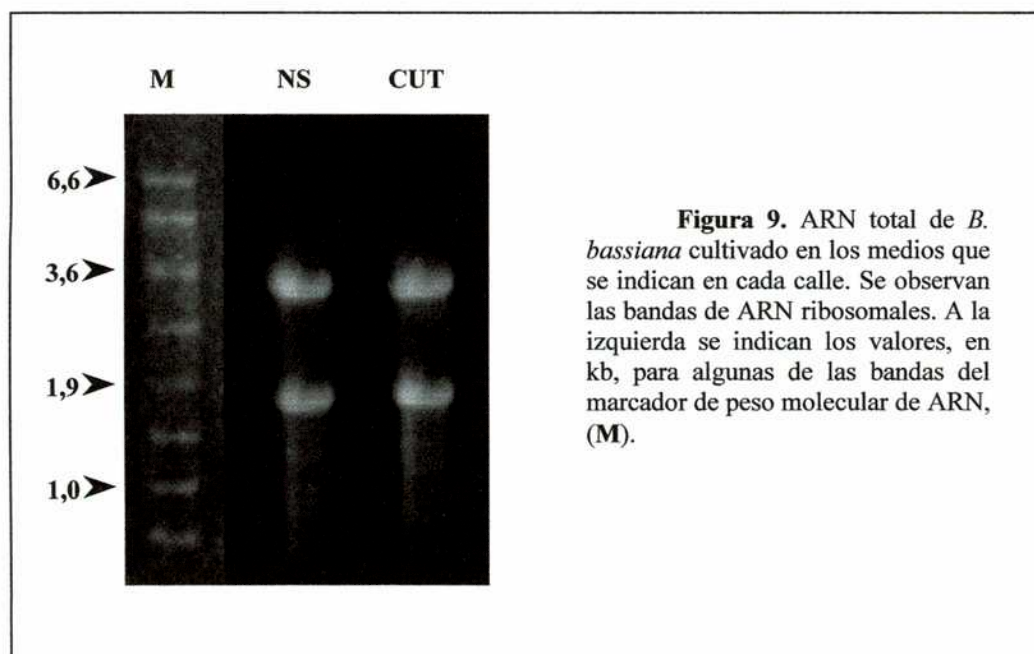


Figura 9. ARN total de *B. bassiana* cultivado en los medios que se indican en cada calle. Se observan las bandas de ARN ribosomales. A la izquierda se indican los valores, en kb, para algunas de las bandas del marcador de peso molecular de ARN, (M).

RESULTADOS

Algunos fragmentos resultaron falsos positivos en los ensayos de *northern*, es decir, pertenecientes a ARNm con el mismo nivel de expresión en ambas condiciones de cultivo.

Un fragmento de 244 pb, obtenido por amplificación con el decámero OPO2, escindido de la calle del gel que se muestra en la **Figura 10**, dio como resultado un patrón de *northern* diferencial (**Figura 11.A**). En el *southern* genómico ensayado con dos enzimas de restricción se obtuvo una sola banda, en cada caso (**Figura 11.B**). Este fragmento se usó entonces, para el *screening* de una genoteca.

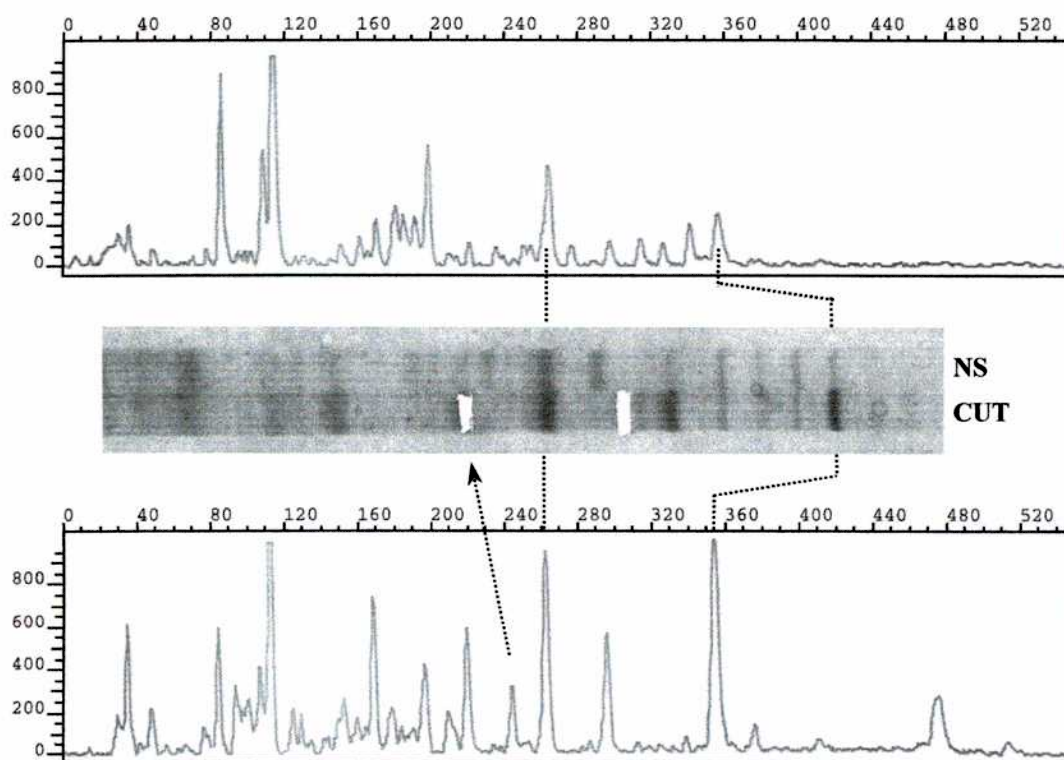


Figura 10. *Differential display* con los primers HTA y OPO2 (5'-ACGTAGCGTC), para las muestras que se indican. Centro: calles del gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata. Se muestra la correspondencia entre algunas bandas del gel y los picos respectivos, en los fluorogramas de cada reacción. La flecha señala la escisión del gel, del fragmento diferencial de 244 pb. Para cada panel, los números de la parte superior indican peso molecular, en pb. Los números de la izquierda, indican nivel de amplificación, en unidades arbitrarias.

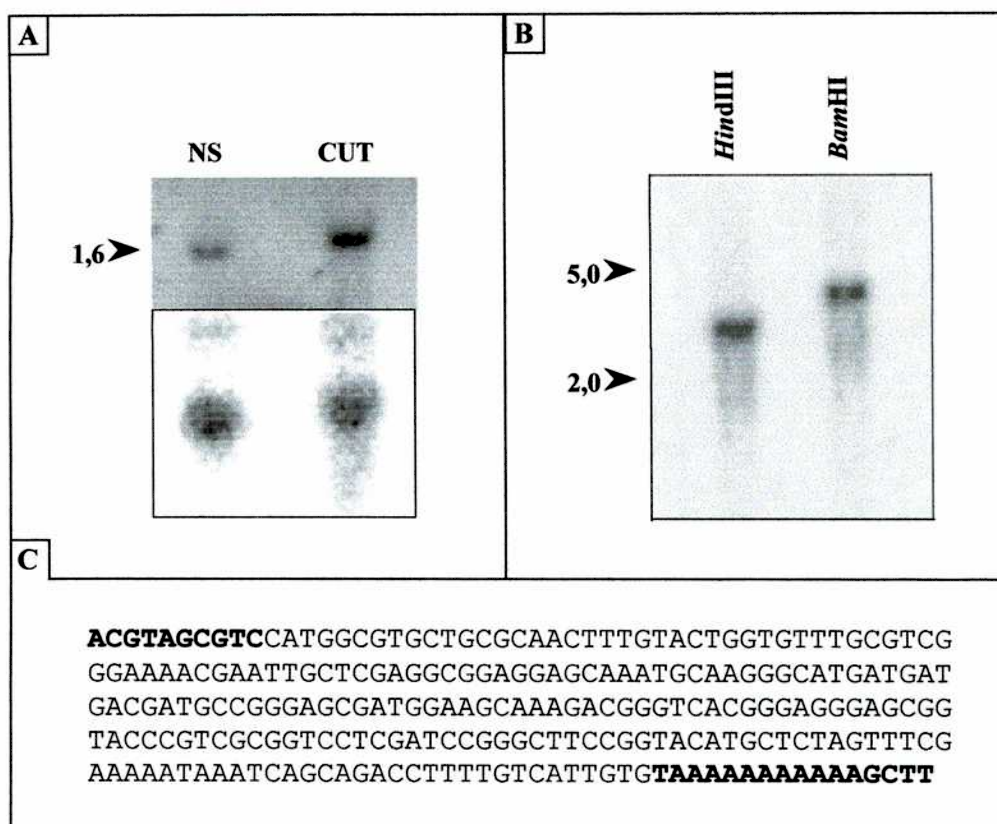


Figura 11. Análisis del fragmento diferencial obtenido con el *primer* OPO2. (A) Arriba: *northern* de los cultivos diferenciales hibridado con el fragmento. La relación de intensidad de señal para CUT/NS es de 4/1. Abajo: hibridado con la sonda ribosomal. (B) *Southern* con ADN genómico digerido con las enzimas que se indican. Los tamaños de banda se señalan en kb. (C) Secuencia del fragmento. Los primers aparecen en negra.

3.4. Construcción de una genoteca de *B. bassiana*

Como primer paso para la construcción de una genoteca de *B. bassiana* en un vector λ de sustitución, se desarrolló una metodología para la purificación de ADN de alto peso molecular. Para ello, se puso a punto la preparación de protoplastos a partir de conidios germinados durante una noche en cultivo líquido, con medio completo, en una adaptación de la técnica utilizada por Pfeifer y Khachatourians (1987) para la digestión de la pared celular de blastosporas. De esta forma se evitó la utilización de medios mecánicos de ruptura de la pared celular, los cuales producen fragmentación del ADN.

Después de los pretratamientos descritos en la sección **Materiales y Métodos**, la digestión de la pared de las células de *B. bassiana* se logró con 4 h de incubación en presencia de una preparación comercial de enzimas líticas del hongo *Trichoderma harzianum* (con actividad proteasa, celulasa y quitinasa) y de β -glucuronidasa. Con dicho tratamiento, las células adquirieron forma esférica y manifestaron sensibilidad al SDS, a una concentración de 0.1%. Los protoplastos resultaron una fuente de material apropiado para extraer ADN de peso molecular mayor que el del obtenido convencionalmente a partir de micelio molido en frío (**Figura 12**).

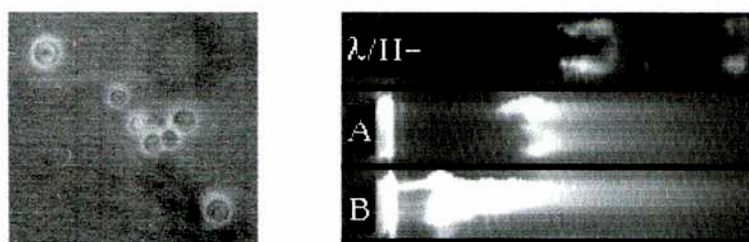


Figura 12. Izquierda: Células de *B. bassiana* en estado avanzado de protoplastización. Derecha: Movilidad electroforética del ADN genómico obtenido a partir de micelio molido con N_2 líquido (A), y de protoplastos tratados con SDS y proteinasas K (B). λ/H : marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa 0.4%.

Para el clonado en el vector digerido con *Bam*HI en las posiciones MCS (sitio de clonado múltiple) que se indican en la **Figura 13**, el ADN genómico se digirió parcialmente con *Sau*3AI, enzima que deja extremos cohesivos compatibles con los de *Bam*HI.

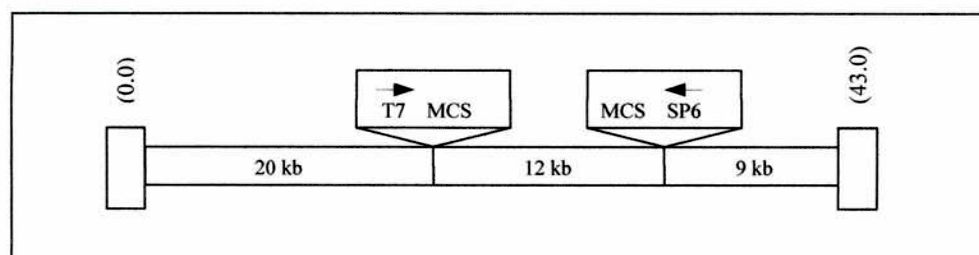


Figura 13. Representación esquemática del vector derivado de λ EMBL3.

La digestión del ADN genómico se llevó a un grado tal que el tamaño de la clase más abundante de productos parciales igualara la capacidad del vector. Utilizando concentraciones variables de enzima, por el término de 30 min de reacción, se determinó la cantidad de enzima óptima para la producción de fragmentos en el rango de 9-23 kpb (**Figura 14**).

Posteriormente, el producto de la digestión parcial, se fraccionó por electroforesis preparativa en gel de agarosa de bajo punto de fusión (1%), y el ADN se recuperó por digestión de la matriz del gel con la enzima β -agarasa. Usando esta preparación de ADN se determinó la relación óptima inserto-vector en la reacción de ligación. Para ello se comparó el título de fagos logrado con tres cantidades de inserto (80, 150 y 220 ng) frente a una cantidad fija de vector (200 ng). Se obtuvieron títulos relativos de 2,4: 1,6: 1, respectivamente. En consecuencia, para la ligación en mayor escala, se utilizó la primera relación. El resultado del empaquetamiento de esta última, consistió en una genoteca de aproximadamente 5.10^4 clones, cantidad en exceso para la representación por triplicado del genoma de *B. bassiana*, calculada en base a la capacidad del vector.

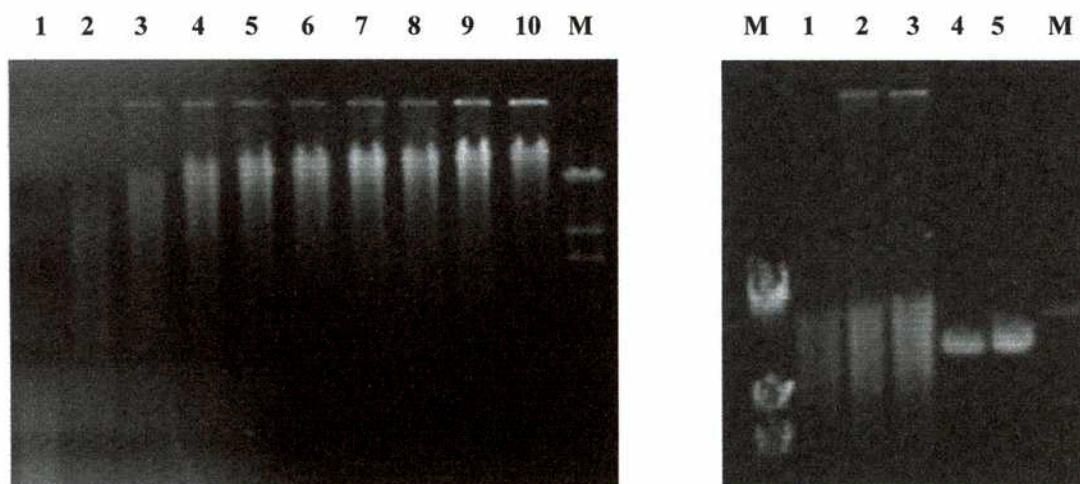


Figura 14. Izquierda: Productos de la digestión parcial de ADN genómico con concentraciones decrecientes de la enzima *Sau3AI* (calles 1-9). Calle 10: ADN sin digerir. La calle 4 corresponde a la cantidad de enzima óptima que rindió la mayor proporción de fragmentos en el rango de tamaño requerido para ser clonados en fago λ (0,06 U/ μ g ADN) en un volumen de 50 μ l. M: marcador de peso molecular λ digerido con *HindIII*. Derecha (calles 1-3): cantidades crecientes de ADN fraccionado por tamaño en gel de agarosa (9-23 kpb). Calles 4-5: cantidades crecientes de inserto control (16 kpb) del sistema de clonado LambdaGEM®-11 (Promega).

