

58 Desarrollo de un sistema de transformación genética en *Paracoccidioides brasiliensis*

Claudia Leal^{1,2}, Ana Mesa³, Luis Gómez²,
Mauricio Corredor², Juan Mcewen^{2,3}.

PALABRAS CLAVE

PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS
HIGROMICINA
TRANSFECCIÓN
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La transformación genética es una alternativa para el conocimiento de genes involucrados en la patogenicidad de los hongos. A la fecha se han transformado algunos hongos utilizando técnicas como luz ultravioleta para obtener mutantes auxotróficas. Así mismo, se ha empleado la transformación basada en la introducción de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos bien sea por medio de electroporación o imitando un evento que se presenta naturalmente entre plantas y el bacilo gram negativo *Agrobacterium tumefaciens* y que consiste en la transferencia del T-DNA del plásmido Ti bacteriano a la célula vegetal, con la consecuente aparición de un tumor en el tallo de la planta. Este mecanismo se ha reproducido con éxito en hongos filamentosos y en levaduras. En el caso de *Paracoccidioides brasiliensis* aún no se dispone de un modelo de transformación. Considerando esta carencia y la necesidad de conocer los genes involucrados en la patogenicidad de este microorganismo, pretendemos desarrollar un sistema de transformación genética para *P. brasiliensis* utilizando *A. tumefaciens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas: *P. brasiliensis* ATCC-60855, *Pb-339*, *A. Tumefaciens*: GV-1040, LBA 4404, EHA 101, Plásmidos: pAD-1624, pAD-1625, pBI-

121. Estos plásmidos, que contienen clonados dentro del T-DNA genes cassette con la higromicin fosfotransferasa (hph), se introdujeron en las cepas de *A. tumefaciens* por electroporación y se seleccionaron los transformantes.

Transformación de *P. brasiliensis*: las cepas de *A. tumefaciens* se cultivaron toda la noche en 2 ml de LB-tetraciclina-ampicilina en agitación a 28°C; este cultivo fue diluido 15 a 20 veces en LB por 24 horas hasta una D.O.₆₀₀ 0.5-1.0. Las bacterias centrifugadas a 4.000 rpm 10 minutos, se resuspendieron en LB+MES. Las levaduras se mezclaron con las bacterias en filtros de nitrocelulosa a diferentes diluciones y se incubaron a 28°C por 48 h.

Selección de transformantes: Postincubación los filtros se lavaron con 1 ml de solución salina y se sembraron en BHI-cefotaxime-higromicina a 37°C hasta que aparecieron colonias.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Postcoccultivo se obtuvieron células transformadas mitóticamente estables. El DNA genómico se analizará por PCR y Southern Blot usando primers específicos para el gen hph.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABUODEH RO, ORBACH MJ, MANDEL MA, DAS A, GALGANI JN. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Infect Dis* 2000; 181: 2.106-2.110.
2. MCCORMAC AC, ELLIOT MC, CHEN DF. A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Molecular Biotechnology* 1998; 9: 155-159.
3. WOODS JP, HEINECKE EL, GOLDMAN WE. Electrotransformation and expresion of bacterial genes encoding hygromycin phosphotransferase and b-galactosidase in the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1998; 66: 1.697-1.707.

.....
clavilet@yahoo.com

¹ Estudiante de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana

² Unidad de Biología Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB)

³ Profesor, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia