



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIA CECÍLIA DOS REIS

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana*
VIA *Agrobacterium tumefaciens***

Londrina
2004

MARIA CECÍLIA DOS REIS

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana*
VIA *Agrobacterium tumefaciens***

Dissertação apresentada ao curso de Pós –
Graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2004

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Joaquim** e **Sônia** por
todo carinho, amor e apoio que
sempre demonstraram por mim*

OFEREÇO:

*Aos meus queridos irmãos **Pérsia,**
Júnior e Ísis*

AGRADECIMENTOS

A Jesus e Nossa Senhora Aparecida, por estarem sempre perto de mim.

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, orientadora deste trabalho, que além de me ensinar com paciência, depositou em mim confiança, amizade e carinho.

Aos professores Dr. Sérgio Suzart, Dra. Maria Angélica E. Watanabe e Dra. Maria Helena P. Fungaro, pela disponibilidade de equipamentos de seus laboratórios e pelas sugestões relevantes à conclusão dos experimentos.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia e colegas do mestrado, especialmente Eliza e Mariana, pelo convívio e amizade durante todos os obstáculos de nossa formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial à Claci pela amizade e disponibilidade nos momentos que precisei.

Aos amigos de laboratório Ariane C., Ariane D., Ângelo, Bruno, Camila, Cláudia, Ivan, e Rubens, por demonstrarem ao longo desses dois anos companherismo e muita amizade.

Aos meus tios, primos, amigos e minha cunhada que sempre apostaram em minha força de vontade.

A todos que direta e indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigado.

RESUMO

A metodologia de transformação genética mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (agro-transformação) foi aplicada com sucesso para o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Conídios de *B. bassiana* foram transformados utilizando-se o gene *hph* de *Escherichia coli* que confere resistência ao antibiótico higromicina B como marcador seletivo, sob controle de promotores heterólogos e a seqüência de término *trpC* de *Aspergillus nidulans*. A eficiência de transformação foi de até 28 e 96 transformantes por 10^4 e 10^5 conídios alvos, respectivamente, utilizando três vetores binários distintos. Alta estabilidade mitótica dos transformantes (80-100%) foi observada após 5 passagens sucessivas em meio não seletivo. A ocorrência de transformantes abortivos foi observada para todos os vetores binários utilizados. Os transformantes foram analisados quanto a presença do gene *hph* por PCR e Southern blot. A análise de Southern revelou a ocorrência de integração de mais de uma cópia do gene *hph* no genoma dos transformantes. O método de agro-transformação foi efetivo na obtenção de transformantes de *B. bassiana* resistentes à higromicina, possibilitando seu emprego em estudos de mutagênese insersional neste fungo.

Palavras chave: Agro-transformação, *Beauveria bassiana*, Resistência à higromicina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E O CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS-PRAGAS....	9
2.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS FILAMENTOSOS	12
2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	18
REFERÊNCIAS	21
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i>	26
CONCLUSÕES	42

1 INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin é de distribuição cosmopolita e representa uma das espécies mais promissoras como agente de controle microbiano de vários insetos indesejáveis (McCOY, 1990). Diversos formulados à base de conídios de *B. bassiana* vêm sendo empregados em escala comercial em alguns países (De NARDO; CAPALBO, 1998, BUTT et al., 2001). No Brasil, *B. bassiana* ocorre enzooticamente e epizooticamente em diversas regiões. Até o momento, volumes consideráveis desse fungo têm sido comercializados para o controle de ácaros do mamão, cochonilhas de citrus, diversas pragas da horticultura e broca do café (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética e a aplicação destas na investigação de fenômenos biológicos, tem propiciado um rápido aumento de conhecimento sobre a biologia de microrganismos entomopatógenos ao nível molecular. Em particular, a elaboração de sistemas de transformação genética para fungos entomopatogênicos surge como uma ferramenta adicional nos estudos de virulência, permitindo a identificação de genes e a determinação de suas funções.

Os relatos de transformação em fungos entomopatogênicos compreendem a obtenção de protoplastos, seguida de tratamento com o agente fusionante polietilenoglicol (PEG) ou eletroporação e a biobalística.

Em 1998, De Groot e colaboradores descreveram pela primeira vez a aplicabilidade da metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (agro-transformação) para fungos filamentosos. Desde então, o sistema *Agrobacterium* tem sido empregado na transformação de diversas espécies fúngicas, sendo que altas frequências de transformação têm sido relatadas. Além

disso, na agro-transformação é comum a ocorrência de integração aleatória de uma seqüência de DNA (T-DNA) em sítios únicos no genoma da célula hospedeira o que têm estimulado o emprego desta metodologia como ferramenta na obtenção de mutantes via mutagênese insercional.

Até o momento, transformantes de *B. bassiana* foram obtidos empregando-se os métodos tradicionais os quais fazem uso de protoplastos como células alvo (DABOUSSI et al., 1989; PFEIFER; KHACHATOURIANS, 1992; SANDHU et al., 2001). Segundo estes autores, as freqüências de transformação obtidas foram pouco satisfatórios para ambos métodos utilizados.

Em função disso, o objetivo do presente trabalho compreendeu o estabelecimento da metodologia de transformação de conídios de *B. bassiana* baseada no sistema *Agrobacterium*, visando uma alta eficiência de transformação e estudos posteriores acerca de genes relacionados a entomopatogenicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E O CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS-PRAGA

Os insetos constituem o grupo mais numeroso dentre os seres vivos encontrados no planeta, alguns dos quais causam prejuízos para a agricultura sendo considerados insetos-praga. Desde a década de 40 que o controle desses insetos baseia-se no emprego de inseticidas químicos. Os agrotóxicos geralmente empregados apresentam elevado grau de toxicidade bem como acúmulo nos organismos, podendo levar a danos consideráveis na fauna, além de contaminação do solo e água (BUTT et al., 2001). À medida que foram sendo evidenciados tais problemas, o interesse pelo uso de microrganismos para o controle de pragas da agricultura aumentou, principalmente a partir da década de 70. O emprego de biopesticidas à base de microrganismos entomopatogênicos têm sido considerado uma opção valiosa principalmente em casos onde os insetos-praga adquirem resistência aos produtos químicos empregados ou quando o custo dos mesmos se torna incompatível com o valor econômico da cultura (BUTT et al., 2001).

Os fungos entomopatogênicos vêm sendo empregados no controle de pragas da agricultura, visto que estes são responsáveis por cerca de 80% das doenças que acometem insetos. O emprego destes microrganismos oferece vantagens ao uso de pesticidas químicos, tais como, especificidade e seletividade, mantendo as populações de insetos não alvo; a não toxicidade e não liberação de produtos poluentes no meio ambiente; o baixo desenvolvimento de resistência dos insetos-alvo, além do seu mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela penetração

ativa nos hospedeiros, não dependendo da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção (ALVES, 1998).