3.5. *Screening* de la genoteca y análisis de restricción de fagos recombinantes

Para el *screening* de la genoteca se plaquearon 10.000 *pfu* en una placa de Petri de 14 cm de diámetro con medio LB y *top* agarosa. Se detectó señal de hibridación con la sonda marcada para seis clones. Los clones aislados se sometieron a una segunda ronda de selección (**Figura 15**).

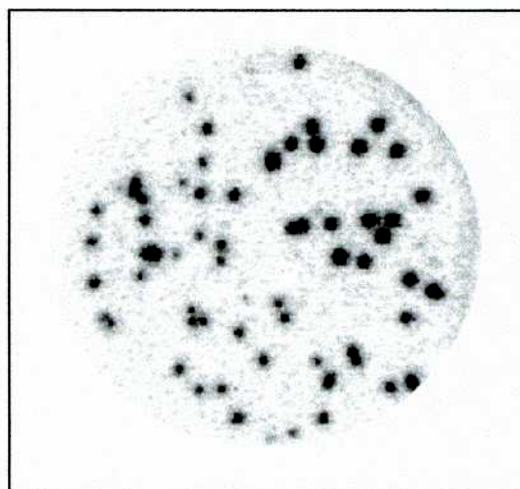


Figura 15. *Screening* secundario del clon $\lambda 1$.

El ADN de los clones se analizó por mapeo de restricción con *Bam*HI (sitio de clonado) y *Xho*I (sitios adyacentes al anterior, en ambos brazos del vector). En la **Figura 16** se observa el resultado obtenido para los clones $\lambda 1$ y $\lambda 2$. En estos clones, dichas enzimas reconocieron sitios internos en los insertos genómicos, dando patrones de bandas similares en ambos clones. En el experimento de *southern* se observó señal de hibridación de la sonda marcada con dos bandas comunes a ambos clones: una banda *Bam*HI de 4,7 kpb, y una banda *Xho*I de 1 kpb.

Mediante el análisis de los mapas de restricción del clon $\lambda 1$, utilizando estas enzimas separadamente y en conjunto, se estimó el tamaño del inserto total en 16 kpb, aproximadamente. Para ello, se analizaron los resultados de varias electroforesis, realizadas en geles de distintas concentraciones de agarosa. De esta forma, en cada gel, se pudieron resolver fragmentos de tamaños similares, dentro del espectro de tamaños para el cual la concentración de agarosa utilizada permitía mayor resolución.

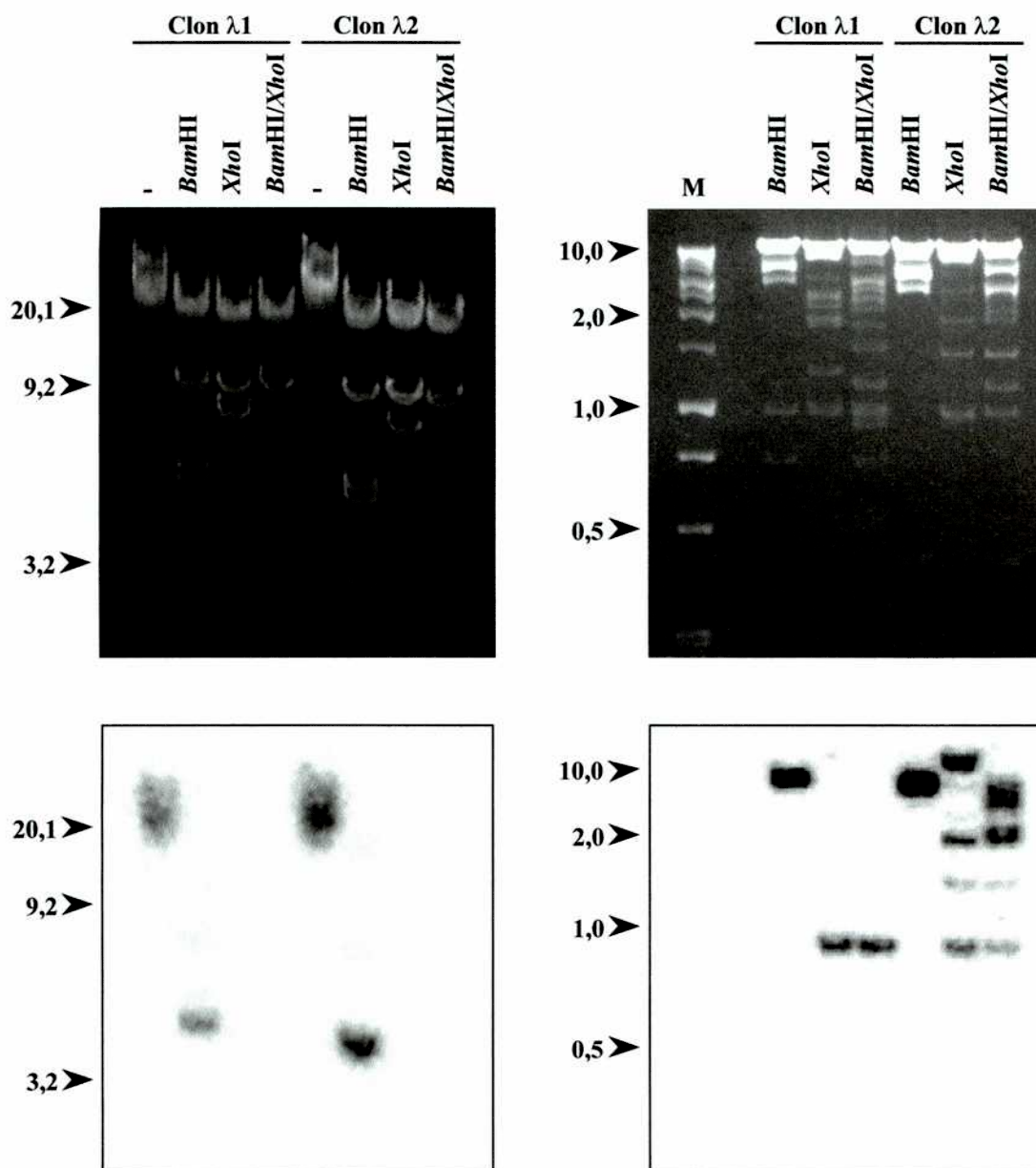


Figura 16. Análisis de restricción de dos clones ($\lambda 1$ y $\lambda 2$), que resultaron positivos en el *screening* de la genoteca con la sonda diferencial. En los paneles superiores se muestran los geles de agarosa corridos con los productos de las digestiones con las enzimas indicadas. Izquierda: agarosa 0,8%. Las dos bandas de mayor peso molecular en las calles de los tratamientos con enzimas, corresponden a los brazos del vector. Derecha: agarosa 2%. En los paneles inferiores se muestran las autoradiografías obtenidas por hibridación con la misma sonda. (M) Marcador de peso molecular. (➤) Tamaños de las bandas en kpb.

Dado que el resultado del *southern* de la digestión doble no varió respecto del de la digestión simple con *XhoI*, se dedujo que el fragmento *XhoI* de 1 kpb (fragmento **X**) estaba contenido íntegramente en el fragmento *BamHI* de 4,7 kpb (fragmento **B**). Por lo tanto, se procedió a clonar ambos fragmentos, ante la posibilidad de abarcar con el mayor de ellos, una extensión de secuencia suficiente para contener la región codificante completa correspondiente a la sonda. Para el clonado se utilizó el vector plasmídico pcDNAII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), obteniéndose los clones **pX** y **pB**. Los extremos de los mismos se secuenciaron usando los primers SP6 y T7. La **Figura 17** muestra el detalle del mapa de esta región, y de los clonados correspondientes.

En un extremo del fragmento **X** se ubicaron 164 bases del extremo de la sonda correspondiente al *primer* oligo-dT (la fracción restante corresponde a un fragmento *XhoI* de 461 pb, contiguo al **X**, que no se alcanza a observar en el *southern* de la **Figura 16**). En principio, dado que se esperaba que la sonda correspondiera al extremo 3' terminal de un ARNm, la secuenciación podría haberse orientado en una sola dirección. Sin embargo, en esta instancia, no se podía descartar la posibilidad de que la sonda hubiera sido generada por *annealing* inespecífico del *primer* oligo-dT, es decir en un lugar distinto de la cola de poli A. La secuenciación se continuó entonces, en ambas direcciones relativas a este segmento. El esquema de la secuenciación de toda la región, se presenta en la **Figura 18**. En primer lugar, se completó la secuencia del clon **pX** por subclonado de dos fragmentos internos contiguos definidos por un sitio de corte para *KpnI* y dos sitios para *HincII*, en ese orden (subclones **pX1** y **pX2**). Luego, para avanzar con la secuenciación en la dirección opuesta, se dedujo la orientación del fragmento **X** dentro del clon **pB**, para lo cual se siguió la siguiente estrategia: después de comprobar que el sitio *KpnI* mencionado era el único para esta enzima en el clon **pB**, se obtuvieron los dos subclones *BamHI-KpnI* del clon **pB** y se analizaron sus patrones de restricción con *KpnI* y *XhoI*. Como se observa en la **Figura 18**, el subclon **pB1** se solapa con el clon **pX** en la dirección buscada. La secuenciación del clon **pB1** a partir de dicho extremo solapado, permitió detectar el resto de la sonda y también la continuidad de un ORF de 42 aminoácidos (identificado previamente en la sonda).

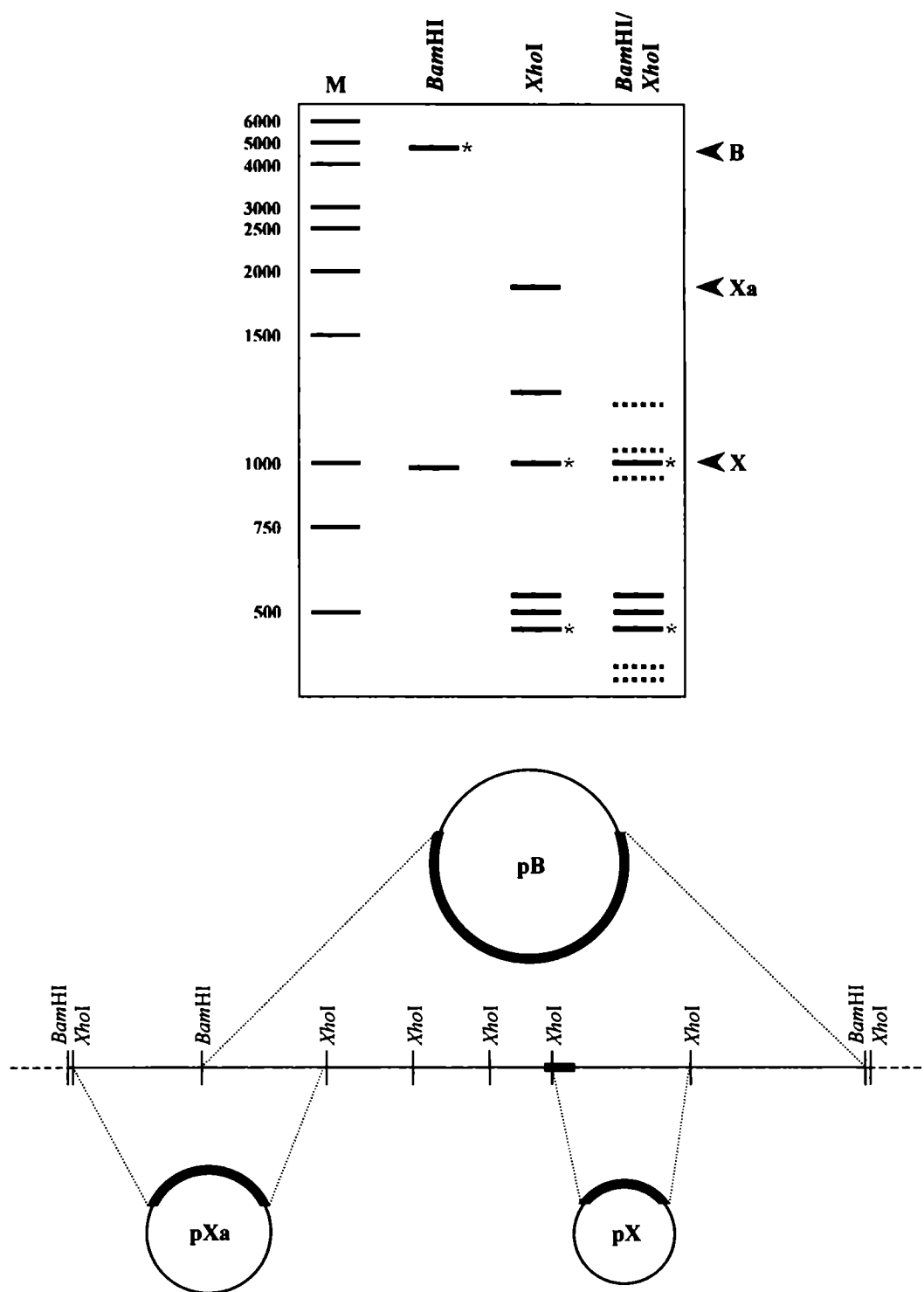


Figura 17. Representación esquemática del mapeo de restricción y de los clones plasmídicos obtenidos de la región de aproximadamente 5,6 kpb del clon $\lambda 1$, conteniendo la sonda diferencial. (—) Fragmentos de restricción obtenidos por el corte de una misma enzima en ambos extremos. (.....) Fragmentos obtenidos por digestión doble. (—*) Fragmentos revelados por la sonda. (—) Bandas del marcador de peso molecular M. (B) Fragmento *Bam*HI de aproximadamente 4,7 kpb clonado en el plásmido pB. (X) Fragmento *Xho*I de 996 pb clonado en el plásmido pX. (Xa) Fragmento *Xho*I de 1945 pb clonado en el plásmido pXa. (■) Sonda diferencial.

