PROTOCOLO DE TRANSFORMACION DE *Trichoderma*

**Obtención de germínulas**

Inocular 100ml de medio GYEC ó PDB con 1x108 conidias (1x106 conidias/ml) en incubar a 28°C DURANTE 16 a 20 hrs. Con agitación constante.

GYEC:

1.5 g de glucosa

0.3 g de extracto de levadura

0.5 g de hidrolizado de caseína

**Nota:**

1.-Las esporas inoculadas deberán ser lo mas recientes posibles no mas de una semana de cosechadas.

**Preparación de protoplastos.**

Colectar el micelio por filtración en un embudo con magitel estéril y lavar con agua destilada estéril (50ml). Recuperar el micelio con una espátula estéril y pesar en una caja Petri tarada 0.2-0.5 g de micelio. Esta cantidad de micelio se coloca en un tubo falcon de 50 ml conteniendo 6 ml de extracto enzimático de trichoderma. Inmediatamente después al mezclar el micelio con las enzimas aplicar vortex levemente para disgregar el micelio.

Colocar el tubo falcon bien cerrado en agitación (100 rpm) durante 2 ó 3 hrs. A temperatura ambiente.

La formación de protoplastos se monitorea al microscopio.

**Solución Osmótica:**

Para 100 ml de solución

50 Mm CaCl2 0.7388 g

0.5 M manitol 9.11 g

59 Mm MES 0.981 g

Se debe ajustar el pH. a 5.5 con KOH y se esteriliza en autoclave.

**Extracto enzimático**:

Pesar 60 mg del extracto enzimático de Trichoderma y resuspenderlo en 6ml de solución osmótica, una vez que se hayan solubilizado las enzimas esterilizar por filtración. En esta solución es donde se coloca el micelio.

**Recuperación de protoplastos.** La suspensión de protoplastos con micelio se filtra utilizando dos filtros miracloth (tamaño de poro 100 y 50 µm) el de 100 se pone arriba y por debajo el de 50 ambos sobre un tubo falcon estéril de 50 ml se lava el micelio con 2 ml de solución osmótica.

La suspensión de protoplastos una vez filtrada se alícuota en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugan 10 min/8000 rpm, el sobrenadamente se desecha por decantación y la pastilla de protoplastos se resuspende mezclando muy suave en un volumen mínimo de solución osmótica. Los protoplastos cuantifican en el microscopio usando una cámara de Neubauer. La concentración de protoplastos debe quedar entre 107-108.

**Transformación**

Hacer las siguientes mezclas como se indica a continuación:

**Reacción de Transformación**

240 µl de protoplastos

20 µl de plásmido (10-20 µg de DNA resuspendido en solución osmótica)

**Control**

240 µl de protoplastos

20 µl de solución osmótica

Colocar los tubos de 1.5ml con las mezclas indicadas en hielo durante 20 min., después agregar 260 µl polietilenglicol (4000-8000 wt) al 40% el cual estuvo previamente calentándose a 42 °C, mezclar muy suave por inversión e incubar 30 min a temperatura ambiente.

**Nota**: Importante el polietilenglicol se prepara en solución osmótica y se esteriliza

Los protoplastos transformados se colocan en un tubo falcon de 15ml con 7-10 ml de agar suave y se dispersa sobre una placa de PDA selectivo e incuban a 28°C durante 5 días aprox.

**Nota:** los protoplastos de cada transformación se dividen en al menos dos placas para una mejor distribución de las posibles transformantes.

Para el control positivo se debe preparar una placa de PDA con sorbitol pero sin higromicina y el agar suave tampoco deberá llevar higromicina.

Para el control negativo tanto la placa como el agar suave deberán llevar higromicina.

La importancia de ambos controles radica en que nos permiten evaluar (1) la viabilidad de los protoplastos hasta el final del proceso de transformación (2) y que las transformantes que crecen en higromicina son debidas a la adición del plásmido.

**PDA selectivo**

para 250 ml

9.75 g PDA

22.75 g sorbitol

500 µg de higromicina

El antibiótico se adiciona después de esterilizar el medio de cultivo (PDA + sorbitol)

**PDB suave**

Para 100 ml

2.4 g de PDB

18.2 g sorbitol

0.7 g agar bacteriológico

200 µg de higromicina