Existem, no entanto, algumas desvantagens quanto ao emprego de fungos como agentes de controle microbiano, dentre as quais, a ação lenta em matar o inseto, os cuidados no armazenamento visando a manutenção da viabilidade e patogenicidade e a necessidade de condições ambientais favoráveis para seu emprego, como temperatura, umidade e luminosidade (ALVES, 1998).

Aproximadamente 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos já foram relatados, sendo que a maioria desses ocorre no Brasil. Dentre estes, destacam-se espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Asckersonia* e *Entomophthora* (ALVES, 1998). O grande interesse na exploração de fungos como agente biocontrolador de pragas é evidenciado pelo número de produtos comercializados e em desenvolvimento (Tabela 1).

Dentre os fungos entomopatogênicos, a espécie *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*Hyphomycetes* – Moniliaceae) merece destaque por ser patogênica a uma grande variedade de insetos indesejáveis (McCOY, 1990). No Brasil existem vários insetos alvos de *B. bassiana* como a broca-do-café, a mosca branca, moleque-da-bananeira, cochonilha, ácaros do mamão, gafanhotos, etc. (FARIA; MAGALHÃES, 2001). *B. bassiana* é de distribuição cosmopolita e vem sendo empregada em escala comercial em alguns países (Tabela 1). No mercado americano esta espécie representa a maioria dos formulados registrados à base de fungos (De NARDO CAPALBO, 1998, BUTT et al., 2001).

Tabela 1 - Fungos entomopatogênicos comercializados ou em processo de comercialização utilizados para o controle biológico (BUTT et al., 2001).

Produto	Fungo	Alvo	Produtor
Mycotal	<i>Verticillium lecanii</i>	Mosca branca	Koppert, Holanda
Vertalec	<i>V. lecanii</i>	Afídeos	Koppert, Holanda
Biogreen	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Larva de escaravelho Em pastagens	Biocare Technology, Austrália
Metaquino	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinhas	Brasil
Bio-Path	<i>M. anisopliae</i>	Gafanhotos	EcoScience, USA
Bio-Blast	<i>M. anisopliae</i>	Cupins	EcoScience, USA
Cobican	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinha da cana-de-açúcar	Probiagro, Venezuela
Conidia	<i>Beauveria bassiana</i>	Broca do café	Live Systems Technology, Colômbia
Ostrinil	<i>B. bassiana</i>	Broca do milho	Natural Plant Protection, França
CornGuard	<i>B. bassiana</i>	Broca do milho europeu	Mycotech, USA
Mycotrol GH	<i>B. bassiana</i>	Gafanhotos	Mycotech, USA
Mycotrol WP & BotaniGard	<i>B. bassiana</i>	Mosca branca, afídeos	Mycotech, USA
Naturalis-L	<i>B. bassiana</i>	Pragas do Algodoeiro	Troy Biosciences, USA
Proecol	<i>B. bassiana</i>	Lagarta	Probiagro, Venezuela
Boverin	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga, URSS
Boverol e Boverosil	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga, Tchecoslováquia
Engerlingspilz	<i>B. bassiana</i>	Besouros	Andermatt, Suíça
Schweizer	<i>Beauveria brongniartii</i>	Besouros	Eric Schweizer, Suíça
Melocont	<i>B. brongniartii</i>	Besouros	Kwizda, Áustria
Green Muscle	<i>Metarhizium flavoviride</i>	Gafanhotos	CABI Bioscience, UK
PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Mosca branca	ECO-tek, USA
Pae-Sin	<i>P. fumosoroseus</i>	Mosca branca	Agrobionsa, México
Laginex	<i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas de mosquito	AgraQuest, USA

2.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS FILAMENTOSOS

A transformação genética compreende um sistema de recombinação a qual promove a incorporação de DNA exógeno no interior de células hospedeiras. Bactérias e leveduras são, provavelmente, os únicos organismos conhecidos que apresentam o processo de transformação natural. Entretanto, células de organismos superiores podem ser transformadas em condições controladas .

Em fungos filamentosos a transformação genética foi descrita pela primeira vez em *Neurospora crassa*, quando protoplastos foram transformados a prototrofia para quinonas com o gene *qa-2⁺* (CASE et al., 1979) e desde então vem sendo descrito para inúmeras espécies.

O processo de transformação em fungos filamentosos compreende três etapas comuns a todos os organismos: preparação de células competentes (capazes de incorporar o DNA exógeno), indução da entrada do DNA exógeno nas células e seleção de células transformadas por pressão seletiva.

As principais metodologias de inserção de DNA transformante em fungos filamentosos compreendem a obtenção de protoplastos, seguido de tratamento com polietilenoglicol (PEG) ou eletroporação, o bombardeamento (biobalística), e mais recentemente, a transformação mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*.

O sistema protoplasto-PEG é a metodologia de transformação mais utilizada e baseia-se na ação do agente fusiogênico PEG e íons cálcio (CaCl_2) sobre protoplastos, originados a partir da digestão enzimática da parede celular de hifas.

A eletroporação baseia-se na ação da corrente elétrica de alta voltagem para formar poros na membrana de protoplastos, facilitando a entrada do DNA transformante. São vários os trabalhos que descrevem este sistema de

transformação em diferentes espécies fúngicas (MAREK et al., 1987; WARD et al., 1988; GOLDMAN et al., 1990; PFEIFER; KHACHATOURIANS, 1992; St. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996; MEYER et al., 2003).

Ambas técnicas demandam a otimização de várias etapas envolvidas na obtenção e regeneração de protoplastos (reversão à hifa normal). Segundo Peberdy (1991) dentre os principais fatores envolvidos na protoplastização têm-se o estado fisiológico das células a serem convertidas em protoplastos, o estabilizador osmótico que proporcione alto rendimento quanto ao número de protoplastos obtidos e alta frequência de regeneração, e o composto lítico utilizado (apresentando preferencialmente atividades proteolítica, quitinolítica e de β -1,3 glucanases).

A biobalística consiste na introdução de microprojéteis de metal pesado (ouro ou tungstênio), recoberto com o DNA transformante, em células hospedeiras com o auxílio de um acelerador de partículas (SANFORD et al., 1987). Como o microprojétil ultrapassa a parede da hifa ou conídio, este método dispensa a obtenção de protoplastos, sendo particularmente valioso para fungos cujos protoplastos são de difícil obtenção e/ou regeneração. Além disso, o projétil pode atingir diretamente o núcleo protegendo o DNA da ação de nucleases citoplasmáticas (BARRETO et al., 1997). Por estes motivos, as frequências de obtenção de transformantes têm sido maiores através da biobalística quando comparadas às do sistema de protoplasto-PEG. Este método tem sido usado com sucesso para transformar diversas espécies de fungos filamentosos (LORITO et al., 1993; HILBER et al., 1994; FUNGARO et al., 1995; HERZOG et al., 1996; CHAURE et al., 2000; SCHILLBERG et al., 2000; SUNAGAWA; MAGAE, 2002; TE'O et al., 2002; MEYER et al., 2003).