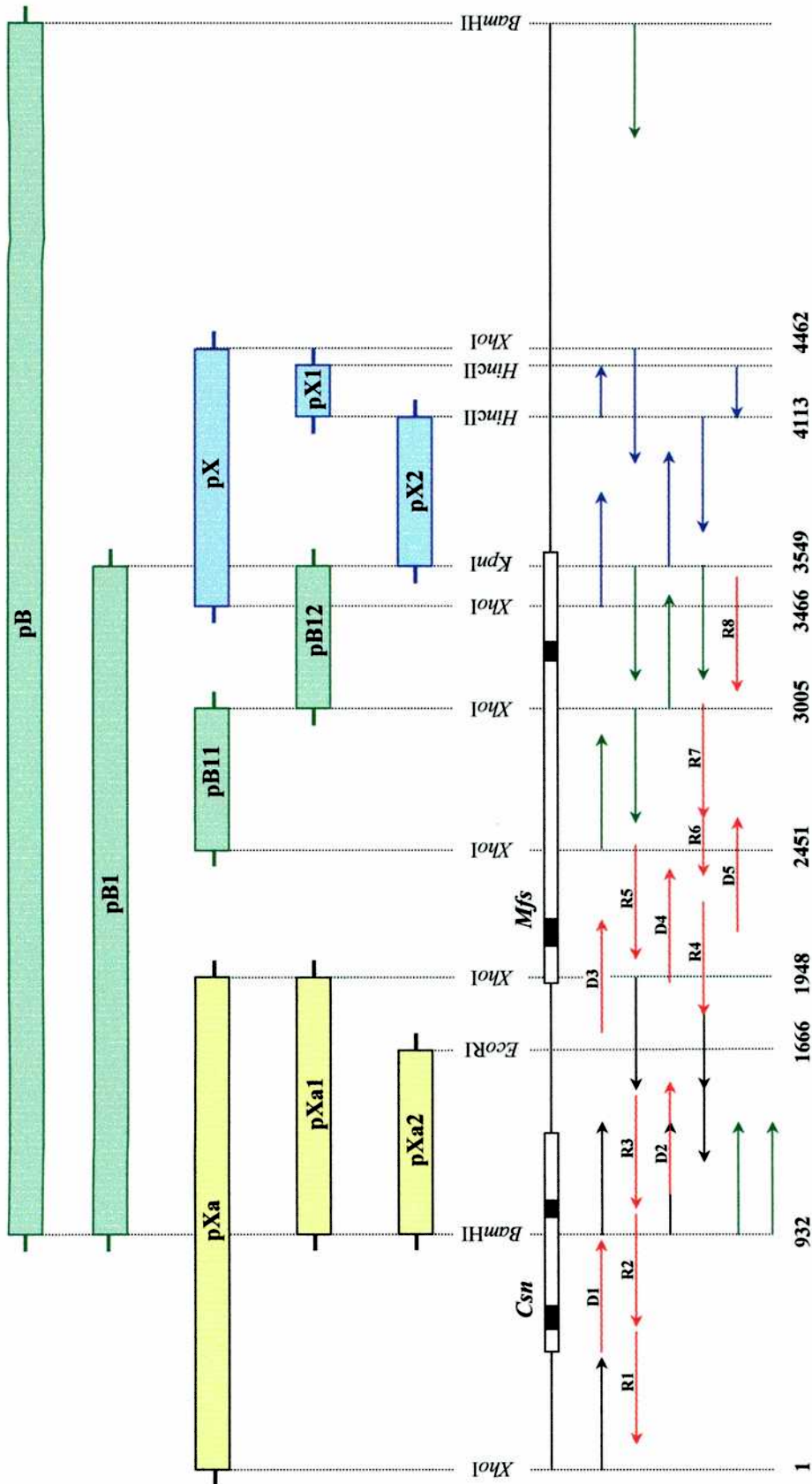


Figura 18. Secuenciación de los clones pB, pXa, pX, pXa1, pXa2, pB11, pB12, pX1, pX2. Muestra fragmentos de clones subclonados a partir de los mismos. Cada familia de clones se identifica con un mismo color. Las flechas rojas representan secuencias obtenidas a partir de primers directos (D1-D5), y reversos (R1-R8), diseñados sobre regiones internas. Las secuencias restantes se obtuvieron con los primers del vector (SP6 y T7). Se muestra la ubicación de los genes *Csn* y *Mfs*; en blanco se indican las regiones codificantes, y en negro, los intrones.

Este resultado sugirió la posibilidad de estar en presencia de la región carboxilo terminal de una proteína, sin homología detectable en las bases de datos para la extensión de secuencia obtenida hasta ese momento, de aproximadamente 100 aminoácidos. Al secuenciarse nuevos subclones del **pB1**, se detectó homología de dicha proteína con una clase de proteínas transportadoras de membrana denominadas en conjunto **Mfs** (*Major facilitator superfamily*), en la clasificación de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (Mewes *et al.*, 1997). Dicha clase incluye representantes con distintas especificidades de molécula transportada (y otros de especificidad desconocida), tanto en procariontas como en eucariotas.

Paralelamente, al secuenciarse los extremos del fragmento **B**, se identificó parte de un segundo ORF en la posición aguas arriba del gen *Mfs*. Dicho ORF presentó homología con cuatro secuencias fúngicas de las bases de datos de genes, correspondientes a la enzima quitosanasa (*Csn*). Este hallazgo resultó de interés en el contexto del presente estudio de expresión diferencial de *B. bassiana*, dada la probable participación de esta enzima en la degradación de la cutícula de los insectos, como un componente del complejo de enzimas quitinolíticas del hongo. Por lo tanto, dicho gen se incorporó al plan de secuenciación seguido hasta entonces.

Para obtener el gen *Csn* completo se clonó un fragmento *XhoI* de 1,9 kpb (**Xa**, ver **Figura 17**) a partir del clon λ 1. Los subclones obtenidos a partir del clon **pXa**, y los restantes obtenidos a partir del clon **pB**, se muestran en la **Figura 18**.

Se diseñaron *primers* para completar el secuenciamiento de doble cadena, y para corroborar el ordenamiento de todos los clones involucrados (**Tabla 3**). En total se secuenciaron 4465 pb, incluyendo 467 pb aguas arriba de la región codificante del gen *Csn*, 876 pb aguas abajo de la región codificante del gen *Mfs*, y la región intergénica. En los apartados siguientes, se detallan los estudios realizados sobre cada uno de estos genes en el orden en que aparecen en la región secuenciada, tal como se la presenta en la **Figura 18**.

Tabla 3. Primers utilizados en reacciones de secuenciación.

Primer	Secuencia (5'-3')	Posición^a
D1	CATGGAATACTTGGCACG	431
D2	CTTTCAGCATTATGGAGTCTGG	1066
D3	CTATTTACCAAGTTGGCTGGG	1715
D4	CCAACAATGGAAAACAGCGG	1921
D5	GATGCTGCTGCAGTTACC	2168
R1	CATAAAGGGACTTGAGTTTCGC	558
R2	CTTGGTCATTGCAAACAACCG	1003
R3	CTTCTCGAGGGCACCATGCATTACTCG	1475
R4	GTTGGGCAGCGCATTACG	2208
R5	AAAGCGCCGGGGAAAAGGGCG	2477
R6	CAGAGGGCCCCGTTCCCTCGTC	2802
R7	CTTTCCCCGAGTCTATCGC	3026
R8	CCCGTCTTTGCTTCCATCG	3532

^aExtremo 5' del *primer* en referencia a la numeración de secuencia de las Figuras 19 y 25.

3.6. Análisis del gen de la quitosanasa

El gen *Csn* codifica para una proteína de 232 aminoácidos, deducida a partir del marco de lectura abierto de 699 b, que se extiende entre el codón ATG (centrado en la posición 472, **Figura 19**) y el primer codón de terminación TAA. El marco de lectura se encuentra interrumpido por dos intrones, de 91 b y 67 b, respectivamente. Los intrones se definieron inicialmente, en base a la identificación de las secuencias consenso de *splicing* presentes en hongos filamentosos (Edelmann y Staben, 1994) (**Figura 20**), y por comparación a nivel de aminoácidos con las cuatro quitosanasas fúngicas del GenBank (ver **Tabla 4**). Posteriormente se confirmaron por RT-PCR del ARNm.

Otro codón ATG en tándem precede al referido en el párrafo anterior. El sitio de iniciación de la traducción se predijo analizando las secuencias flanqueantes de cada uno. Ambos conservan dos nucleótidos de la secuencia consenso observada en *Neurospora crassa* (CAMMATGGCT; Edelmann y Staben, 1994), pero para el ubicado aguas abajo, además se conserva una purina en la posición -3, lo que corresponde al consenso general de eucariotas.

El análisis de la secuencia aminoacídica *N*-terminal sugiere que el polipéptido incluye una preregión o péptido señal clivable, característico de

proteínas de secreción, que consiste en los primeros 18 aminoácidos. En el mismo se encuentra un residuo cargado positivamente (Arg²) en posición amino terminal (región *N*) a un bloque de 16 aminoácidos no cargados (región *H*), que incluye 8 aminoácidos hidrofóbicos, y un posible sitio de clivaje entre los aminoácidos 18 y 19. Dicha predicción se hizo utilizando el programa PSORTII (Nakai, 1998), el cual computa una probabilidad para la presencia de la secuencia señal, por el método de McGeoch (1985), y otra probabilidad para la secuencia consenso del sitio de clivaje, por el método de von Heijne (1986). En base a estos resultados, y ante la ausencia de otras señales detectables, se predijo la localización extracelular de la proteína madura.

Con la herramienta "Compute pI/Mw" (Bjellqvist *et al.*, 1993), mantenida por el Swiss Institute of Bioinformatics, se calcularon un peso molecular de 22.783 Da, y un punto isoeléctrico de 4,6, para la proteína madura.

La enzima tiene dos sitios potenciales de *N*-glicosilación (Asn⁶⁴-Gly-Thr y Asn⁷⁸-Arg-Ser) que siguen la regla general Asn-X-Thr/Ser. Un tercer sitio (Asn¹⁹⁸-Asp-Thr) es menos probable, ya que según la regla, X es cualquier residuo excepto prolina, y tal vez, aspártico (Hubbard e Ivatt, 1981).

El uso de codones muestra un sesgo, como ocurre en muchos organismos. La descripción más simple de este sesgo, es que los codones terminados en C son preferidos por sobre todos los demás. Esto se observa en la mayoría de las familias de codones (sólo en 4 familias la terminación en T aparece más representada). En los casos en que la terminación en C no existe para la codificación, la preferencia es por G. De todos los codones 45% terminan en C, 28% en T, 20% en G y 7% en A.

En la extensión de secuencia obtenida correspondiente a la región promotora del gen (470 pb aguas arriba del ATG), se identificaron elementos de control transcripcional presentes en muchos genes fúngicos. Los que corresponden a motivos de un promotor típico son una secuencia TATAAA en la posición -84 a partir del codón de iniciación, una región rica en pirimidinas (CT), entre -43 y -50, y una secuencia CCAAT que se inicia a -222. Se cree que estos elementos son necesarios para la expresión basal en muchos casos, aunque no todos (Gurr *et al.*, 1987). También se observan dos motivos 5' GATA, que es la secuencia consenso reconocida por los activadores transcripcionales de genes sometidos a represión metabólica por nitrógeno, AREA (*Aspergillus nidulans*; Kudla *et al.*, 1990) y NIT2 (*N. crassa*; Fu y Marzluf, 1990). Las mismas se encuentran en las posiciones -161 y

RESULTADOS

CTCGAGAAGCCTTGTAGTGCACACAATGCATGGAATAGAGATGGGTTTAAAGTTGTGATTGCGGCCCGT	69
GCTTGGTCTATTTTCCTACTAAACATAAAACATGTAGTGCTTCATAGACTGAGGCCCGCTGAGAGGAGC	138
GATCAGGAGATTGGCCTAGCTTGTCTAACCATGGACATGTGGCTATGTAATGTACTGTAATTAATTT	207
GTACAATACTATGCCAAACATGGAAAGCTCATTGCTTTCCACCCAATCTCCCTCCGTCATTTCACTTGGT	276
GTACGTATCACAAGTGGATTTGATCGCCAGAGGATACGTACTCTACAGCCAGAAGCATAAATGCAGTT	345
GCATCGAGTATATATGAAACTGGGAAGCAGGCTGCAGAGACTATAAAAGGACGTTTCGTCGTACAGTC	414
TCCAAGCCTCTCTCGACATGGAATACTTGGCACGGTTTCCTCACCCAAACTTCATGATGCGATCTTCTG	483
	<u>M R S S</u> 4
CTGCCTCACACTCACCACGCTTAGCTCCATTGCTGTAGCTATGAGCTCCCCGCGAAACTCAAGTCCC	552
<u>A V L T L T T L S S I A C S Y E L P A K L K S</u>	27
TTTATGACAAACACCAGgtaaggcaaagcttaaaaagaagaaaaagaagaaaaaacaga	621
L Y D K H Q	33
gctcgtgggaaataaacgctcacacaacgttgcaagcagTCTGGGCCTTGCTCAAACAAGCTGTCCGGC	690
	S G P C S N K L S G 43
ACCTTTAAAGGCGCGCTTCTTACTGCGGCGACATCCCAATGCCATCTTCTCAAGGGCAATGGCACC	759
T F K G G A S Y C G D I P N A I F L K G N G T	66
TACGACAACATGGATATTGACTGCGACGGTGTCAACAGAAGCGCGGGTGCTTGCGCCAACGACCAGACT	828
Y D N M D I D C D G V N R S A G A C A N D Q T	89
GGCCAGGACCAGACGGCTTTCATGGACACGGTCAAGACCTATGGTATTCCAGATCTTGACCCAATGTC	897
G Q D Q T A F M D T V K T Y G I P D L D A N V	112
CATCCCTATGTCGCTTTTGGTAACGCCGAGGCGGATCCGCTCTTTTGTCCCCAAGACCATGGCATTGAG	966
H P Y V V F G N A E A D P S F V P Q D H G I E	135
CCTCTTCCGTAATGGCGGTTGTTTGAATGACCAAGTgtaagtaaccccttccctttcaacgtcatg	1035
P L S V M A V V C N D Q V	148
ttgtgttgattcttgattaacagaaactttctttcagCATTATGGAGTCTGGGGCGACGTCAACGGCGG	1104
	H Y G V W G D V N G G 159
TGTTCTACCGCGAAGCTTCTCTGTCCATGGCCAAGTTGTGCTTCCCGATGAGCCTCTTTCGGGTGA	1173
V L T G E A S L S M A K L C F P D E P L S G D	182
CAATGGCCACGACGCCAAGGACGTCATGTACATTGCATTACGGGTAATGATACCGTCCCTGGGAAAGA	1242
N G H D A K D V M Y I A F T G N D T V P G K D	205
TGGTGCCGACTGGAGCGCAAAGAACACTGAGAAGTTTGCCAAGAGCATCAAGTGCCTCGGTGACAAGCT	1311
G A D W S A K N T E K F A K S I K C L G D K L	228
GGTCGATCGCTTGAAGTGGCTACTGGCTGGTCATGAGCTGTACAAAATGTAATCATGTGTCGGGCTCA	1380
V D R L *	232
GAAGTCTTCACTAGCATTGGTGAAGACAGAGCCCGGTTTCATATACCACCTGGATTTTTTTCTTTGACG	1449
AGTAATGCATGGTCCGACGAGAAGGAGGGCGCATCTTTGAGCCTGCCTGCCAAGCTAGATCTAATCG	1518
CGCCACCCCGTTCGTCGTCGCGGGGTCATGTGCAGGCGCCCGGTTATATGAATAAGAAAATC	1587
GGGAAAATTAAGAAAAGACGAAATACATTATATGAAGAGTAATTTAAAAAGTTGAATGTTCTATAAT	1656

Figura 19. Secuencia nucleotídica y secuencia aminoácídica deducida de la quitosanasasa (Csn) de *B. bassiana*. Los aminoácidos subrayados constituyen la secuencia señal. Los intrones se indican en minúscula. Las secuencias tipo cajas TATA y CAAT, región rica en CT, y dos señales probables de poliadenilación, están subrayadas. En colores y subrayadas se indican probables secuencias regulatorias de la transcripción (ver texto).

Sitios probables de glicosilación.

-186 (ésta última en la cadena complementaria). Se encontraron además dos sitios con la secuencia consenso reconocida por el factor GCR1 de levadura, 5' CTTCC (Baker, 1991), que regula la expresión de genes de enzimas glicolíticas, en las posiciones -99 y -238.

La organización genómica del gen se muestra en el *southern* de la **Figura 21**, en el que se usó el gen completo como sonda. A partir de este experimento se deduce que hay sólo una forma del gen en el genoma. Después de digerir el ADN genómico con *Hind*III, se observan tres fragmentos de hibridación, como es de esperar en base a la presencia de dos sitios para dicha enzima dentro de la secuencia del gen. El tamaño de la banda de hibridación menor coincide con la longitud del espaciamento entre estos dos sitios (541 pb). De forma análoga, se observan dos fragmentos con *Bam*HI, enzima que tiene un único sitio de corte dentro del gen. Con *Eco*RI y *Pst*I se observa un único fragmento. Para la última de estas enzimas, el tamaño de la banda de hibridación coincide con la ubicación de dos sitios de corte (posiciones 377 y 2175 de las **Figuras 19** y **25**, respectivamente) que flanquean al gen, y distan 1798 pb entre sí.

Exón	Intrón		Exón
...G	GTAAGTNNYCNYY.....	WRCTRACMNNNNNNYY..	WACAG N...
...G	GTAAGGCAAAGCT..55 pb..	CGCTCACACAACGTTGCAAGCAG	T... 1 <i>Csn</i>
...G	GTAAGTACCCCT..31 pb..	GATTACAGAACTTTCTTTCAG	C... 2
...A	GTATGTTTTTTT..70 pb..	TGCTAATGAGATGCTGC.TGCAG	T... 1 <i>Mfs</i>
...G	GTATGTCGCAGAA..39 pb..	CACTAAAATAAATGT..TACAG	G... 2
	Sitio donador 5'	Sitio de ramificación	Sitio aceptor 3'

Figura 20. Comparación de sitios conservados de las secuencias intrónicas de los genes *Csn* y *Mfs* con los consensos derivados del análisis de genes de *N. crassa* (Edelman y Staben, 1994). Se muestra la conservación de secuencias intrónicas (en amarillo), y el posible sitio de la ramificación 2'-3' que se forma durante el *splicing* (en rojo). *Nc*: *N. crassa*, **1**: primer intrón, **2**: segundo intrón.
(R=A/G, Y=C/T, M=C/A, W=A/T).

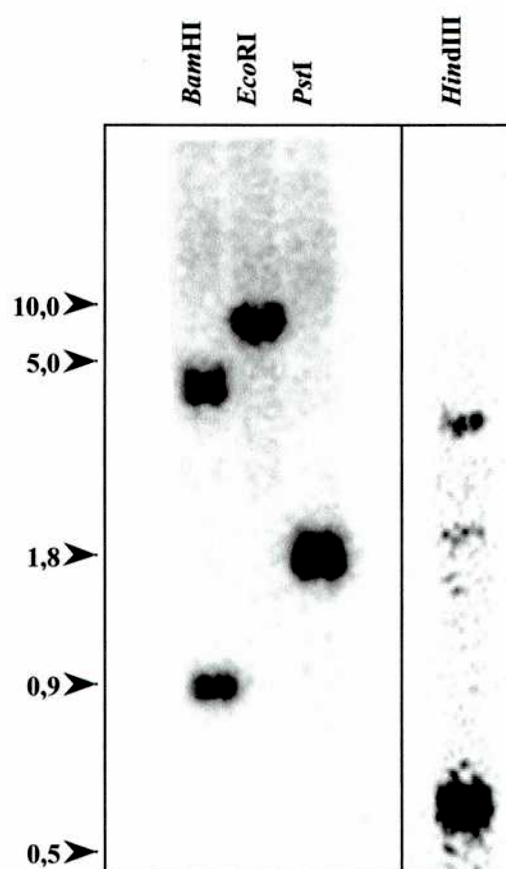


Figura 21. *Southern* genómico usando la región codificante completa del gen *Csn* como sonda. Los tamaños de las bandas se dan en kpb.

Mediante el ensayo de *northern* de las muestras de ARN de las dos condiciones de cultivo estudiadas, se pudo comprobar la naturaleza diferencial de la expresión de la quitosanasasa (**Figura 22**).

Se amplificó por RT-PCR un fragmento correspondiente a 729 b del ARNm de la quitosanasasa que se extiende desde 7 pb en posición 5' al codón de iniciación de la traducción hasta 23 pb en posición 3' al codón de terminación. La transcripción reversa se llevó a cabo con ARN CUT como templado, y el *primer* R3 (ver **Tabla 3**). Para la PCR se utilizaron el *primer* directo 5'-CTTCACCATGGGATCTTCTG y el *primer* reverso 5'-TTTGTAGAGCTCATGACCAGCCAGTAGCC. Dicho fragmento se clonó y se secuenciaron dos clones pudiéndose corroborar la exactitud de la predicción hecha sobre la localización y extensión de los intrones.

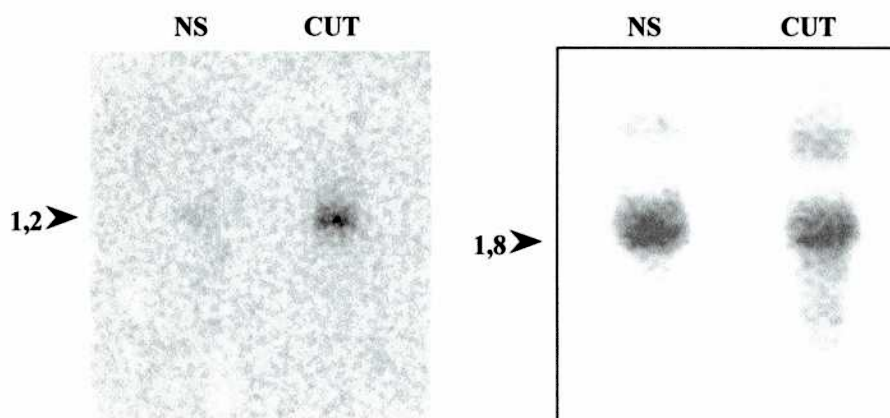


Figura 22. Izquierda: *northern* de los cultivos diferenciales hibridado con el gen completo de la quitosanasa. La relación de intensidad de señal para CUT/NS es de 8/1. Derecha: hibridado con la sonda ribosomal. Los tamaños de banda se señalan en kb.

3.7. Comparación de las quitosanasas fúngicas

El gen de la quitosanasa de *B. bassiana* ha sido depositado en el GenBank (AY008269) y el ORF correspondiente es el quinto miembro de la familia 75 de glicohidrolasas (Henrissat y Coutinho, 2001). Las secuencias aminoacídicas de los miembros de esta familia de quitosanasas fúngicas se alinearon con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), mantenido por el European Bioinformatics Institute (**Figura 23**, ver **Tabla 4**). Las mismas presentan similitud significativa. La proteína de *B. bassiana* presenta la mayor identidad estricta con la de *M. anisopliae* (74%), y la menor con la de *F. solani* (37%). La quitosanasa de *F. solani* tiene un módulo rico en cisteína en su extremo carboxilo terminal, que no se encuentra en las otras proteínas. Una nueva quitosanasa de *Aspergillus* sp. (Cheng y Li, 2000) pertenecería también a esta familia, ya que el fragmento de secuencia *N*-terminal conocido hasta el momento (YNLPNNLKQIUDDHK) es muy similar al correspondiente de las otras secuencias.

3.8. Análisis de agrupamiento de las quitosanasas

Las quitosanasas fúngicas no presentan homología detectable con las quitosanasas bacterianas (familias 46 y 80). Sin embargo, se pudo detectar que las proteínas de la familia 75 presentan similitud con parte de la secuencia de un ORF, que codifica una proteína de 388 aminoácidos, de función desconocida, en el actinomicete *Streptomyces coelicolor*. Dicha secuencia ha sido publicada en el GenBank, como parte del proyecto del secuenciamiento del genoma de este organismo bajo el número de acceso AL39I039 (SC4G1.36) (Redenbach *et al.*, 1996).

Esta secuencia se incluyó en el análisis de agrupamiento de los genes *Csn* conocidos hasta el momento (**Tabla 4**) que se muestra en la **Figura 24**, en el que se observa la separación entre las tres familias de genes. La ubicación de dicha secuencia en el árbol refleja su similitud con las quitosanasas eucariotas. Las posibles implicancias de este hecho se discuten en la sección **Discusión**.

RESULTADOS

		*	20	*	40	*	
<i>B. bassiana</i>	:	YELPAKLSLYD-KHQSCPCSNKLSGTFKGC-----ASYCGDIP---N	:	39			
<i>M. anisopliae</i>	:	YQLPANLKIYD-QHKACTCSNKLSGTFSGC-----ATYCGDLP---N	:	39			
<i>A. oryzae</i>	:	YDLPENLQIYE-KHKSCKCSKELGGYDNC HSHDGKSF SYCGDIP---N	:	46			
<i>A. fumigatus</i>	:	-----KCSKVLAKGFTNCDASQGKSF SYCGDIP---G	:	29			
<i>F. solani</i>	:	RDVPEANVTFKDSIIKQCSCKSTLATGFSSDGDGSG-TYSYCGDHVKDYN	:	49			
		60	*	80	*	100	
<i>B. bassiana</i>	:	AIIFLKG-NCT--YDNMDIDCDGVNRS---AGACANDQTGQDQTAEMDTVK	:	83			
<i>M. anisopliae</i>	:	AIIFLKGSNCN--YDNMDIDCDGANN---AGCCANDPTGQGGQTAEKDTVK	:	84			
<i>A. oryzae</i>	:	AIYLFHSSKNGGQYADMDIDCDGANRH---AGKCSNDHSGQGETRWKDEVQ	:	93			
<i>A. fumigatus</i>	:	AIIFISSKGC---YTNMDIDCDGANN---AGKCANDPGSGQGETAKSDVK	:	73			
<i>F. solani</i>	:	VHYLQGNKCK--LVNMDIDCDGVQSGPADDERCGSSGDTQSITSEQWVLE	:	97			
		*	120	*	140	*	
<i>B. bassiana</i>	:	TYGIP--DL DANVHPYVVFVGNAE---ADPSEVPODHGIEPLSVMVVCND	:	128			
<i>M. anisopliae</i>	:	TYGIP--DL DANLHPYVVFVGNEG---ASPESENPQSKGMKPLSVMVVCNN	:	129			
<i>A. oryzae</i>	:	KLGID--DL DANLHPYVVFVGNENDDGDDPEFDERKHGMEPLSVMVVCNK	:	141			
<i>A. fumigatus</i>	:	KFGIS--DL DANLHPYVVFVGNED---HSEPKKQSHGMQPLSVMVVCNG	:	118			
<i>F. solani</i>	:	SYGTSQKDL DANLHPYVVFVGNEGTKKKGWKTEDPEKHGIKPLSVMVVCNG	:	147			
		160	*	180	*	200	
<i>B. bassiana</i>	:	QVHYGVWGDVNG----GVLITGEASLSMAKLCFEEPLSGDNGHDAKDVMY	:	174			
<i>M. anisopliae</i>	:	QVHYGVWGDVNG----FTSITGEASLALGKLCFEEGLSGDNGHDPKDVHY	:	175			
<i>A. oryzae</i>	:	KLFYGIWGDVNG----HTATGEASLSMAELCFEEEDPSGDSGHEPNDVLY	:	187			
<i>A. fumigatus</i>	:	QLHYGIWGDVNG----GVSITGEASISLADLCFEEHLDGNHGHDPNDVLF	:	164			
<i>F. solani</i>	:	KMFYGIWGDVNGDDGDQPMVGEASISLATACEG-KSMNGNEFGHSDDDVLY	:	196			
		*	220	*	240	*	
<i>B. bassiana</i>	:	IAFTGNDIVPGKDGADWSAKNTEKFAKSIKCLGDKLVDR-----	:	214			
<i>M. anisopliae</i>	:	ICFTGEGDIVPKSGANWKAKTADFEASIKALGDKLVAR-----	:	215			
<i>A. oryzae</i>	:	ICFTGKEAVPKS-ADWRADSTESFEESIKEIGDKLVAGLKA-----	:	228			
<i>A. fumigatus</i>	:	ICFTSKDAVPGAT-ARWKA NAKFEEDSIKSIKDKLVAGLKA-----	:	205			
<i>F. solani</i>	:	IAFPGADAVPCAKGAKWNAKNEDEEQTSTSLGDKLIKRIIGGTNNGGGDT	:	246			
		260	*	280			
<i>B. bassiana</i>	:	-----	:	-			
<i>M. anisopliae</i>	:	-----	:	-			
<i>A. oryzae</i>	:	-----	:	-			
<i>A. fumigatus</i>	:	-----	:	-			
<i>F. solani</i>	:	GGSGNTCSWPGHCOGAACKTGDDCSDDLICTKGCSP	:	285			

Figura 23. Comparación de las quitosanasas fúngicas maduras. Tres y cuatro aminoácidos idénticos en la misma columna aparecen con fondo gris claro y gris oscuro, respectivamente. Cinco aminoácidos idénticos en la misma columna aparecen con fondo negro.

Tabla 4. Quitosanasas incluidas en el análisis de agrupamiento.

Grupo taxonómico	Organismo	Proteína	GenBank	Familia ^a
Virus	<i>Chlorella virus</i>	vChta-1	D88191	46
Bacteria	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ORF SC4G1.36	AL391039	-
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ORF SC3A3.02	AL109849	46
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Csn	AL132973	
	<i>Streptomyces</i> sp. N174	Quitosanasa	L07779	
	<i>Nocardioides</i> sp. N106	Quitosanasa	L40408	
	<i>Amycolatopsis</i> sp.	ORF CsO2	AB041775	
	<i>Bacillus circulans</i> MH-K1	Quitosanasa	D10624	
	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Csn	U93875	
	<i>Bacillus ehimensis</i>	Quitosanasa	AB008788	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Quitosanasa	AB051574	
Proteobacteria	<i>Bacillus</i> sp. CK4	ChoK	AF160195	
	<i>Burkholderia gladioli</i>	csnA	AB029336	
	<i>Matsuebacter chitosanotabidus</i>	ChoA	AB010493	80
Grupo CFB	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	CsoA	AB030253	
	<i>Fusarium solani</i>	Quitosanasa	D85388	75
Fungi	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Quitosanasa	AF105078	
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Csn	AB038996	
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	ORF Csn 1	AJ293219	
	<i>Beauveria bassiana</i>	ORF Csn 1	AY008269	

^aFamilias en la clasificación de glicohidrolasas basada en la similitud de secuencia aminoacídica (Henrissat y Coutinho, 2001).

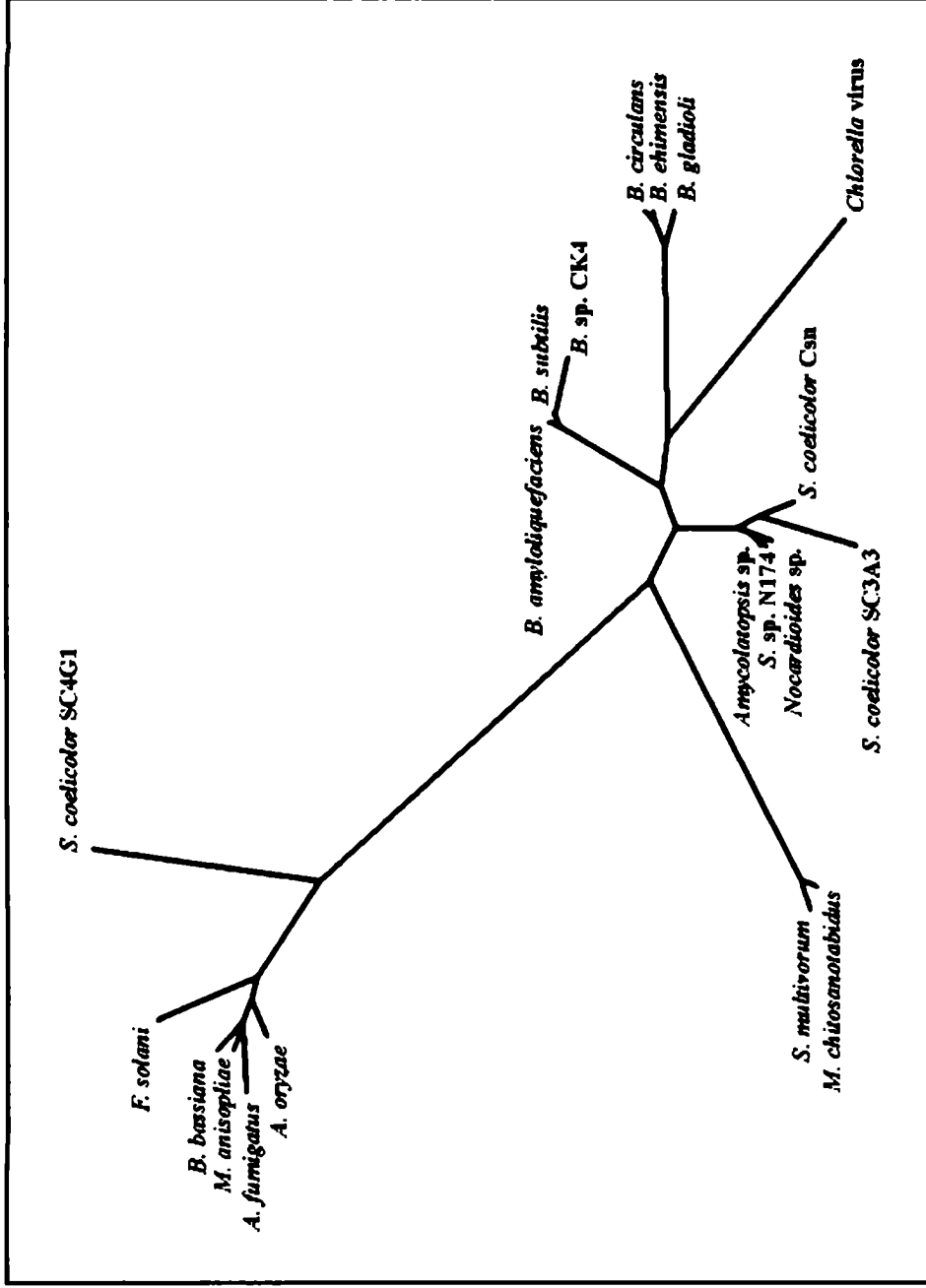


Figura 24. Análisis de agrupamiento de las quitosanasas. Los nombres completos de los organismos y los números de acceso del GeneBank se listan en la Tabla 4. El gráfico corresponde al dendrograma sin raíz obtenido por el método de *neighbor-joining*, en base a las distancias calculadas para las secuencias de las proteínas maduras.