Bundock et al. (1995) foram os primeiros a relataram que *Agrobacterium tumefaciens* apresenta a habilidade de transferir uma região de DNA (denominada T-

DNA) não somente para células vegetais, mas também para outros eucariotos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para fungos filamentosos, a transformação mediada por *A. tumefaciens* foi aplicada pela primeira vez por De Groot e colaboradores em 1998. Desde então, têm sido empregada na transformação de diversas espécies fúngicas (GOUKA et al., 1999; CHEN et al., 2000; COVERT et al., 2001; MALONEK; MEINHARDT, 2001; RHO et al., 2001; MIKOSCH et al., 2001; ZWIERS; WAARD, 2001; ROONEY et al., 2001; MULLINS et al., 2001; HANIF et al., 2002; PARDO et al., 2002; SULLIVAN et al., 2002; COMBIER et al., 2003; MEYER et al., 2003; DOBINSON et al., 2003).

A bactéria *A. tumefaciens* é um bacilo aeróbico gram-negativo encontrado no solo e é responsável por causar tumores em células vegetais (KADO, 1991). A formação do tumor, é devida à transferência de uma região de DNA presente em um plasmídeo Ti (“tumor inducing”), conhecida como T-DNA, para a célula vegetal. Esta transferência ocorre sob ação de diversas proteínas cuja expressão é regulada pela presença de compostos fenólicos presentes em exsudatos da planta. No plasmídeo Ti encontram-se os genes *vir* que codificam proteínas Vir envolvidas no processo de infecção e formação do tumor (ZIEMIENOWICZ, 2001).

A região de T-DNA é flanqueada por duas seqüências curtas (aproximadamente 25 pares de bases) denominadas borda esquerda (LB) e borda direita (RB) (SHENG; CITOVSKY, 1996; BRASILEIRO; LACORTE, 2000).

Vários são os estudos realizados para elucidar o processo de transferência do T-DNA em células vegetais o qual envolve as seguintes etapas: quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA ao núcleo e integração no genoma da célula hospedeira (ZIEMIENOWICZ, 2001; GELVIN, 2003).

A expressão das proteínas Vir é regulada transcricionalmente por um sistema duplo que responde ao ambiente químico. A proteína VirA, expressa constitutivamente, possui diversos domínios, sendo um deles relacionado ao monitoramento de compostos fenólicos presentes no meio. Em pH e quantidade ideais de fenóis e açúcares liberados pelas células vegetais infectadas, VirA se torna ativa por autofosforilação, que por sua vez fosforila a proteína VirG. Esta atua como ativador transcricional de todos os genes *vir* – *virABCDEFGH*, através da ligação ao elemento *vir* (uma seqüência de 12 pb presente nas seqüências promotoras desses genes).

Após a indução da expressão dos genes *vir*, a célula bacteriana gera um fragmento de DNA de fita simples flanqueado pelas bordas do T-DNA. A atividade hidrolítica responsável pelo processamento do T-DNA é oriunda da proteína VirD2 e VirD1 (DENG et al., 1999) ocorrendo justamente nas bordas direita e esquerda do T-DNA. Essas proteínas, após gerarem o fragmento de DNA fita simples, permanecem covalentemente ligadas a extremidade 5' deste. Logo em seguida parece haver associação de diversas unidades de VirE2 ao complexo T-DNA-VirD2, o que inibe o ataque de nucleases oriundas da célula vegetal.

A transferência intercelular do complexo recém formado é realizada por intermédio de um *pillus*, formado por proteínas VirB. Uma vez na célula vegetal, o complexo T-DNA-VirD2-VirE2 migra ao núcleo pelos sinais de localização nuclear presentes nas proteínas VirD2 e VirE2. Chegando ao núcleo da célula vegetal, ocorre a integração do T-DNA por recombinação ilegítima, sendo que VirD2 pode ter tanto papel de integrase como de ligase. A expressão dos genes localizados no T-DNA leva à produção de auxinas e citocininas, fito-hormônios responsáveis pela proliferação acentuada do tumor, bem como a síntese de opinas, derivados de

aminoácidos somente metabolizados por *Agrobacterium*, de forma a propiciar um nicho único para a colonização genética pela bactéria (ZIEMIENOWICZ, 2001; GELVIN, 2003).

O plasmídio Ti das linhagens de *A. tumefaciens* utilizadas para transformação “in vitro” não apresenta a região de T-DNA e as bordas (LB e RB), sendo denominado de plasmídio desarmado ou “helper”. Por outro lado, a região do T-DNA é modificada pela remoção dos oncogenes sendo substituídos por marcas de seleção, bem como promotores e outros componentes para a expressão de genes de interesse (a serem expressos na célula hospedeira) e inseridos em um segundo vetor, o qual recebe a denominação de vetor binário. A introdução do vetor binário numa linhagem de *A. tumefaciens* contendo o “plasmídio desarmado” constitui o sistema denominado de vetores binários. Este sistema de transformação tem sido utilizado com sucesso para transformar várias espécies vegetais há aproximadamente três décadas (MIKOSCH et al., 2001).

De Groot et al. (1998) utilizaram esta metodologia na transformação de fungos filamentosos de importância médica e industrial, sendo estas: *Fusarium venenatum*, *Agaricus bisporus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa* e *Trichoderma reesei*. Segundo estes autores a frequência de transformação para *A. awamori* foi cerca de 600 vezes superior utilizando o sistema *Agrobacterium* em relação ao sistema protoplasto-PEG.

No geral, a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* tem resultado em um grande número de transformantes. Covert et al. (2001) utilizaram a linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens* na obtenção de transformantes de *Fusarium circinatum* resistentes ao antibiótico higromicina. Estes autores obtiveram 54 transformantes para cada 10^5 conídios utilizados no co-cultivo. Mullins et al. (2001) também

utilizaram a linhagem AGL1 de *Agrobacterium* para a transformação de *Fusarium oxysporum*. Estes autores obtiveram freqüências de transformação de 300 – 500 transformantes para cada 10^6 conídios. O número de transformantes de *Magnaporthe grisea* obtido via agro-transformação também foi elevado (500 – 1000 transformantes para cada 10^6 conídios) (RHO et al., 2001). Da mesma forma, alta eficiência de transformação foi relatada para *Calonectria morganii* (86 – 130 transformantes para cada 10^7 conídios) (MALONEK; MEINHARDT, 2001). Meyer et al. (2003) relataram um aumento de 140 vezes no número de transformantes obtidos de *Aspergillus giganteus* empregando-se a agro-transformação, quando comparado ao obtido no sistema protoplasto-PEG. A maioria destes autores observaram que tanto o tempo de co-cultivo quanto a razão entre número de conídios:bactéria são fatores fundamentais na eficiência de transformação.

Chen et al. (2000) otimizaram a transformação de *Agaricus bisporus* pelo emprego de vetor binário contendo promotor homólogo *gpd* (gliceraldeído fosfato desidrogenase) e de tecidos da lamela como material a ser transformado. Estes autores obtiveram 30 – 40% de eficiência de transformação.