3.9. Análisis del gen de la proteína Mfs

El marco de lectura del gen *Mfs* codifica para una proteína de 495 aminoácidos, y se encuentra interrumpido por dos intrones de 105 b y 73 b, respectivamente (**Figura 25**). La estructura del gen se definió utilizando el programa FGENESH (Salamov y Solovyev, 2000). Para la proteína deducida se calculó un peso molecular de 53.707 Da y un punto isoelectrico de 5,8, como se indicó anteriormente.

El uso de codones muestra el mismo sesgo que en el caso del gen *Csn*. De todos los codones 39% terminan en C, 20% en T, 28% en G y 13% en A.

En la región promotora se identificaron una secuencia TATA en la posición -51 a partir del codón de iniciación, y una secuencia CCAAT que se inicia a -170. También se observa un motivo 5' GATA en la posición -61, y una secuencia 5'-GCGGGG, a -96 (ambos en la cadena complementaria a la de la figura). Esta última responde al consenso definido para promotores fúngicos 5'-SYGGRG, que corresponde al sitio de unión específica de la proteína CREA, en *A. nidulans*. Esta proteína está involucrada en la represión catabólica por carbono y actúa negativamente en la expresión de los genes a cuyos promotores se une (Dowzer y Kelly, 1991). El análisis de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica de la proteína, permite predecir la existencia de doce dominios transmembrana. La predicción de su localización corresponde a la membrana plasmática. La existencia de motivos repetidos, y su distribución a lo largo de la secuencia, hacen suponer que la estructura actual de la proteína refleja un evento evolutivo de duplicación, de una proteína de seis pasos transmembrana (**Figura 26**).

RESULTADOS

CTTGTAGAATTCGTTGAACAGCCTTTATATATATATATATATATACACACACACACCTATTTACCAA	1725
GTTGGCTGGGTACAACCTAGGAAATCTAGCGCCAATTGCTAGCAGCCGTGCGTGCTTTCAAGGGCCGAAA	1794
ACTCCCGCTTGTAAATTGTACATGCTCCTCTCCTCTTCCCCGCATCGGGGGCACAATGCTGACGGGGAC	1863
AATATCCAAAAGTATAGCTTCTGGTCTTGTCTGATGCTTGTCTGTTTTTCCAAAACCTCCAACAATGGAA	1932
	M E 2
AACAGCGGCAGCGCTCGAGCTGGGATAGACTCGGTTGCCATGTTGCCCGCGACAGAAGAGGCATACGCG	2001
N S G S A R A G I D S V A M L P A T E E A Y A	25
GCCCTCGAAAGGAAATTGCTACGAAAGGTCGACTTTAGGCTCATGCCGTGTGCTGATATGCATGATTGTG	2070
A L E R K L L R K V D F R L M P V L I C M I V	48
TTGAAgtatggttttttttttccctttttttccgcctgatccgcccagggaagcaacattttcttttct	2139
L N	50
ttttttttttttgttttttggctaatgagatgctgctgcagTTACCTCGATCGTAATGCGCTGCCAAC	2208
	Y L D R N A L P N 59
GCCCGGTCCAGGGAATCGAGGCCATCTCGGCTTAACAGGAGACCAGTTCAACATTTGCATTTCCACA	2277
A R V Q G I E A H L G L T G D Q F N I C I S T	82
CTCTTCGAGGCTACCTGGCGCTGCAAATCCCTTCCAATCTGATTCTGACAAGAGTGCACCGAGCATC	2346
L F A G Y L A L Q I P S N L I L T R V R P S I	105
TACCTACCCGTCTGCATGGCCCTCTGGGGTTAGTCTCGGCCAGCACGGCGGCCGCGACCGACTTTACC	2415
Y L P V C M A L W G L V S A S T A A A T D F T	128
GGACTCGTCGTTTGTCTGCTTCTTCTGGGCTTTCTCGAGGCGCCCTTTTTCCCGCGCTTTGCTCCTG	2484
G L V V C R F F V G F L E A P F F P G A L L L	151
CTGTCGAGCTGGTACACCCCAAGGAAATGGCCACGCGCACAGCCATCATGTACACGGGCAGCTTGCTC	2553
L S S W Y T P K E M A T R T A I M Y T G S L L	174
TCCAGCGGTTTTGGCGGCTTGTCTGGGGCCGGCATCCAATACGGCATGGACGGCGCGGGGGCTTCAT	2622
S S A F G G L V G A G I Q Y G M D G A R G L H	197
GCCTGGCAGTGGCTCTTTGTCTATTGAGGGTACAATCACGGTCGTGGTCAGCCTGGCCTCCGTCTTTGTC	2691
A W Q W L F V I E G T I T V V V S L A S V F V	220
CTGCCGACTTTCCCTCCAATACGGCCTGGCTCACGGCCGAGGAGCGCGCTCGCCATTTCATCGCCTT	2760
L P D F P S N T A W L T A E E R A L A I H R L	243
CACGCCACAGCGGCAGCGTGGACGAGGAACGGGGCCCTCTGCTGCAGGGCCTCAAGATGGCAGTGCTC	2829
H A H S G S V D E E R G P L L Q G L K M A V L	266
GACTACAAAGTCTGGCTTCTGACGCTGATTGTCATTCTCAAGACTTCTGCAGGAGCAGTCACTCAGTTC	2898
D Y K V W L L T L I V I L K T S A G A V T Q F	289
ATTCCTACACTAGTCGACACTTTTCACTTTGGTAGAGTCCAGACGTTGCTCATGACTGCGCTCCCTTT	2967
I P T L V D T F H F G R V Q T L L M T A P P F	312
GTCTTTGCCGCATGTTGCTCTGGGTGTCTCGGTCCTCGAGCGATAGACTCGGGGAAAGATGCCTGCAC	3036
V F A A I V A L G V S V S S D R L G E R C L H	335
CTTGTTGCCCGCTGACATTTGCCCTTGATTGGCTTCATCATCGCTGCCACCCTGATAGCCTGGCACCT	3105
L V V P L T F A L I G F I I A A T T D S L A P	358
CGCTACTTTTTCGCTATTTCTGGCCTTGGGTGGTGTATATGGCTGCTATGACATTACATATGCATGGATG	3174
R Y F S L F L A L G G V Y G C Y D I T Y A W M	381
AGTCCACGgtatgtcgcagaacggaatggtgcacaaaaaaaaaaaaacagggcacagtaaacactaaaa	3243
S S T	384
ataaatgttacagTCCCAGCTCCCATGAGAAACGATCTTCCGCCTTTGCTATTGCCAACATGGTGGG	3312
V P R P I E K R S S A F A I A N M V G	403
CAATATTGCACAAGTATATTCTCCATACATGTATCCCAAATCCTCTGGTCCGCGTTACCTGCCAGCCAT	3381
N I A Q V Y S P Y M Y P K S S G P R Y L P A M	426
GGTGGCCAATAGCGGCTTCGTTCTAGCGTCCATGGCGTGTGCGCAACTTTGTACTGGTGTGGCGTCG	3450
V A N S G F V L A S M A C C A T L Y W C L R R	449

RESULTADOS

GGAAAACGAATTGCTCGAGGCGGAGGAGCAAATGCAAGGGCATGATGATGACGATGCCGGGAGCGATGG	3519
E N E L L E A E E Q M Q G H D D D D A G S D G	472
AAGCAAAGACGGGTACGCGGAGGGAGCGGTACCCGTCGCGGTCTCGATCCGGGCTCCGGTACATGCT	3588
S K D G S R E G A V P V A V L D P G F R Y M L	495
CTAGTTTCGAAA <u>AATAAAT</u> CAGCAGACCTTTTGTATTGTGT <u>AACT</u> CGGTTTGTACAAACGCTCACGTG	3657
*	
AATCTTACTGCACCAACCTGATTGAACCATGTGATGATGGCAACTGGAACGCAACGATTCACTGTACAA	3726
CGCAATGCGTGAGAGACAGAAATCACAGTGCCAACCTGGATTGTTGGAGAAAAAGCAGTCGTAATTAG	3795
CAATCTATTATTGTCTACATGCAATGATGCCATGCTAAACTTTAGTGCATAGTAAAGGGCAAAAAGTG	3864
TTCTTCATAGGTCAAGCACCAACCACACCATCGGCACCAGGCCCCCAAGATAGATGTACGATTTCCAG	3933
GTTGTGCCAGAGTCCAGAATGGCTTGATTCTGTAGCGAGTACGATCGCTCTCCTGGATATACCCATCA	4002
GTAAACATTTGCTCATTCCCCTCGCCGTCAAGATACACCATGTTCTTGACGTATGCGACCTTGCCGCT	4071
CCCCTTCGGGAAAGTTGCCGCTACCCATGTCCGTATTGGTCAACTCTGAGCCGCTGTTGTACACTTCG	4140
CCAAAGAAGTTGATGACATCGCCATACGCGGCCAGAGTATCCTCTGCATTTGATTCCTTGCTAAACAGC	4209
TCCGCAGGGTAATATCCAATATCCTTTCCGAATGCCTTGAGCCACCACTTGCCGTCGTCGAGGTGAAAC	4278
TTGACATCGAAATCATGCTGCTCGCCGCAATCACAGACATGTGCTCAAAGGACATGCCAGGGAAGATG	4347
GAGTCGTCGACCTGCACCCAACCCTTTACTTCCGTGTTCCAGCCACACATGTAATCGCTGGAACCCTGG	4416
TAGCCATTGGTGTGAAGAAGACAAAAACATTGGCTTGGGGCCTCGAG	4465

Figura 25. Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida de la proteína Mfs de *B. bassiana*. La numeración de las bases continúa a la de la Figura 19. Los intrones se indican en minúscula. Las secuencias tipo cajas TATA y CAAT, y la señal de poliadenilación, están subrayadas. La posición de la cola de poliA en el ARNm, se señala con doble subrayado. En colores y subrayadas se indican probables secuencias regulatorias de la transcripción (ver texto).

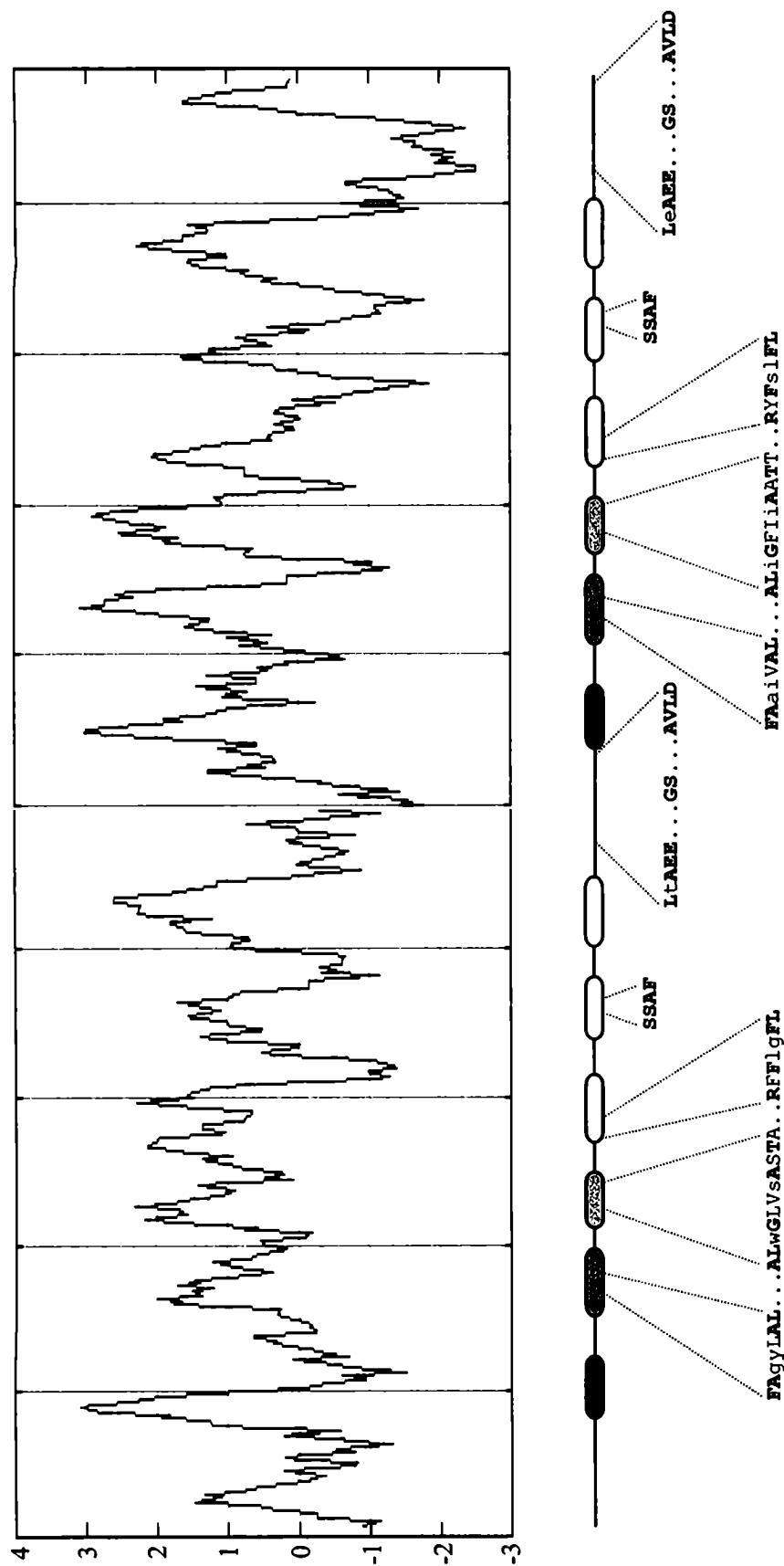


Figura 26. Gráfico de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle para la proteína deducida del gen *Mfs*. En la parte inferior se esquematizan las dos series de seis dominios transmembrana, provenientes de una probable duplicación. Se detallan motivos de aminoácidos conservados. Mayúsculas en negra: aminoácidos idénticos. Mayúsculas: sustituciones conservativas. Minúsculas: sustituciones no conservativas.

DISCUSSION

La patogénesis fúngica en insectos es un proceso del que se requiere un mayor conocimiento, en beneficio del desarrollo de los hongos entomopatógenos como agentes de control de plagas. Para el caso de *B. bassiana*, la abundante literatura referida a su empleo en control biológico contrasta con la escasa información disponible respecto a la genética molecular de este organismo, situación que resulta evidente si se tiene en cuenta que en los bancos de genes, se hayan depositadas las secuencias completas de solamente dos de sus proteínas de codificación nuclear. En este sentido, la identificación de los genes que intervienen en el proceso patogénico, abre la posibilidad a que mediante su manipulación, las cepas naturales puedan ser mejoradas, por ejemplo aumentando su virulencia, o disminuyendo su tiempo letal medio. Considerando un contexto de aplicación más amplio, algunos de estos genes podrían resultar de utilidad para ser expresados en otros microorganismos entomopatógenos empleados en control microbiano, como así también en plantas.

La existencia del hábito saprofítico en *B. bassiana* implica una diferenciación como base de su crecimiento patogénico. Esto se manifiesta en las ventajas competitivas de este hongo para invadir y causar la muerte del hospedante, frente a otros hongos oportunistas y a los saprófitos en general. Se ha visto que el control nutricional es un factor condicionante del establecimiento de la infección *in vivo*, cuyo evento determinante es la penetración de la cutícula del insecto. Por lo tanto para la identificación de genes que se expresan durante esta etapa del proceso patogénico, se siguió una estrategia de cultivo *in vitro*, que consistió en crecer a *B. bassiana* a expensas de la cutícula de *D. saccharalis*. La principal ventaja de esta aproximación al estudio de la patogénesis, consistió en evitar la presencia del hospedante en el sistema en estudio. Utilizando la técnica de *differential display* se analizó la expresión de transcritos expresados diferencialmente bajo esta condición.

Esta técnica resulta apropiada para ser aplicada en organismos de los que no se tiene conocimiento genético previo, y ha sido utilizada con éxito en muchos casos, entre los que se cuentan la identificación de genes de patogenicidad en hongos fitopatógenos (Bohlmann *et al.*, 1994; Benito *et al.*, 1996; Wang y Perlin, 1998). Existen otras dos técnicas aplicables al estudio de la expresión diferencial de genes: la búsqueda diferencial en una genoteca de ADNc (*differential cDNA library*)

screening) y la sustracción de genotecas de ADNc (*substracted cDNA libraries*). Ambas metodologías involucran la construcción de una genoteca de ADNc, a diferencia de la técnica de *differential display*. Esta última ofrece otras ventajas adicionales. Por valerse de la PCR para la amplificación del ADNc, resulta más sensible para la detección de ARNm raros o poco expresados. Tampoco requiere la utilización de ARNm purificado como material de partida. Un inconveniente que se observa frecuentemente con esta técnica, es la obtención de falsos positivos, lo cual obliga al análisis exhaustivo de los fragmentos que se aíslan. Una causa de ello radica en las bandas contaminantes que acompañan la recuperación de los fragmentos de amplificación del gel. La metodología desarrollada en este trabajo apuntó a evitar los patrones electroforéticos con multiplicidad de bandas que suelen observarse en los geles. El análisis automatizado, asimismo, permitió mayor precisión en la apreciación de las posiciones de bandeo y la intensidad de señal.

Dado que para la identificación del gen respectivo al fragmento de amplificación de ADNc seleccionado, no se disponía previamente de una genoteca de *B. bassiana*, y que la técnica empleada prescinde de una genoteca de ADNc, se decidió construir una de ADN genómico, para obtener la secuencia completa del gen. Este criterio de elección se siguió teniendo en cuenta que la mayoría de los genes de hongos filamentosos presenta pocos o ningún intrón, y que la relación del tamaño de los mismos, respecto al de los exones, es inversa a la que se observa en metazoos. De esta forma se pudo predecir convenientemente la secuencia codificante de los transcritos maduros para los dos genes descritos en este trabajo; en el caso del gen *Csn*, la misma coincidió exactamente con la obtenida a posteriori, a partir del producto de RT-PCR del ARNm. Los genes *Msf* y *Csn* tienen dos intrones, cada uno. Este número de intrones es el que se encuentra con mayor frecuencia que cualquier otro en genes de hongos filamentosos (teniendo en cuenta que el 80% de los genes tiene al menos uno). También su extensión es la típica (50-100pb), cercana a la que podría considerarse como límite funcional menor para el *splicing* (50pb).

Así como en la secuencia aguas arriba del gen *Mfs* se pudo detectar al gen *Csn*, aguas abajo de aquél, se descubrió la presencia de un tercer ORF, a partir del cual se dedujo una secuencia de 195 aa correspondientes al extremo carboxilo terminal de una probable proteína, que presenta homología con una carboxipeptidasa

de *Arabidopsis thaliana* (GenBank F71444). Dicho ORF finaliza en la posición 3876 de la **Figura 25** y se extiende sin interrupción, en la cadena complementaria a la que se muestra, hasta el final del segmento secuenciado. Esta disposición agrupada podría interpretarse como un indicio de asociación funcional de estos genes, considerando además el patrón de expresión observado para los dos casos analizados.

El descubrimiento aislado del gen *Mfs* no permite una interpretación directa de su funcionalidad dada la diversidad en la especificidad de transporte de este tipo de proteínas. La presencia del motivo 5'-GCGGGG en la región promotora del gen sugiere la posibilidad del control transcripcional negativo de dicho gen en respuesta a la represión catabólica por carbono. La transcripción en estos organismos –como en muchos otros- está regulada, al menos a dos niveles: un nivel de control específico de una determinada vía metabólica y un nivel más general, mediado por un número relativamente bajo de proteínas regulatorias, que actúan como respuesta por ejemplo a los niveles de carbono y nitrógeno utilizables. En *Aspergillus nidulans* la proteína CREA está involucrada en la represión catabólica por carbono y actúa negativamente en la expresión de los genes a cuyos promotores se une, en la secuencia de unión específica 5' SYGGRG. Esta proteína contiene dos dominios con motivos de dedos de zinc y presenta alta similitud con el represor MIG1 de *S. cerevisiae* y proteínas homólogas de otras especies de hongos, incluido el gen *crr1*, descubierto en *M. anisopliae* (Screen *et al.*, 1997).

La secuencia aminoacídica deducida para la quitosanasa de *B. bassiana* (*BbCsn*) comparte una extensa similitud con las de los cuatro genes homólogos de origen fúngico hasta ahora conocidos. En base a este criterio, dichas enzimas han sido reunidas en una familia única de glicohidrolasas, la número 75, distinta de las dos que incluyen las quitosanasas de origen bacteriano. Dentro de la familia de enzimas fúngicas, *BbCsn* presenta la mayor identidad de secuencia con la proteína de *M. anisopliae* (74%), y la menor, con la de *F. solani* (37%). La enzima de este último organismo, era la única de dicha familia para la cual se conocía la secuencia genómica, la que a diferencia de la de *B. bassiana*, incluye tres intrones (Shimosaka *et al.*, 1996). En los bancos de genes, se encuentran depositadas solamente otras dos secuencias completas de proteínas (de codificación nuclear) de *B. bassiana*; las

mismas corresponden a la nitrato reductasa y a la *Bbsubtilisina*. Resulta llamativo el hecho que para *Bbsubtilisina* el grado de identidad con la proteína homóloga de *M. anisopliae* sea sólo de 54%, y en cambio alcance 68% con la misma proteína de *F. oxysporium*. Esto se resalta porque la similitud de las subtilisinas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, ha sido considerada como indicativa de la conservación de la función entomopatogénica asociada a dicho gen (Joshi *et al.*, 1995). Aplicando el mismo criterio de definición funcional, pero en sentido inverso, la similitud de las quitosanasas de ambas especies, mayor aún que la que presentan las subtilisinas, podría considerarse como una de las evidencias en favor de su asociación con el carácter patogénico.

Con respecto a las quitosanasas bacterianas, las mismas se agrupan en dos familias de glicohidrolasas; la familia 46 comprende enzimas de actinomicetes y bacterias del género *Bacillus* principalmente, y la familia 80 incluye sólo dos representantes de otros tipos bacterianos.

Las enzimas de estas dos familias, sin embargo, poseen aminoácidos conservados en algunas posiciones del sitio activo, por lo que podrían agruparse en una superfamilia (Tremblay *et al.*, 2000). De esta forma quedaría más evidenciada la distinción entre las enzimas procariontas y eucariotas. El origen evolutivo de estas diferentes formas no resulta claro. Se ha resuelto la estructura de dos quitosanasas de la familia 46: la de *Streptomyces* sp. N174 (Marcotte *et al.*, 1996) y la de *Bacillus circulans* MH-K1 (Saito *et al.*, 1999); las mismas resultaron muy similares. Asimismo, se ha observado la conservación de dichas estructuras en otras enzimas glicolíticas. Esta observación se ha propuesto como evidencia de la evolución divergente de este tipo de enzimas a partir de un ancestro común, acompañada de distintas especificidades para cada descendiente (Monzingo *et al.*, 1996; Robertus *et al.*, 1998). Este planteo se basa en la improbabilidad de que haya ocurrido una evolución convergente a un mismo tipo estructural que involucre toda la proteína y no sólo al sitio catalítico. Un caso contrario sería la evolución convergente del sitio catalítico de las serín proteasas a partir de plegamientos diferentes (Robertus *et al.*, 1972). Sin embargo, el análisis a nivel predictivo de la estructura secundaria de las quitosanasas fúngicas (Brzezinski y Neugebauer, 1999), sugiere la prevalencia de motivos de plegamiento beta, en contraposición a la mayor proporción de plegamientos de hélice alfa observado en las enzimas bacterianas.

El sitio catalítico de las quitosanasas bacterianas se encuentra en la región amino terminal de la proteína y los residuos clave para la catálisis ácida por inversión se conservan en todas las enzimas de secuencia conocidas (Glu²² y Asp⁴⁰ para *Streptomyces* sp. N174) (Boucher *et al.*, 1995). En el caso de *B. bassiana* el análisis de espaciamiento de residuos con el programa SAPS (Brendel *et al.*, 1992) indica un efecto de agrupamiento (desviación de una distribución al azar) de cinco residuos Asp (53, 55, 57, 89 y 91) a lo largo de la proteína madura. Estos residuos forman parte de dos bloques conservados en las secuencias de las otras enzimas fúngicas (aa 52-58 y aa 89-102, para *BbCsn*).

Recientemente, se han depositado en las bases de datos de genes, secuencias del actinomicete *Streptomyces coelicolor* (GenBank AL391039), entre las que se halla un ORF (SC4G1.36) del que se deduce una proteína de 388 aminoácidos que tiene similitud con las quitosanasas fúngicas. La similitud hallada comprende a una región carboxilo terminal de extensión similar a *BbCsn*, e incluye a cuatro de los cinco residuos aspártico mencionados. El análisis predictivo de la localización celular de esta proteína indicaría que se trata de una proteína de membrana (probable región transmembrana: aa 100-110). Suponiendo que esta proteína tuviera la misma actividad, y dado que las quitosanasas bacterianas se aislaron a partir de los productos extracelulares de cultivos, esta posible forma de membrana, de secuencia distinta a las anteriores, puede no haber sido revelada por los trabajos realizados en el tema. Esta observación es de interés con respecto a la genealogía de las quitosanasas eucariotas, materia sobre la que es difícil especular, cuando todavía se conocen muy pocos genes, y todos ellos pertenecen a hongos.

Hasta el reconocimiento de la quitosanasa como una enzima distinta, en la literatura se encuentran referencias respecto al uso de quitosano como sustrato para la valoración de preparaciones crudas de quitinasas. Un ejemplo de este tipo lo constituye el uso del sobrenadante de un cultivo de *B. bassiana* para valorar quitinasa con una solución de quitosano (Leopold y Samsinakova, 1970). Como resultado de este ensayo, los autores obtuvieron una reducción de la viscosidad de dicha solución (indicativa de un clivaje de tipo endo), en lo que sería la primera aunque inadvertida evidencia de la actividad quitosanólítica de *B. bassiana*. Posteriormente, en el trabajo pionero de Monaghan *et al.* (1973) sobre el descubrimiento de esta nueva enzima, *B. bassiana* fue identificado, entre otros,

como organismo productor de la misma, capaz de crecer a expensas de la pared celular de hifas del zygomycete *Rhizopus rhizopodiformis*, la cual contiene quitosano como componente estructural.

A pesar del descubrimiento original de estos autores respecto a la distribución relativamente amplia de esta enzima, tanto en bacterias como en hongos, la mayoría de los estudios posteriores se realizaron en bacterias, para muchas de las cuales también se conocía su actividad quitinolítica. La presencia de ambos tipos de enzimas en los organismos estudiados, representa el caso general de la producción de sistemas multienzimáticos para el aprovechamiento eficaz de un mismo tipo de polímero o polímeros relacionados (Warren, 1996).

Actualmente el interés en esta enzima se debe a que el quitosano y sus derivados oligoméricos tienen aplicación en varias industrias, en el tratamiento de efluentes como floculante, en medicina, agricultura y biotecnología. El método convencional de obtención de este biopolímero se basa en la deacetilación alcalina de la quitina, la cual constituye un recurso natural abundante, como subproducto de la actividad pesquera. De allí que la investigación esté dirigida a la búsqueda de enzimas de distintos orígenes y características, tales como especificidad y termoestabilidad, con el objeto de aprovechar su variabilidad natural, en beneficio del desarrollo de procesos controlados de producción de aminoglicanos de estructura definida. Por lo general se busca aislar cepas sobreproductoras de la enzima mediante el *screening* de microorganismos fácilmente cultivables. Sin embargo el rol fisiológico de la enzima ha sido mucho menos indagado y en algunos casos su esclarecimiento resulta controversial. La ocurrencia de la enzima en bacterias se interpreta en el contexto de su amplia capacidad degradativa de residuos orgánicos presentes en la naturaleza; especialmente los actinomicetes son bien conocidos en este aspecto. Sin embargo, las quitosanas parecen tener una amplia distribución ya que también se han hallado en plantas y virus. Aunque todavía el conocimiento en este sentido es muy limitado, también sugiere una mayor distribución natural del quitosano, su sustrato, de la que se le conoce. El siguiente caso grafica este razonamiento. Se ha encontrado una quitosanasas (designada A292L) en el virus PBCv-1 que infecta al alga verde eucariótica *Chlorella* sp. (Sun *et al.*, 1999). El ADN de este virus es introducido en la célula hospedante por medio de la degradación de la pared celular del alga en el punto de adsorción, y después de la

fase replicativa, los viriones también se liberan a través de una zona localizada de lisis de la pared. En coincidencia con su posible participación en dichos eventos de degradación, se ha observado que A292L está presente en el virión, y se expresa en la fase tardía de la replicación. El virus codifica asimismo dos quitinasas (una endo y otra exo) que se supone también participan concertadamente en los eventos de penetración y liberación. En otro virus de *Chlorella*, el CVK2, se encontró el gen de otra quitosanasas con 95% de identidad con A292L (Yamada *et al.*, 1997). Estas proteínas son similares a las bacterianas y se clasifican en la familia 46. El descubrimiento de estas enzimas, y del patrón de expresión de A292L en el ciclo de infección de PBCv-1, fueron las iniciales de una serie de observaciones que evidenciaron la presencia de compuestos quitináceos en la constitución de la pared de *Chlorella*, lo cual no se conocía previamente. Resulta interesante el hecho que anticuerpos generados contra A292L dieron reacción cruzada con dos proteínas del alga, lo cual sugiere que enzimas similares son codificadas por el hospedante, pero que en este caso, su función sería atribuible al crecimiento normal del organismo, con relación a los procesos de morfogénesis y división celular.