Na transformação genética mediada por *A. tumefaciens* é comum a ocorrência de integração aleatória de T-DNA em sítios únicos no genoma da célula hospedeira (De GROOT et al., 1998; CHEN et al., 2000; MULLINS et al., 2001; RHO et al., 2001; MALONEK; MEINHARDT, 2001; MEYER et al., 2003) o que têm estimulado o emprego desta metodologia como ferramenta na obtenção de mutantes via mutagênese insercional. Esta forma de integração tem permitido a identificação de seqüências de DNA genômico que flanqueiam o T-DNA pelo emprego da técnica de “TAIL-PCR” (“thermal asymmetrical interlaced-polymerase chain reaction”) (COMBIER et al., 2003; ROLLAND et al., 2003; TSUJI et al., 2003).

Uma outra aplicação do sistema de *A. tumefaciens* na transformação de fungos baseia-se no fato de que se a região de T-DNA conter seqüências homólogas ao genoma do hospedeiro, a integração pode ocorrer por recombinação homóloga. Tal fato foi demonstrado pela primeira vez por Gouka e colaboradores em 1999 e desde então, vetores binários que contêm genes ou seqüências homólogas ao genoma da célula hospedeira têm sido utilizados visando a integração do T-DNA em sítios específicos (GOUKA et al., 1999; ZWIERS ; WAARD, 2001; DOBINSON, et al., 2003).

2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

A transformação genética de fungos entomopatogênicos pode ser útil no desenvolvimento de um bioinseticida. Por exemplo, a incorporação de genes de resistência ou genes repórteres em agentes de controle microbiano pode auxiliar nos estudos de triagem em campo, facilitando a distinção entre os microrganismos aplicados e as populações endógenas, permitindo desta forma, estudos acerca de sua persistência e efetividade no campo. Além disso, representa uma ferramenta adicional nos estudos de virulência permitindo a transferência e o estudo da expressão de genes relacionados a patogenicidade, além da obtenção de mutantes via mutagênese insercional para determinantes de entomopatogenicidade.

Os relatos de transformação genética em fungos entomopatogênicos se concentram principalmente nos gêneros *Metarhizium*, *Paecilomyces* e *Beauveria*.

Para espécies do gênero *Metarhizium* já foram descritos os três principais métodos de transformação: protoplasto-PEG (BERNIER et al., 1989; GOETTEL et al., 1990; BOGO et al., 1996; VALADARES-INGLIS; INGLIS, 1997; FURLANETO et

al., 1999), eletroporação (St. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996) e biobalística (St. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996). No geral, as freqüências de transformação foram baixas quando estes autores utilizaram protoplastos como células-alvo (0,08 – 6,9 transformantes por μg de DNA). Segundo Bogo et al. (1996) as freqüências de transformação variaram de acordo com o método de transformação utilizado, sendo que os melhores resultados foram obtidos pelo emprego da biobalística (32 a 201 transformantes/ μg de DNA).

Já para espécies do gênero *Paecilomyces* as metodologias de transformação genética empregadas foram a de protoplasto-PEG (BARRETO et al., 1997; INGLIS et al., 1999) e a biobalística (BARRETO et al., 1997). As freqüências de transformação obtidas pelo método de protoplasto-PEG foram de 1,9 a 23,0 transformantes/ μg de DNA. Já pelo emprego de biobalística foram relatadas freqüências de transformação de 33 a 153 transformantes/ μg de DNA.

Quanto ao gênero *Beauveria*, existem três relatos de transformação genética para a espécie *B. bassiana* (DABOUSSI et al., 1989; PFEIFER; KHACHATOURIANS, 1992; SANDHU et al., 2001). Através do emprego de protoplastos, na presença de PEG/ CaCl_2 , Daboussi et al. (1989) obtiveram 4 transformantes/ μg de DNA. Já se empregando a eletroporação, Pfeifer e Khachatourians (1992) obtiveram 0,2-0,6 transformantes/ μg de DNA. De acordo com estes autores, a baixa eficiência na transformação foi decorrente da redução na viabilidade dos protoplastos em função da voltagem utilizada durante a eletroporação, além da própria dificuldade de regeneração destes protoplastos. Sandhu et al. (2001) empregaram ambos métodos, protoplasto-PEG e eletroporação, na obtenção de transformantes de *B. bassiana* resistentes ao

fungicida benomil. Estes autores também relataram baixa eficiência de transformação (6 e 10 transformantes/ μg de DNA, respectivamente).

O estabelecimento de uma metodologia eficiente de transformação genética de *B. bassiana* poderá auxiliar no estudo da biologia desta espécie, particularmente no que se refere a sua capacidade de biocontrole. A agro-transformação poderá ser empregada na obtenção de mutantes para fatores de virulência, permitindo um maior entendimento do caráter multifatorial do processo de infecção a insetos-praga.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle Microbiano de insetos**. Piracicaba - FEALQ, 1998. p. 289-381,
- BARRETO, C.C.; ALVES, L.C.; ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, p. 95-99, 1997.
- BERNIER, L.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 60, p.261-266, 1989.
- BOGO, M.R.; VAINSTEIN, M.H.; ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.; SCHRANK, A. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 142, p. 123-127, 1996.
- BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 3, p. 12-15, 2000.
- BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A .; BEIJERSBERGEN, A .; HOOYKAAS, P.J.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 13, p.3206 – 3214, 1995.
- BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents**. Oxford: CABI Publishing, 2001.
- CASE, M.E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S.R.; GILES, N.H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 76, p. 5259-5263, 1979.
- CHAURE, P.; GURR, S.J.; SPANU, P. Stable transformation of *Erysiphe graminis*, an obligate biotrophic pathogen of barley. **Nature Biotechnology**, v. 18, p.205-207, 2000.
- CHEN, X.; STONE, M.; SCHLAGNHAUFER, C.; ROMAINE, P.C. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.4510-4513, 2000.
- COMBIER, J.-P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 141-148, 2003.
- COVERT, S.F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C.J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, v. 105, p. 259-264, 2001.

- DABOUSSI, M.J.; DJEBALLI, A.; GERLINGER, C.; BLAISEAU, P.L.; BOUVIER, I.; CASSAU, M.; LEBRUN, M.H.; PARISOT, D.; BRYGOO, Y. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v. 15, p. 453-456, 1989.
- De GROOT, M.J.A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p.839-842, 1998.
- De NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: **Controle Biológico**. MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Jaguariúna : EMBRAPA, 1998. p. 231-262.
- DENG, W.; CHEN, L.; PENG, W.T.; LIANG, X.; SEKIGUCHI, S.; GORDOM, M.P.; COMAI, L.; NESTER, E.W. Vir E1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 1795-1807, 1999.
- DOBINSON, K.F.; GRANT, S.J.; KANG, S. Cloning and target disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. **Current Genetics**, v. 45, p. 104-110, 2004.
- FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 22, p. 18-21, 2001.
- FUNGARO, M.H.P.; RECH, E.; MULHEN, G.S.; VAINSTEIN, M. H.; PASCON, R.C.; QUEIROZ, M.V.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J.L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, p. 293-298, 1995.
- FURLANETO, M.C.; PAIÃO, F.G.; PINTO, F.G.S.; FUNGARO, M.H.P. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* to high resistance to benomyl. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 875-878, 1999.
- GELVIN, S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 16-37, 2003.
- GOETTEL, M.S.; St. LEGER, R.J.; BHAI, S.; JUNG, K.; OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. **Current Genetics**, v. 17, p.129-132, 1990.
- GOLDMAN, G.H.; Van MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELA, A. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage pulse. **Current Genetics**, v. 226, p. 169-174, 1990.
- GOUKA, R.J.; GERK, C.; HOOYKAAS, P.J.J.; BUNDOCK, P.; MUSTERS, W.; VERRIPS, C.T.; De GROOT, M.J.A. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 598-601, 1999.

HANIF, M.; PARDO, A.G.; GORFER, M.; RAUDASKOSKI, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. **Current Genetics**, v. 41, p. 183-188, 2002.

HERZOG, R.W.; DANIELL, H.; SINGH, N.K.; LEMKE, P.A. A comparative study on the transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment of conidia and a more conventional procedure using protoplasts treated with polyethyleneglycol. **Applied and Microbiological Biotechnology**, v. 45, p. 333-337, 1996.

HILBER, U.W.; BODMER, M.; SMITH, F.D.; KÖLLER, W. Biobalistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. **Current Genetics**, v. 25, p. 124-127, 1994.

INGLIS, P.W.; TIGANO, M.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. Transformation of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to benomyl resistance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 119-123, 1999.

KADO, C.I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Science**, v.10, p.1-32, 1991.

LORITO, M.; HAYES, C.K.; DI PIETRO, A.; HARMAN, G.E. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. **Current Genetics**, v. 24, p. 349-356, 1993.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morgani*. **Current Genetics**, v. 40, p.152-155, 2001.

MAREK, E.M.; RICHEY, M.G.; SMITH, D.A. Transformation of fungal protoplasts by electric pulse treatment. **Phytopathology**, v. 77, p. 1740, 1987.

McCOY, C.W. Entomogenous fungi as microbial pesticides. In: BAKER, R. R.; DUNN, P. E. **New Directions in Biological Control**. New York: Alan R. Liss, 1990. p. 139-159

MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current Genetics**, v. 43, p. 371-377, 2003.

MIKOSCH, T.S.P.; LAVRIJSEN, B.; SONNENBERG, A.S.M.; GRIENSVEN, L.J.L.D. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, v. 39, p. 35-39, 2001.

MULLINS, E.D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D.M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, p. 173-180, 2001.

PARDO, A.G.; HANIF, M.; RAUDASKOSKI, M.; GORFER, M. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Mycological Research**, v. 106, p. 132-137, 2002.

PEBERDY, J. F. Fungal protoplast. In: BENNETT, JW, LASURE, L.L. **More Gene Manipulations in Fungi**. London: Academic Press, 1991. p. 307-318.

PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G., *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 376-381, 1992.

RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, Y. H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, v.12, p.407-411, 2001.

ROLLAND, S.; JOBIC, C.; FÈVRE, M.; BRUEL, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, v. 44, p. 164-171, 2003.

ROONEY, P.J.; SULLIVAN, T.D.; KLEIN, B.S. Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis*: evidence for transcriptional regulation by a conserved mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 875-889, 2001.

SANDHU, S.S.; UNKLES, S.E.; RAJAK, R.C.; KINGHORN, J.R. Generation of benomyl resistant *Beauveria bassiana* strains and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, p. 254-250, 2001.

SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

SCHILLBERG, S.; TIBUZY, R.; FISCHER, R. Transient transformation of the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Molecular and General Genetics**, v. 262, p.911-915, 2000.

SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1699-1710. 1996.

St. LEGER, R.J.; SHIMIZU, S.; LORESH, J.; BIDOCHKA, M.J. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using gene-gun to produce stable GUS transformants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 289-294, 1995.

SULLIVAN, T.D.; ROONEY, P.J; KLEIN, B.S. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. **Eukaryotic Cell**, v. 1, p. 895-905, 2002.

SUNAGAWA, M.; MAGAE, Y. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 211, p. 143-146, 2002.

TE´O, V.S.J.; BERGQUIST, P.L.; NEVALAINEN, K.M.H. Biolistic transformation of *Trichoderma reesei* using the Bio Rad seven barrels Hepta Adaptor system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 393-399, 2002.

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 69, p. 230-239, 2003.

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

WARD, M.; KODAMA, K.H.; WILSON, L.J. The oliC gene of *Aspergillus niger* isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. **Current Genetics**, v. 28, p. 37-42, 1988.

ZIEMIENOWICZ, A.; MERKLE, T.; SCHOUMACHER, F.; HOHN, B.; ROSSI, L. Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. **Plant Cell**, v. 13, p. 369-383, 2001.

ZWIERS, L.; WAARD, M.A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetics**, v. 39, p.388-393, 2001.

***Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the
entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana***

Maria Cecília dos Reis¹; Maria Helena Pelegrinelli Fungaro²; Rubens Tadeu Delgado
Duarte¹, Luciana Furlaneto³, Marcia Cristina Furlaneto^{1*}

ABSTRACT:

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (agro-transformation) was successfully applied to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Conidia of *B. bassiana* were transformed to hygromycin B resistance using the *hph* gene of *Escherichia coli* as the selective trait, under the control of a heterologous fungal promoter and the *Aspergillus nidulans trpC* terminator. The efficiency of transformation was up to 28 and 96 transformants per 10⁴ and 10⁵ target conidia, respectively, using three distinct vectors. High mitotic stability of the transformants (80-100%) was demonstrated after five successive transfers on non-selective media. Abortive transformants were observed for all the *hph*^r vectors used. Putative transformants were analysed for the presence of the *hph* gene by PCR and Southern analysis. The latter analysis revealed the integration of two or more copies of the *hph* gene in the genome. The agro-transformation method was found to be effective for the isolation of *B. bassiana* hygromycin resistant transformants and may represent a useful tool for insertional mutagenesis studies in this fungus.

Keywords: *Agrobacterium*-mediated transformation, *Beauveria bassiana*, Hygromycin B resistance

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 6001, 86051-990 Londrina -PR, Brazil - mcfurlan@sercomtel.com.br

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina.

³ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná.

1 INTRODUCTION

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin is widely regarded as one of the most promising species known in the development of practical insect biological control agents (McCoy, 1990; Butt et al., 2001).

The lack of a practical gene transfer system has been the main obstacle precluding the use of molecular approaches for the genetic improvement of entomopathogenic fungi. The most common method for fungal transformation is based upon the isolation of protoplasts, which is time-consuming and requires optimisation for each species (Fincham, 1989). In general, the transformation frequencies achieved with protoplasts are usually low for entomogenous fungi (Daboussi et al., 1989; Goettel et al., 1990; Pfeifer and Khachatourians, 1992; Bogo et al., 1996; Furlaneto et al., 1999; Inglis et al., 1999; Sandhu et al., 2001), which hampers the application of molecular methods such as gene isolation and gene disruption.