Para los hongos la composición de la pared celular es bien conocida, aunque no totalmente en cuanto a su diversidad. Tradicionalmente la presencia de quitosano en la pared se ha reconocido sólo en los zygomycetes, en los que es más abundante (Datema *et al.*, 1977). Pero posteriormente, también se detectó, aunque como fracción minoritaria, en los phyla *Ascomycota* (ej. *Fusarium*; Hadwiger y Beckman, 1980) y *Basidiomycota* (ej. *Agaricus*; Novaes-Ledieu y García Mendoza, 1981). Incluso se ha sugerido que el quitosano es componente de la pared de la levadura *Rhodotorula gracilis*, ya que se ha purificado una quitosanasas de este organismo, y se supone que la misma participaría en el proceso de gemación (Somashekar y Joseph, 1992). En lo que respecta a la posible dualidad del rol fisiológico de esta enzima en hongos, es decir como actividad heterolítica y morfogenética, su *status* podría considerarse similar al de las quitinasas, excepto por una consideración adicional, que es que el quitosano tiene acción fungitóxica. De hecho, una de las utilidades propuestas para el polímero es la protección vegetal contra enfermedades fúngicas. La comprensión de este fenómeno es limitada. Allan y Hadwiger (1979) observaron sensibilidad al quitosano en hongos carentes de dicho polímero en su pared celular. Sin embargo, El Ghaouth *et al.* (1992) obtuvieron inhibición del crecimiento de varios hongos fitopatógenos, incluso de *Rhizopus stolonifer*, un

zygomycete con alto contenido de quitosano. Aparentemente el quitosano, por su naturaleza policatiónica, interactúa con la membrana celular (con carga superficial negativa) y como consecuencia altera la permeabilidad de la misma, ocasionando modificaciones en la arquitectura de la pared. Los resultados contradictorios obtenidos por diferentes autores en cuanto a la toxicidad del quitosano pueden deberse en parte a factores experimentales. Principalmente, se debe tener en cuenta que la misma puede ser afectada por el grado de solubilidad del quitosano, y ésta, a su vez, varía de acuerdo a la longitud del polímero, el grado de acetilación y la acidez del medio. Por otra parte, en los experimentos de inhibición del crecimiento en placa no se puede descartar que el comportamiento químico del quitosano se vea modificado por su interacción con los grupos sulfonados del agar. Más allá de estas dificultades es evidente que la presencia de quitosano fuera del estado natural en que se lo encuentra en la pared celular, impone una limitación al crecimiento de hongos. Este hecho sería aprovechado como parte del mecanismo de defensa de las plantas invadidas por *F. solani*, en las reacciones llamadas de incompatibilidad (Hadwiger *et al.*, 1981). Las quitosanasas halladas en plantas actuarían liberando fragmentos de quitosano de la pared del patógeno, que al aumentar su concentración, inhibirían al hongo. Por lo tanto, al menos para los hongos, se puede especular que la degradación del quitosano, y sus mecanismos de regulación, además de participar del metabolismo de pared, pueden significar no sólo una ventaja adaptativa de aprovechamiento nutricional de un sustrato, sino la posibilidad de escape a una posible reacción de defensa del hospedante mediada por quitosano, en las relaciones de parasitismo.

Se ha observado que en la hemolinfa de larvas de *Spodoptera exigua*, a las 36 h post infección con *B. bassiana*, las células del patógeno son osmóticamente sensibles, es decir, carecen de pared celular definida, y circulan libremente a pesar de la presencia de los hemocitos inmunocompetentes del hospedante (Pendland *et al.*, 1993). Se cree que la falta de reconocimiento y fagocitosis por parte de los hemocitos, se debe a la ausencia de componentes antigénicos reconocibles. De hecho, este tipo de células de pared modificada no unen concanavalina A (una lectina específica para α -manosa), ni anticuerpos generados contra *B. bassiana*, mientras que dichas sondas sí se unen específicamente a blastosporas del hongo producidas *in vitro*. En esta instancia de la infección, en la que la cutícula ha sido atravesada (incluyendo la epidermis y la membrana basal subyacente), no se conoce

a cuál de los organismos, al patógeno o al hospedante, pertenecen las enzimas involucradas en la modificación de la pared celular del hongo. Cabe suponer que algunas de dichas enzimas podrían inducirse en el patógeno como mecanismo de evasión de las respuestas de defensa del hospedante.

En lo que respecta a la actividad heterolítica de *B. bassiana* sobre la cutícula del insecto, la quitinasa es inducida a partir de que la quitina queda expuesta a medida que la proteína circundante es degradada. La síntesis de quitinasa es regulada por los productos de degradación de la quitina mediante un mecanismo de inducción-represión (Smith y Grula, 1983; St Leger *et al.*, 1986d). La prueba de esto es el hecho que altos niveles de quitinasa sólo se observan en cultivos con quitina pero no con otros polímeros como pectina, xilano o celulosa; una enzima represible pero constitutiva se produciría igualmente en presencia de otros polisacáridos, que por su naturaleza insoluble, resultarían insuficientes para ejercer represión catabólica. Experimentos realizados con *M. anisopliae* cultivado con suministro controlado de azúcares o aminoácidos, demostraron que el inductor más efectivo de quitinasa es GlcNAc, el principal monómero constituyente de la quitina. Pero la inducción de la enzima no parece ser específica de este azúcar ya que también GlcN funciona como inductor. Esto puede representar una adaptación del hongo a que la quitina natural presenta distintos grados de deacetilación (Rudall, 1963; Hackman y Goldberg, 1965). Por lo tanto, bajo esta consideración, parte de la actividad quitinasa aparente puede deberse a la acción de la quitosanasas en regiones deacetiladas de la quitina. La situación inversa es menos probable dado que el quitosano (más específicamente las uniones con participación de al menos un residuo GlcN) no es hidrolizado por quitinasa.

Se puede postular también que otro tipo de enzima module la función heterolítica de las enzimas quitinasa y quitosanasas de un modo indirecto, es decir por conversión de los residuos acetilados de los poliaminoglucanos en GlcN. De esta forma, las uniones en las que participan los residuos así modificados dejan de ser susceptibles al ataque de quitinasas para pasar a ser sustrato de quitosanasas. Enzimas deacetilasas (EC 3.5.1.41) se han encontrado tanto en hongos como en insectos (Tsigos *et al.*, 2000) aunque por ahora lo que se conoce en referencia a estas enzimas, es su participación en la biosíntesis de quitosano en hongos, removiendo

los grupos acetilo de los residuos de GlcNAc en la quitina naciente (Davis y Bartnicki-García, 1984; Calvo-Méndez y Ruiz-Herrera, 1987). Durante la degradación de la cutícula del hospedante, una deacetilasa de quitina podría ampliar la diversidad de sustratos degradables por el hongo a partir de un mismo polímero. Esto redundaría en una ventaja adaptativa con respecto a la penetración, si se tiene en cuenta que la velocidad de hidrólisis de la quitina es afectada por un paso de adsorción específica de las quitinasas al sustrato en estado insoluble, lo que se supone también contribuye al retardo observado en la inducción de estas enzimas por parte de sus productos de degradación.

En cuanto a la regulación de la quitosanasa, Monaghan *et al.* (1973) observaron que *Penicillium islandicum* y *B. bassiana* producen la enzima cuando estos hongos son crecidos con hifas de *Rhizopus rhizopodiformis* como fuente nutricional, pero no así en presencia de quitosano coloidal. Esto ha llevado a dichos autores a sugerir que la enzima, para ser inducida, requiere del sustrato en su estado natural. St Leger *et al.* (1986d) han interpretado estos resultados como consecuencia de la represión catabólica operando en el segundo caso, pero no en el primero, presumiendo la relativa inaccesibilidad del quitosano en las hifas de *R. rhizopodiformis*. Por su parte Shimosaka *et al.* (1993) obtuvieron mayor actividad específica de la enzima de *F. solani* en sobrenadantes de cultivos crecidos con GlcNAc, aunque también observaron cierto relajamiento de la expresión con otros sustratos solubles, lo que los llevó a postular que la enzima es de expresión constitutiva. Coincidentemente con los otros trabajos, no obtuvieron actividad creciendo al hongo con quitosano. Sin embargo, para este último caso, señalan la inhibición del crecimiento como causa de la falta de actividad. Todos estos datos admiten una interpretación más general. En primer lugar, la inhibición de crecimiento por quitosano parece ser un fenómeno que, aunque con distintos alcances, se presenta en forma generalizada en hongos. Por lo tanto la inducción de quitosanasa resultaría alterada como parte de una perturbación metabólica más general, cuando los hongos se crecen en presencia de una forma más o menos soluble del polímero. En segundo lugar, las adaptaciones de los organismos a sus nichos ecológicos pueden verse reflejadas en mecanismos de regulación distintos para el control de un mismo gen, más que en la prescindencia o adquisición de genes. Al respecto, St Leger *et al.* (1997) observaron que para hongos cuyo hábito

DISCUSION

patogénico involucra la degradación de la quitina del hospedante *in vivo* (*Verticillium fungicola*, micopatógeno; *B. bassiana* y *M. anisopliae*, entomopatógenos), se detecta actividad de quitinasa por halo de degradación en placa, lo cual no ocurre para los hongos fitopatógenos *F. solani*, *V. dahliae* y *V. albo-atrum*. En cambio, el resultado fue exactamente inverso en cuanto a la detección de celulasa y pectinasa. Mientras tanto, todas las enzimas mencionadas fueron producidas en estos ensayos por los hongos saprófitos *N. crassa* y *A. nidulans*, y los patógenos oportunistas *A. fumigatus* y *A. flavus*. La versatilidad de estos últimos puede interpretarse no como una adaptación específica, sino como la capacidad de aprovechar una amplia gama de recursos que puedan estar disponibles temporariamente.

A continuación se enumeran, a modo de conclusiones, los logros obtenidos:

La preparación de un medio de cultivo apto para el crecimiento *in vitro* de *B. bassiana* a partir de la cutícula de *D. saccharalis*.

La optimización de un protocolo para la técnica de *differential display*, basado en una PCR de ciclado rápido, y en el reemplazo de marcación radiactiva por nucleótidos fluorescentes, de utilidad para el análisis en un secuenciador automático.

La utilidad de la técnica mencionada en la búsqueda de ARNm diferenciales.

Una metodología para la producción de protoplastos de *B. bassiana*.

Una genoteca de ADN genómico de *B. bassiana*.

El descubrimiento de dos nuevos genes de *B. bassiana*.

El clonado del primer gen que codifica para una proteína del complejo quitinolítico de *B. bassiana*, con probable participación en el proceso de degradación cuticular.



Marcelo Berretta
Tesista



Dr. Oscar Grau
Director

BIBLIOGRAFIA

- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., and Blackwell, M. 1996. "Introductory Mycology", 4 ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Allan, C. R., and Hadwiger, L. A. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.* **3**, 285-287.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Alves, S. B., y Lecuona, R. E. 1996. Utilización de hongos entomopatógenos. En "Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga" (R. E. Lecuona, Ed.), pp. 241-254. M. Mas, Buenos Aires.
- Ando, A., Noguchi, K., Yanagi, M., Shinoyama, H., Kagawa, Y., Hirata, H., Yabuki, M., and Fujii, T. 1992. Primary structure of chitosanase produced by *Bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**, 135-144.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1994. "Current Protocols in Molecular Biology." John Wiley & Sons, New York.
- Azevedo, J. L. 1998. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. En "Controle biológico" (I. S. de Melo, J. L. de Azevedo, Eds), Vol. 1, pp. 74-78. Embrapa, Jaguariúna, SP.
- Baker, H. V. 1991. GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTC sequence motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 9443-9447.
- Barr, D. J. S. 1992. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* **84**, 1-11.
- Bassi, A. 1835. Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che afflige i bachi de seta e sul modo di liberane le bigattaie anche le piu infestate. Parte Prima Teorica. Orcesi. Lodi. En "Phytopathological classics" (A. C. Ainsworth and P. J. Yarrow, Eds.). Monumental Printing, Baltimore.
- Benito, E. P., Prins, T., and van Kan, J. A. L. 1996. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol. Biol.* **32**, 947-957.
- Berretta, M. F., Lecuona, R. E., Zandomeni, R. O., y Grau, O. 1995. Marcadores moleculares generados por RAPD-PCR para la caracterización de cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. En "XXXI Reunión Anual de la SAIB." Villa Giardino, Córdoba. M82.
- Berretta, M. F., Lecuona, R. E., Zandomeni, R. O., and Grau, O. 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. *J. Invertebr. Pathol.* **71**, 145-150.

BIBLIOGRAFIA

- Bidochka, M. J., McDonald, M. A., St Leger, R. J., and Roberts, D. W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification DNA (RAPD). *Current Genetics* **25**, 107-113.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J., Frutiger, S., and Hochstrasser, D. F. 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023-1031.
- Bohlmann, R., Schauwecker, F., Basse, C., and Kahmann, R. 1994. Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Adv. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact* **3**, 239-245.
- Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W. A., and Brzezinski, R. 1992. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 188-193.
- Boucher, I., Fukamizo, T., Honda, Y., Willick, G. E., Neugebauer, W. A., and Brzezinski, R. 1995. Site-directed mutagenesis of evolutionary conserved carboxylic amino acids in the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 reveals two residues essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* **270**, 31077-31082.
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B. E., and Karlin, S. 1992. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2002-2006.
- Brzezinski, R., and Neugebauer, A. 1999. The chitosanase web page. <http://www.callisto.si.usherb.ca/~rbrzezini/>
- Burges, H. D., and Hall, R. A. 1982. Bacteria and fungi as insecticides. *Outlook Agr.* **11**, 79-86.
- Calvo-Méndez, C., and Ruiz-Herrera, J. 1987. Biosynthesis of chitosan in membrane fractions from *Mucor rouxii* by the concerted action of chitin synthetase and a particulate deacetylase. *Exp. Mycol.* **11**, 128-140.
- Carruthers, R. I., and Hural, K. 1990. Fungi as naturally occurring entomopathogens. *En "Directions in Biological Control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases"* (R. R. Baker and P. E. Dunn, Eds.), pp. 115-138. A. R. Liss, Inc., New York.
- Cheng, C. Y., Li, Y-K. 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotech. Appl. Biochem.* **32**, 197-203.
- Chomczynsky, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Clarkson, J. M., and Charnley, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* **4**, 197-203.
-

BIBLIOGRAFIA

- Cooper, R. M. 1984. The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage. *En* "Plant Diseases: Infection, Damage and Loss" (R. K. S. Wood and G. J. Jellis, Eds.), pp. 13-28. Blackwell, Oxford.
- Crespo, D. C., Lecuona, R. E., Díaz, B. M. y Stock, P. 1996. Cría de insectos en laboratorio. *En* "Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga" (R. E. Lecuona, Ed.), pp. 183-188. M. Mas, Buenos Aires.
- Dagoberto, E., Parisi, R., Iannone, N., y Frutos, E. 1981. Incidencia del "barrenador del tallo" *Diatraea saccharalis* (F.) en el cultivo de maíz. *En* "Congreso Nacional de maíz, 2º, Pergamino," pp. 194-200.
- Dagoberto, E. y Lecuona, R. E. 1982. Dinámica poblacional de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera, Pyralidae) e incidencia del daño en el cultivo. *En* "Carpeta de Producción Vegetal. Maíz." Tomo IV, Información N° 44. Pergamino, Estación Experimental Agropecuaria.
- Dams, E., Hendriks, L., Van de Peer, Y., Neefs, J. M., Smits, G., Vandenbempt, I., and De Wachter, R. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **16**, 87-173.
- Datema, R., Wessels, J. G. H., and Van Den Ende, H. 1977. The hifal wall of *Mucor mucedo*. 2. Hexoxamine-containing polymers. *Eur. J. Biochem.* **80**, 621-626.
- Davis, L. L., and Bartnicki-García, S. 1984. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry* **23**, 1065-1073.
- Doss, R. P. 1996. Differential display without radioactivity-A modified procedure. *BioTechniques* **21**, 408-410.
- Dowzer, C. E. A., and Kelly, J. M. 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5701-5709.
- Edelmann, S. E., and Staben, C. 1994. A statistical analysis of sequence features within genes from *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **13**, 253-262.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., and Benhamou, N. 1992. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycol. Res.* **96**, 769-779.
- Evans, H. C. 1988. Coevolution of entomogenous fungi with their insects hosts. *En* "Coevolution of Fungi with Plants and Animals" (D. L. Hawksworth and K. Pirozynski, Eds.). Academic Press, London and New York.
- Feinsilver, J. M. 1995. Cuban Biotechnology: The strategic success and commercial limits of a first world approach to development. *En* "Biotechnology in Latin America: Politics, Impacts and Risks" (N. P. Peritore and A. K. Galve-Peritore, Eds.), pp. 97-126. Scholarly Resources, Inc, Wilmington, DE.