Currently, two transformation methods have been reported for *B. bassiana*. Daboussi et al. (1989) used a conventional method employing polyethylene glycol (protoplast-PEG method) and the nitrate reductase gene as selective trait. These authors obtained 4 transformants per μg plasmid DNA per 10^7 protoplasts, while Pfeifer and Khachatourians (1992) used electroporation to transform protoplasts to benomyl resistance. These authors described a transformation efficiency of 0.2 to 0.6 transformants per μg plasmid DNA per 10^7 protoplasts. Benomyl-resistant transformants were also obtained by Sandhu et al. (2001). According to these authors, the transformation frequency was low for both methods employed,

protoplast-PEG and electroporation, i.e. 6 and 10 transformants per μg plasmid DNA per ml viable protoplast, respectively.

De Groot et al. (1998) was the first to apply an alternative transformation procedure for filamentous fungi based on *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) (agro-transformation). One of the principal advantages of agro-transformation over conventional transformation techniques is the versatility it provides in using fungal conidia as starting material to be transformed. To date, the *A. tumefaciens*-mediated transformation method has been successfully applied to transform many fungal species (Gouka et al., 1999; Chen et al., 2000; Covert et al., 2001; Rho et al., 2001; Malonek and Meinhardt, 2001; Mikosch et al., 2001; Mullins et al., 2001; Hanif et al., 2002; Pardo et al., 2002; Sullivan et al., 2002; Combier et al., 2003; Meyer et al., 2003). For *Aspergillus* species, the *A. tumefaciens*-mediated transformation system resulted in an increase in transformation frequency compared to other transformation techniques (De Groot et al., 1998; Meyer et al., 2003). Furthermore, agro-transformation represents a high-potential tool for insertional mutagenesis since a common fate of the T-DNA is integration at random chromosomal sites in the host genome (De Groot et al., 1998; Chen et al., 2000; Mullins et al., 2001; Rho et al., 2001, Meyer et al., 2003).

In this paper, we describe a successful procedure for the genetic transformation of conidia from *B. bassiana* by applying an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. The improved transformation efficiency obtained here would be helpful for the application of some molecular methods such as gene expression and gene disruption.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Strains and plasmids

The *B. bassiana* isolate CG26 was obtained from the Cenargen/Embrapa collection of entomopathogenic fungi (Cenargen. Brasília/DF - Brazil. Cx.P. 02372). *Agrobacterium tumefaciens* hypervirulent strain AGL-1 was kindly provided by Dr. C. Peter Romaine (The Pennsylvania State University). Plasmids pPK2 (Covert et al., 2001) and pBTS4 (Rooney et al., 2001) contain a T-DNA harbouring a hygromycin B resistance cassette from pAN7-1 driven by the *Aspergillus nidulans gpd* promoter and *trpC* terminator (Punt et al., 1987). These vectors were kindly provided by Dr. Sarah Covert (Georgia University) and Dr. Tom Sullivan (Wisconsin Medical School University), respectively. The vector pBGgHg which contains a T-DNA harbouring a hygromycin resistance gene (*hph*) from pAN7-1 under the control of the *Agaricus bisporus gpd* promoter (Chen et al., 2000) was kindly provided by Dr. C. Peter Romaine.

2.2 A tumefaciens-mediated transformation

Initially, *A. tumefaciens* strain AGL-1 was transformed with the binary vectors by a heat-shock method (Bowyer, 2001). *A. tumefaciens* transformants were isolated on LB agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar, pH 7.0) plates supplemented with 50 µg/ml of kanamycin and 50 µg/ml of streptomycin. Transformation of *B. bassiana* was carried out as described by Covert et al. (2001) with modifications. Cells of the *A. tumefaciens* strain AGL-1 carrying the binary

plasmid vectors were grown at 28°C for 18 h in liquid LB medium that was supplemented with kanamycin (50 µg/ml) and streptomycin (50 µg/ml). The culture was diluted to an optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of 0.15 in 20 ml of induction medium (IM) (10 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 2.5 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.7 mM CaCl₂, 9 µM FeSO₄, 4 mM NH₄SO₄, 10 mM glucose, 40 mM 2- [N-morpholino] ethanesulfonic acid, pH 5.3, 0.5% glycerol (w/v), 200 µM acetosyringone). The cells were grown under the same conditions until an OD₆₆₀ of 0.6-0.8 was reached before mixing them with an equal volume of a conidial suspension of the *B. bassiana* strain CG26 (1x10⁵ or 1x10⁶ conidia/ml). This mix (200 µl) was plated on nitro-cellulose filters (0.45 µm pore and 90 mm diameter, MFS-Japan) on a co-cultivation medium (same as IM, except containing 5 mM instead of 10 mM glucose). Following co-cultivation for 48 h, the membranes were transferred to M-100 (Stevens, 1974) plates that contained hygromycin B (600µg/ml) as the selection agent for fungal transformants and mefoxin (300 µg/ml) in order to eliminate the *A. tumefaciens* cells. Putative transformants, visible 7 days later, were transferred to M-100 + 600µg/ml of hygromycin B. Control experiments were carried out in the absence (IM-AS) of acetosyringone (AS).

2.3 Mitotic stability of transformants

To determine the stability of the transformants, putative transformants obtained from each vector were successively cultured on M-100 for five generations in the absence of hygromycin B, after which transformants were transferred to M-100 containing hygromycin B (600µg/ml).

2.4 Molecular analysis of transformants

Genomic DNA from *B. bassiana* was prepared as described by Azevedo et al. (2000). Standard procedures for restriction endonuclease digestion, agarose gel electrophoresis and Southern blotting were carried out as described by Sambrook and Russel (2001). DNA probe labelling and hybridisation were performed under conditions recommended for the digoxigenin (DIG) hybridisation system by Roche (Mannheim, Germany). PCR analysis for detection of the *hph* gene in putative transformants was performed using the primer pair *hph1* (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') and *hph2* (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG-3'). The PCR amplification protocol consisted of an initial denaturing cycle of 4 min at 95°C, followed by 35 cycles with 45 s denaturation (92°C), 1 min annealing (60°C) and 1.5 min polymerisation (72°C) as described by Malonek and Meinhardt (2001).

3 RESULTS AND DISCUSSION

In an attempt to enhance transformation efficiency for *B. bassiana* by circumventing the need for protoplast isolation, we tested in this study the applicability of the agro-transformation method using conidia as starting material.

Growth inhibition of *B. bassiana* CG26 was tested by inocula of conidia on M-100 medium supplemented with hygromycin at different concentrations, i.e. 0, 200, 400, 600 and 800 $\mu\text{g/ml}$. Complete inhibition of conidia germination was observed with 600 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin (minimal inhibitory concentration). Thus, this concentration was considered suitable for the selection of resistant colonies in transformation experiments.