- Felsestein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) v3.5C. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fenton, D. M., and Eveleigh, D. E. 1981. Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen. Microbiol.* **126**, 151-165.
- Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. En "Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980" (H. D. Burges, Ed.), pp. 465-482. Academic Press, London.
- Flach, J., Pilet, P. E., and Jolles, P. 1992. What's new in chitinase research? *Experientia* **48**, 701-716.
- Frischauff, A. M., Lehrach, H., Polstka, A., and Murray, N. M. 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**, 827-842.
- Fu, Y. H., and Marzluf, G. A. 1990. *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**, 5331-5335.
- Gabriel, B. P. 1968. Enzymatic activities of some entomopathorous fungi. *J. Invertebr. Pathol.* **11**, 70-81.
- Goettel, M. S., St Leger, R. J., Rizzo, N. W., Staples, R. C., and Roberts, D. W. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2233-2239.
- Gurr, S. J., Unkles, S. E., and Kinghorn, J. R. 1987. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. En "Gene Structure in Eukaryotic Microbes, Special Publication of the Society for General Microbiology" (J. R. Kinghorn, Ed.), Vol. 22, pp. 93-139. IRL Press, Oxford.
- Hackman, R. H., and Goldberg, M. 1965. Studies on chitin. 6. The nature of α - and β -chitins. *Aust. J. Biol. Sci.* **18**, 935-946.
- Hadwiger, L. A., and Beckman, J. M. 1980. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.* **66**, 205-211.
- Hadwiger, L. A., Beckman, J. M., and Adams, M. J. 1981. Localization of fungal components in the pea-*Fusarium* interaction detected immunochemically with anti-chitosan and anti-fungal cell wall antisera. *Plant Physiol.* **67**, 170-175.
- Hajek, A. E., and St Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* **39**, 293-322.
- Hassan, A., and Charnley, A. K. 1989. Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* **54**, 117-124.

- Hedges, A., and Wolfe, R. S. 1974. Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both β -1,4-glucanase and chitosanase activities. *J. Bacteriol.* **120**, 844-853.
- Hegedus, D. D., and Khachatourians, G. G. 1993a. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Metarhizium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4283-4288.
- Hegedus, D. D., and Khachatourians, G. G. 1993b. Construction of cloned DNA probes for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.* **62**, 233-240.
- Hegedus, D. D., and Khachatourians, G. G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotech. Adv.* **13**, 455-490.
- Hegedus, D. D., and Khachatourians, G. G. 1996. Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* within infected migratory grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) using polymerase chain reaction and DNA probe. *J. Invertebr. Pathol.* **67**, 21-27.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316.
- Henrissat, B., and Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696.
- Henrissat, B., and Coutinho, P. 2001. Glycoside Hydrolase Families. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf.html>
- Hensel, M., and Holden, D. W. 1996. Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. *Microbiology* **142**, 1049-1058.
- Hubbard, S. C., and Ivatt, R. J. 1981. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* **50**, 555-583.
- Humber, R. 1997. Fungi: identification. *En* "Manual of Techniques in Insect Pathology" (L. Lacey, Ed.), pp. 153-185. Academic Press, San Diego.
- I. U. B. 1984. Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions. Academic Press, London and New York.
- Ignoffo, C. M., and Anderson, R. F. 1979. Bioinsecticides. *En* "Microbial Technology" (H. J. Pepler and D. Perlman, Eds.), Vol 1, pp 1-28. Academic Press, London.

-
- Izume, M., Nagae, S., Kawagishi, H., Mitsutomi, M., and Ohtakara, A. 1992. Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially *N*-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 448-453.
- Joshi, L., St Leger, R. J., and Bidochka, M. J. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 211-218.
- Khachatourians, G. G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En "The mycota VI. Human and animal relationships" (Howard and Miller, Eds.), pp. 331-363. Springer-Verlag, Berlin.
- Kosir, J. M., MacPherson, J. M., and Khachatourians, G. G. 1991. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. *Can. J. Microbiol.* **37**, 534-541.
- Kudla, B., Caddick, M. X., Longdon, T., Martínez-Rossi, N. M., Bennet, C. F., Sibley, S., Davies, R. W., and Arst, H. N. Jr. 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J.* **9**, 1355-1364.
- Leal, S. C. M., Bertioli, D. J., Butt, T. M., Carder, J. H., Burrows, P. R., and Peberdy, J. F. 1997. Amplification and restriction endonuclease digestion of the *prI* gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. *Mycol. Res.* **101**, 257-265.
- Lecuona, R. E. 1990. Parasitismo natural de *Diatraea saccharalis* por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. En "Carpeta de Producción Vegetal. Maíz." Tomo IX, Información N° 94. Pergamino, Estación Experimental Agropecuaria.
- Lecuona, R. E. 1996. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. En "Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga" (R. E. Lecuona, Ed.), pp. 143-150. M. Mas, Buenos Aires.
- Lecuona, R. E., Tigano, M. S., and Díaz, B. M. 1996. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. *Ann. Soc. Entomol. Brasil.* **25**, 299-307.
- Leopold, J., and Samsinakova, A. 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**, 34-42.
- Liang, P., and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F., and Pardee, A. B. 1994. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5763-5764.
-

- Luthy, P., Cordier, J. L., and Fischer, H. M. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. *En "Microbial and viral pesticides"* (E. Kurstak, Ed.), pp. 35-74. Marcel Dekker, New York.
- Maclean, D. J., Braithwaite, K. S., Manners, J. M., and Irwin, J. A. G. 1993. How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? *Adv. Plant Pathol.* **10**, 207-244.
- Marcotte, E. M., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Brzezinski, R., and Robertus, J. D. 1996. X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from *Streptomyces* N174. *Nature Struct. Biol.* **3**, 155-162.
- McGeoch, D. J. 1985. On the predictive recognition of signal peptide sequences. *Virus Res.* **3**, 271-286.
- Mewes H. W., Albermann K., Heumann K., Liebl S., and Pfeiffer F. 1997. MIPS: A database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acid Res.* **25**, 28-30.
- Michelmore, R. W., and Hulbert, S. H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**, 383-404.
- Monaghan, R. L., Eveleigh, D. E., Tewari, R. P., and Reese, E. T. 1973. Chitosanase, a novel enzyme. *Nature N. Biol.* **245**, 78-80.
- Monzingo, A. F., Marcotte, E. M., Hart, P. J., and Robertus, J. D. 1996. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 133-140.
- Mugnai, L., Bridge, P. D., and Evans, H. C. 1989. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycol. Res.* **92**, 199-209.
- Nakai, K. 1998. PSORTII. "Prediction of protein sorting signals and localization sites in aminoacid sequences." <http://psort.nibb.ac.jp/>
- Nelson, R. R. 1977. Pathogen variation and host resistance. *En "Breeding plants for disease resistance; concepts and applications"* (R. R. Nelson, Ed.), pp 40-48. State University Press, Pennsylvania.
- Nicholas, K. B., and Nicholas, H. B., Jr. 1997. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. v 2.5.
- Novaes-Ledieu, M., and García Mendoza, C. 1981. The cell walls of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris* fruiting body hyphae. *Can. J. Microbiol.* **27**, 779-787.
- Ohtakara, A. 1988. Chitosanase from *Streptomyces griseus*. *Methods Enzymol.* **161**, 505-510.

- Papierok, B. 1991. La lutte contre les insectes d'importance médicale: les méthodes biologiques. *Technique et Biologie* 1, 21-29.
- Park, J., Shimono, K., Ochiai, N., Shigeru, K., Kurita, M., Ohta, Y., Tanaka, K., Matsuda, H., and Kawamukai, M. 1999. Purification, characterization, and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001. *J. Bacteriol.* 181, 6642-6649.
- Patterson, D. J., and Sogin, M. L. 1992. Eukaryote origins and protistan diversity. En "The origin and evolution of prokaryotic and eukaryotic cells" (H. Hartman and K. Matsuno, Eds.), pp 13-46. World Scientific, Singapore.
- Pelletier, A., and Sygush, J. 1990. Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 844-848.
- Pendland, J. C., Hung S. Y., and Boucias, D. G. 1993. Evasion of host defense by *in vivo*-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. *J. Bacteriol.* 175, 5962-5969.
- Pfeifer, T. A., and Khachatourians, G. G. 1987. The formation of protoplasts from *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 248-253.
- Pfeifer, T. A., and Khachatourians, G. G. 1993. Electrophoretic karyotype of the entomopathogenic deuteromycete *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 231-235.
- Poprawski, T. J., Riba, G., Jones, W. A., and Aioun, A. 1988. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 17, 275-279.
- Price, J. S., and Storck, R. 1975. Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* 124, 1574-1585.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., and Hopwood, D. A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21, 77-96.
- Robbins, P. W., Albright, C., and Benfield, B. 1988. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase 63) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 443-447.
- Roberts, D. W. 1969. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: Isolation of destruxins from submerged cultures. *J. Invertebr. Pathol.* 14, 82-88.

- Roberts, D. W., and Humber, R. A. 1981. Entomogenous fungi. *En* "The Biology of Conidial Fungi" (G. T. Cole and B. Kendrick, Eds.), Vol. 2, pp. 201-236. Academic Press, New York.
- Roberts, D. W., Fuxa, J., Gaugler, J., Goettler, M., Jaques, R., and Maddox, J. 1991. Use of pathogens in insect control. *En* "Handbook of pest management in agriculture", 2 ed., (D. Pimentel, Ed.), Vol. 2, pp. 243-278. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Robertus, J. D., Alden, R. A., Birktoft, J. J., Kraut, J., Powers, J. C., and Wilcox, P. E. 1972. An X-ray crystallographic study of the binding of peptide chloromethyl ketone inhibitors to subtilisin BPN. *Biochemistry* **11**, 2439-2449.
- Robertus, J. D., Monzingo, A. F., Marcotte, E. M., and Hart, P. J. 1998. Structural analysis shows five glycohydrolase families diverged from a common ancestor. *J. Exp. Zool.* **282**, 127-132.
- Rudall, K. M. 1963. The chitin/protein complexes of insect cuticles. *Adv. Insect Physiol.* **1**, 257-313.
- Saito, J., Kita, A., Higuchi, Y., Nagata, Y., Ando, A., and Miki, K. 1999. Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1,6-Å resolution and its substrate recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* **274**, 30818-30825.
- Sakai, K., Katsumi, R., Isobe, A., and Nanjo, F. 1991. Purification and hydrolytic action of a chitosanase from *Nocardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**, 65-72.
- Salamov, A., and Solovyev, V. 2000. *Ab initio* gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res.* **10**, 516-522.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. "Molecular cloning. A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samsinakova, A., Misikova, S., and Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 322-330.
- Samson, R. A., Evans, H. C., and Latge, J. P. 1988. "Atlas of Entomopathogenic Fungi." Springer-Verlag, Berlin.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schwartz, D. C., and Cantor, C. R. 1984. Separation of yeast chromosomes-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.

- Screen, S., Bailey, A., and Charnley, K. 1997. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Curr. Genet.* **31**, 511-518.
- Seed, B., Parker, R. C., and Davidson, N. 1982. Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion. *Gene* **19**, 201-209.
- Shimizu, S., and Aizawa, K. 1988. Serological classification of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 348-353.
- Shimosaka, M., Nogawa, M., Ohno, Y., and Okazaki, M. 1993. Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*-Purification and some properties. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 231-235.
- Shimosaka, M., Nogawa, M., Wang, X., Kumehara, M., and Okazaki, M. 1995. Production of two chitosanases from a chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB101. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 438-442.
- Shimosaka, M., Masanori, K., Zhang, X-Y., Nogawa, M., and Okazaki, M. 1996. Cloning and characterization of a chitosanase gene from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani*. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 426-431.
- Smith, R. J., and Gula, E. A. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **37**, 222-230.
- Smith, R. J., Pekrul, S., and Gula, E. A. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* **38**, 335-344.
- Smith, R. J., and Gula, E. A. 1982. Toxic components of the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**, 15-22.
- Smith, R. J., and Gula, E. A. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**, 319-326.
- Somashekar, D., and Joseph, R. 1992. Partial purification and properties of a novel chitosanase secreted by *Rhodotorula gracilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 1-4.
- St Leger, R. J., Cooper, R. M., and Charnley, A. K. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *J. Invertebr. Pathol.* **48**, 85-95.
- St Leger, R. J., Charnley, A. K., and Cooper, R. M. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on host cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **48**, 85-95.

- St Leger, R. J., Charnley, A. K., and Cooper, R. M. 1986c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **47**, 295-302.
- St Leger, R. J., Cooper R. M., and Charnley, A. K. 1986d. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1509-1517.
- St Leger, R. J., Charnley, A. K., and Cooper, R. M. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **253**, 221-232.
- St Leger, R. J., Durrands, P. K., Charnley, A. K., and Cooper, R. M. 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 285-293.
- St Leger, R. J., Butt, T. M., Staples, R. C., and Roberts, D. W. 1989. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* **13**, 253-262.
- St Leger, R. J., Allee, L. L., May, B., Staples, R. C., and Roberts, D. W. 1992a. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycol. Res.* **96**, 1007-1015.
- St Leger, R. J., Frank, D. C., Roberts, D. W., and Staples, R. C. 1992b. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 991-1001.
- St Leger, R. J., Staples, R. C., and Roberts, D. W. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *J. Invertebr. Pathol.* **61**, 81-84.
- St Leger, R. J. 1995. Molecular determinants of fungal pathogenicity to insects. *En "Society for Invertebrate Pathology 28th Annual Meeting."* Cornell University, Ithaca New York. p. 53.
- St Leger R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., and Roberts, D. W. 1996a. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6349-6354.
- St Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W., and Roberts, D. W. 1996b. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beuveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 907-912.
- St Leger, R. J., Joshi, L., and Roberts, D. W. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* **143**, 1983-1992.

- Steinhaus, E. A. 1963. "Insect Pathology. An Advanced Treatise." Academic Press, New York.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van der Bosch, R., and Hagen, K. S. 1959. The integrated control concept. *Hilgardia* **29**, 81-101.
- Sun, L., Adams, B., Gurnon, J. R., Ye, Y., and Van Etten, J. L. 1999. Characterization of two chitinase genes and one chitosanase gene encoded by *Chlorella virus* PBCV-1. *Virology* **263**, 376-387.
- Tan, Y., and Ekramodoullah, A. K. M. 1991. Immunochemical characterization of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**, 269-276.
- Thomas, K. C., Khachatourians, G. G., and Ingledew W. M. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **33**, 12-20.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tigano, M. S., Riba, G., and Aioun, A. 1990. Variabilité des alpha estérases et de la virulence au sein de populations de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin isolées de populations larvaires d'*Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Bull. Soc. Ent. Fr.* **95**, 39-47.
- Tigano-Milani, M. S., Samson, R. A., Martins, I., and Sobral, B. W. S. 1995. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology* **141**, 239-245.
- Todorova, S, I. 1998. Bioinsecticides à base de champignons entomopathogènes. *Antennae. Bull. Soc. Ent. Québec.* **5**, 23.
- Tremblay, H., Blanchard, J., Brzezinski, R. 2000. A common molecular signature unifies the chitosanases belonging to families 46 and 80 of glycoside hydrolases. *Can. J. Microbiol.* **46**, 952-955.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**, 305-312.
- Urtz, B. E., and Rice W. C. 1997. RAPD-PCR Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**, 405-409.
- Valencia, P. E. 1995. Manejo integrado de plagas (MIP): alternativa para el desarrollo agrícola sostenible. *Agricultura de las Américas* **233**, 19-21.
- von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**, 4683-4690.
-

- Wang, L., and Perlin, M. H. 1998. Isolation of a novel gene (*HSGc11*) whose expression is apparently limited to the hyphal stage of *Mycrobotryum violaceum*. *Int. J. Plant Sci.* **159**, 206-212.
- Warren, R. A. J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 183-212.
- Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**, 150-160.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, K., Ando, A., and Fujii, T. 1988. Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **34**, 255-270.
- Yamada, T., Hiramatsu, S., Songsri, P., and Fujie, M. 1997. Alternative expression of a chitosanase gene produces two different proteins in cells infected with *Chlorella* virus CVK2. *Virology* **230**, 361-368.
- Yoon, H., Kim, H. Y., Lim, Y., Kim, H. K., Shin, D., Hong, B., and Cho, H. 2000. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3727-3734.