Incubation of conidia with *Agrobacterium* transformed with binary vectors, which contain the hygromycin-resistance cassette between the left border and the right border of the T-DNA, led to the formation of hygromycin-resistant colonies if the co-cultivation was performed in medium containing acetosyringone (AS, a compound that induces the expression of virulence genes in *A. tumefaciens*) (Table 1). Under non-inducing conditions (absence of AS), background growth of untransformed colonies was minimal. This is consistent with previous reports that show the essential role of AS for fungal transformation (de Groot et al., 1998; Mullins et al., 2001; Rho et al., 2001; Meyer et al., 2003).

Two types of transformed colonies appeared after 7 days on selective medium (M-100 + AS at 600 $\mu\text{g/ml}$). There were colonies that developed normally on selective medium producing conidia, which represented 78% (pPK2), 76% (pBTS4) and 62% (pBGgHg) of the total colonies tested (221, 224 and 211 colonies, respectively). Other colonies apparently resistant to hygromycin but not able to replicate after

subculturing in selective medium were considered “abortive” transformants. The occurrence of abortive transformants has been previously described in fungi transformed using intact conidia (Hilber et al., 1994; Fungaro et al., 1995), although it has been previously attributed to the use of mycelium as the material for transformation (Wernars et al., 1987).

The transformation frequencies achieved from three independent transformation experiments (Table 1) were higher than that described previously for *B. bassiana* using protoplasts (Daboussi et al., 1989; Pfeifer and Khachatourians, 1992; Sandhu et al., 2001), particularly if the number of target cells (conidia) is considered. An increase of 1.7- to 4.6-fold in transformation efficiency was observed when 1×10^5 conidia were used instead of 1×10^4 conidia, showing a non-linear relationship between the number of conidia exposed to *A. tumefaciens* and the number of resulting transformants.

When using strains of *A. tumefaciens* containing different constructs of the binary vector to transform *B. bassiana*, the yield of resistant transformants was similar (Table 1), suggesting that the promoter present in the vectors can function in *B. bassiana*. However, agro-transformation employing the vector pBGgHg which contains the *hph* gene under the control of the *gpd* promoter from *Agaricus bisporus*, resulted in a lower percentage of both mitotically stable transformants and colonies that developed normally after subculturing in selective medium, compared to the results obtained with other vectors containing the hygromycin resistance cassette driven by the *Aspergillus nidulans gpd* promoter.

Some 75 putative transformants obtained from each vector were repeatedly transferred to non-selective medium in order to investigate the mitotic stability of the integrated T-DNA. Following five rounds of growth on non-selective medium (without

hygromycin B), clones were transferred to selective medium. High frequencies of mitotic stability were observed (Table 1). Transformants never formed sectors with different growth rates or different colony morphology (data not shown). These mitotic stabilities compare favorably with those obtained for several filamentous fungi using *Agrobacterium*-mediated transformation (Covert et al., 2001; Rho, et al., 2001; Meyer et al., 2003).

A total of 11 putative *B. bassiana* transformants obtained from transformation using all three binary vectors were screened by PCR analysis. Using the *hph1* and the *hph2* oligonucleotide primers, it was possible to amplify a PCR product of the expected size (600 bp) from all the transformants tested (Fig. 1).

In order to determine the copy number of the transforming T-DNA, Southern blot analysis with eight transformants was performed. Genomic DNA from transformants was digested with *SstI* and probed with a *hph* fragment. *SstI* cuts T-DNA once, outside of the *hph* gene, and therefore multiple hybridising bands would be indicative of multiple T-DNA copies. As shown in Fig. 2, the T-DNA integrated at two or multiple sites in the genome. It has been reported that the mode of T-DNA integration in the *Agrobacterium* transformation system is determined by the host cell (Bundock, 1999). In our case, the occurrence of transformants with more than one copy of T-DNA may be due to the transformation conditions utilized, i.e., a co-cultivation time of 48 h and pre-treating bacterial cells with AS prior to co-cultivation as described by Rho et al. (2001). According to these authors, the percentage of transformants of *Magnaporthe grisea* that carried a multiple copy of T-DNA per genome increased under similar transformation conditions.

In our agro-transformation system we efficiently transformed conidia of *B. bassiana*. This method offers considerable advantages over traditional protoplast-

mediated transformation. These include circumventing the production and use of osmotically sensitive and often multinucleate protoplasts. Furthermore, studies concerning the target of T-DNA integration could help in the investigation of gene function and disruption. Contrary to bacterial vectors that are used in conventional transformation methods, usually only the T-DNA is incorporated into the host genome making it possible to recover T-DNA flanking sequences by PCR-based techniques. Considering the efficiency and flexibility of the agro-transformation protocol, this appears to be a highly efficient alternative to other insertional mutagenesis techniques in characterising virulence genes of *B. bassiana*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq and CPG/UEL - Brazil. R.T.D.D. is fellowship-holder of CAPES-Brazil. The authors thank Dr. Albert Leyva for reading the manuscript.

REFERENCES

- Azevedo, A.C.S., Furlaneto, M.C., Sosa-Gómez, D.R., Fungaro, M.H.P., 2000. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. *Sci. Agric.* **57**, 729-732.
- Bogo, M.R., Vainstein, M.H., Aragão, F.J.L., Rech, E., Schrank, A., 1996. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**, 123-127.
- Bowyer, P., 2001. DNA-mediated transformation of fungi. In: Talbot, N. (Ed.), *Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi*. Oxford University Press, pp. 33-46.
- Bundock, P., Mroczek, K., Winkler, A.A., Steensma, H.Y., Hooykaas, P.J.J., 1999. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 115-121.
- Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N., 2001. *Fungi as biocontrol agents*. CABI Publishing, Wallingford, Oxford.
- Chen, X., Stone, M., Schlaghaufer, C., Romaine, C.P., 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4510-4513.
- Combier, J.P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G., Marmeisse, R., 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 141-148.
- Covert, S.F., Kappor, P., Lee, M., Briley, A., Nairn, C.J., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol. Res.* **105**, 259-264.

- Daboussi, M.J., Djeballi, A., Gerlinger, C., Blaiseau, P.L., Bouvier, I., Cassan, M., Lebrun, M.H., Parisot, D., Brygoo, Y., 1989. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 15, 453-456.
- De Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., Beijersbergen, A.G.M., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 16, 839-842.
- Fincham, J.R.S., 1989. Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* 53, 148-170.
- Fungaro, M.H.P., Rech, E., Muhlen, G.S., Vainstein, M.H., Pascon, R.C., Queiroz, M.V., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 1995. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 293-298.
- Furlaneto, M.C., Paião, F.G., Pinto, F.G.S., Fungaro, M.H.P., 1999. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* to high resistance to benomyl. *Can. J. Microbiol.* 45, 875-878.
- Goettel, M.S., St. Leger, R.J., Bhairi, S., Jung, M.K., Oakley, B.R., Roberts, D.W., Staples, R.C., 1990. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. *Curr. Genet.* 17, 129-132.
- Gouka, R.J., Gerk, C., Hooykaas, P.J.J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C.T., De Groot, M.J.A., 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat. Biotechnol.* 17, 598-601.
- Hanif, M., Pardo, A.G., Gorfer, M., Raudaskoski, M., 2002. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Curr. Genet.* 4, 183-188.
- Hilber, U.W., Bodmer, M., Smith, F.D., Koller, W. 1994. Biolistic transformation of *Botryotinia fuckeliana*. *Curr. Genet.* 25, 124-127.

- Inglis, P.W., Tigano, M.S., Valadares-Inglis, M.C., 1999. Transformation of the entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) to benomyl resistance. *Genet. Mol. Biol.* 22, 119-123.
- Malonek, S., Meinhardt, F., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. *Curr. Genet.* 40, 152-155.
- McCoy, C.W., 1990. Entomogenous fungi as microbial pesticides. In: Baker, R.R., Dunn, P.E. (Eds.), *New Directions in Biological Control*. Liss, A.R., New York, pp. 139-159.
- Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T., Stahl, U., 2003. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* 43, 371-377.
- Mikosch, T.S.P., Lavrijssen, B., Sonnenberg, A.S.M., van Griensven, L.J.L.D., 2001. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Curr. Genet.* 39, 35-39.
- Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, C.P., Raina, R., Geiser, D.M., Kamg, S., 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91, 173-180.
- Pardo, A.G., Hanif, M., Raudaskoski, M., Gorfer, M., 2002. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycol. Res.* 106, 132-137.
- Pfeifer, T.A., Khachatourians, G.G., 1992. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 376-381.

- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemanse, M.A., Pouwels, P.H., van den Hondel, C.A.M.J.J., 1987. Transformation of *Aspergillus nidulans* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56, 117-124.
- Rho, H.S., Kang, S., Lee, H.Y., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cells* 12, 407-411.
- Rooney, P.J., Sullivan, T.D., Klein, B.S., 2001. Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis*: evidence for transcriptional regulation by a conserved mechanism. *Mol. Microbiol.* 39, 875-889.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sandhu, S.S., Unkles, S.E., Rajak, R.C., Kinghorn, J.R., 2001. Generation of benomyl resistant *Beauveria bassiana* strains and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. *Biocontrol Sci. Techn.* 11, 254-250.
- Stevens, R., 1974. *Mycology Guidebook*. University of Washington Press, Seattle.
- Sullivan, T.D., Rooney, P.J. Klein, B.S., 2002. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. *Eukaryot. Cell.* 1, 895-905.
- Wernars, K., Goosen, T., Wennekes, B.M.J., Swart, K., van den Hondel, C.A.M.J.J., van den Broek, H.W.J., 1987. Cotransformation of *Aspergillus nidulans*: a tool for replacing fungal genes. *Mol. Gen. Genet.* 209, 71-77.

Table 1. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* conidia by use of hygromycin selection and mitotic stability of transformants.

Plasmid present in <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> strain AGL-1	Number of Hyg ^r colonies obtained after co-cultivation in the presence of acetosyringone (AS) ^a		Percentage of mitotically stable transformants ^c
	$10^{4(b)}$	$10^{5(b)}$	
	pBTS4	22 ± 14.9	
pPK2	27.4 ± 25	46.4 ± 4.7	95
pBGgHg	12.3 ± 3	58 ± 33.8	80

^a Each result is the mean of three independent experiments ± standard error of the mean; ^b number of target conidia/co-cultivation; ^c Mitotic stability was based on growth in presence of hygromycin (600µg/ml) after five serial transfers on non-selective medium (M-100).

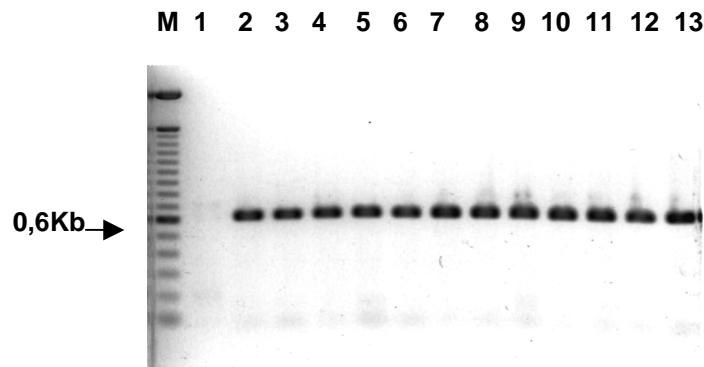


Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR) of *B. bassiana* wild-type DNA (lane 1) and randomly selected hygromycin-resistant transformants obtained with the binary vectors pPK2 (lanes 2-5), pBTS4 (lanes 6-9) and pBGgHg (lanes 10-12) and positive control with vector pAN7-1 (lane 13). PCR analysis was carried out using genomic DNA and primers hph1 and hph2 amplifying a 0.6 Kb fragment. M, DNA molecular size markers (kilobases) is indicated on the left.

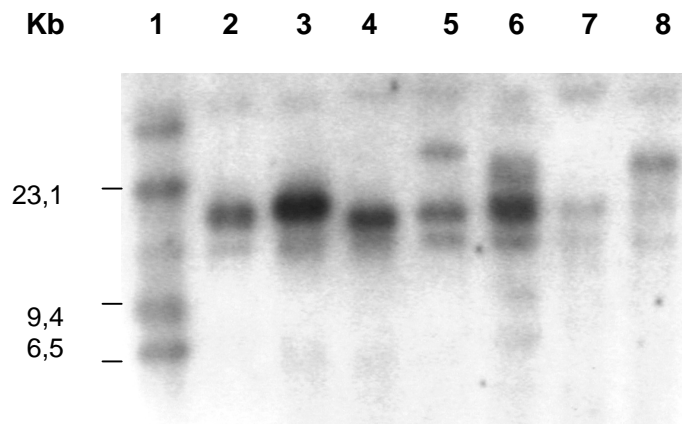


Fig. 2. Southern blot analysis of 8 randomly selected *B. bassiana* transformants. Genomic DNA (5 μ g) was digested with SstI which cuts once in the T-DNA, gel size-fragmented and transferred to a nitro-cellulose membrane. Lanes 1 to 8, DNA from putative transformants AT1 to AT8, respectively. Hybridisation was performed using a 1.5 Kb DNA probe covering part of the *hph^R* gene and *trpC* terminator region of plasmid pAN7-1. Molecular mass in Kb is indicated on the left.

CONCLUSÕES

- A linhagem AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* foi efetiva na transferência de T-DNA para o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*;
- A obtenção de transformantes de *B. bassiana* via *A. tumefaciens* é dependente da presença de acetoseringone;
- Na agro-transformação de *B. bassiana* não existe uma relação linear entre o número de conídios utilizados no co-cultivo e o número de transformantes obtidos;
- A maioria dos transformantes testados apresentam estabilidade quanto ao fenótipo de resistência a higromicina após 5 ciclos mitóticos.
- Nas condições de transformação aplicadas, a integração do T-DNA no genoma dos transformantes ocorreu em duas ou mais cópias.