

# Caracterização da Diversidade Genética de Isolados de *Beauveria Bassiana* por RAPD

---

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

---

CARNEIRO, ANDRÉA A., GOMES, ELIANE A., NONATO, LUCIANE F.V., BRITTO, WELLERSON M.A., TAVARES, FERNANDO F., GUIMARÃES, CLAUDIA T. e CRUZ, IVAN.

Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 - Sete Lagoas-MG, 35701-970 andreac@cnpmc.embrapa.br

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, RAPD, diversidade genética, fungos entomopatogênicos

## Introdução

*Beauveria bassiana* é um deuteromiceto cosmopolita, com alta patogenicidade e grande abrangência entomopatogênica. Atualmente, esse fungo vem sendo estudado em todo o mundo como um micoinseticida (Riba e Silvy, 1989), sendo já comercializado como pó solúvel de conídios para uso agrícola e doméstico (Hastuti et al., 1999). Muitos estudos têm mostrado que certos isolados de *B. bassiana* são eficazes no controle de lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* ou lagarta do cartucho, uma praga-chave tanto na cultura do milho (*Zea mays* L.) quanto em outras culturas anuais (Cruz, 1995).

O controle de *S. frugiperda* no milho tem utilizado produtos químicos, que são aplicados com o aparecimento dos primeiros sintomas de danos na cultura.

Entretanto, o uso constante desses produtos, tem gerado problemas, como o desenvolvimento de resistência e a redução da ocorrência de inimigos naturais. Assim, o desenvolvimento de medidas de controle mais ecológicas pode contornar tais problemas.

O mecanismo de infecção de *B. bassiana* é o mesmo para todos os insetos. O fungo penetra na cutícula dos insetos, através de uma combinação de pressão e degradação enzimática (Ferron 1978). Após atravessar o integumento, o patógeno atinge os tecidos internos, e as hifas proliferam até a morte do inseto, que ocorre entre 3 a 7 dias após a infecção. A morte de insetos é devido à digestão dos tecidos internos e à produção de micotoxina, que é lançada na hemolinfa (Hajek e St. Leger, 1994). Diferenças quanto à virulência estão associadas à eficiência na infecção, que depende da dureza (determinada pelo grau de esclerotização) e das diferenças estruturais da cutícula (Hajek e St. Leger, 1994). Vários trabalhos descrevem diferenças quanto a patogenicidade entre isolados de *B. bassiana* (Hastuti et al., 1999). Entretanto, poucos estudos foram realizados nos trópicos onde, provavelmente, existe uma maior variabilidade genética entre isolados. Portanto, há necessidade de se avaliar o potencial dos inóculos encontrados no Brasil, para o controle de pragas na agricultura tais como a *S. frugiperda*.

Os métodos fenotípicos clássicos (morfologia, testes bioquímicos e sorológicos) são importantes na identificação de microrganismos, porém apresentam algumas limitações que os tornam insuficientes, muitas vezes, para a discriminação acurada de

espécies e estirpes (Oliveira et al., 1999). Contudo, quando associados às técnicas de biologia molecular, apresentam-se como uma estratégia conjunta importante para a caracterização e identificação inequívoca do germoplasma microbiano (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Nour et al., 1995; Oliveira et al., 1999).

A técnica de RAPD é uma variação da técnica de PCR que utiliza um único oligonucleotídeo iniciador de dez nucleotídeos com sequência arbitrária. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da sequência do DNA. Marcadores RAPD são altamente sensíveis a diferenças de nucleotídeos entre DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores, permitindo a detecção de mudanças em um único nucleotídeo. Tais características tornam os marcadores RAPD ideais para a detecção de diferenças em indivíduos relacionados e em espécies pouco polimórficas (Williams et al., 1990). Desde o seu desenvolvimento, a técnica de RAPD tem sido extensivamente utilizada na análise da variabilidade genética de isolados de *B. bassiana* por ser uma técnica de fácil execução, de custo relativamente reduzido e eficiente na detecção de polimorfismo (Castrillo et al., 1999; Castrillo e Brooks, 1998; Berretta et al., 1998; Bidochka et al., 1994).

Neste trabalho, objetivando estudar as variações dentre populações de *Beauveria bassiana* associadas com *S. frugiperda*, para a identificação de fungos com uso potencial como agentes para o controle biológico da lagarta do cartucho, doze isolados foram avaliados utilizando marcadores RAPD.

## Material e Métodos

### Isolados de *Beauveria bassiana*

Foram utilizados 12 isolados de *B. bassiana* da coleção de fungos do Laboratório de Criação de Insetos (LACRI) da Embrapa Milho e Sorgo, coletados de *S. frugiperda* mortas, dos campos experimentais de milho em Sete Lagoas e um isolado, número 15, coletado em Goiânia. Culturas monospóricas dos isolados foram cultivadas em meio batata dextrosado líquido (Wagner e Lewis, 2000) a 25°C, por 5 dias para obtenção de micélio para identificação taxonômica e extração de DNA.

### Identificação taxonômica

A identificação taxonômica dos isolados de *Beauveria* foi realizada utilizando a chave para identificação de patógenos de insetos descrita por Alves et al. (1998).

Microcultivos, proveniente de culturas monospóricas, dos fungos isolados de *S. frugiperda* mortas foram observados utilizando um microscópio Axioplan de contraste de fase com fluorescência da marca Zeiss. As características observadas foram a septação dos micélios e sua abundância, tipo de reprodução sexuada ou assexuada, presença de fiálide com a porção fértil em zigiguezague, cor de micélio e formato de conídios .

### Extração de DNA e amplificação por RAPD

DNA foi extraído de 0,5 g de micélio fresco de fungos de acordo com o protocolo descrito por Lee e Taylor (1990). O DNA dos isolados de *B. bassiana* foi amplificado por RAPD, utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos iniciadores comercializados pela Operon Technologies Inc. (Alameda, Califórnia, USA): OPB1, OPB8, OPC4, OPE6, OPE8, OPE9, OPQ4, OPZ12, OPZ13, OPZ19, OPO2 e OPO12. Cada 25 µl de reação RAPD continha tampão de PCR 1X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 0,4 µM de oligonucleotídeo iniciador aleatório, 25 ng de DNA e 1 unidade de

*Taq* DNA polimerase (Life Technologies do Brasil). As reações foram feitas utilizando um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 1 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (30"- 94°C, 1'- 36°C, 2'- 72°C), e uma extensão final a 72°C por 7 min. Um controle negativo foi feito para cada oligonucleotídeo iniciador, onde o DNA da reação foi substituído por água. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 V por 3 horas, em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Os géis foram tratados com brometo de etídeo (0.5 µg/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

#### Análise de dados

Os produtos de amplificação foram avaliados com presença (1) e ausência (0) utilizando o complemento do índice de similaridade de Jaccard para calcular a distância genética entre os pares de isolados. A análise de agrupamento foi feita baseada na matriz de distância genética utilizando o método UPGMA disponível no programa Statistica versão 4.2 (StatSoft, Inc. 1993).

### Resultados e Discussão

O gênero *Beauveria* é um parasita de um grande número de artrópodos, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos. Isolados de *B. bassiana* foram obtidos de *Spodoptera frugiperda* mortas com aspecto cotonoso, em diferentes campos de cultivo de milho de Sete Lagoas e Goiânia. Observação dos microcultivos, originados de culturas monospóricas, dos diversos isolados revelou a presença de um micélio abundante, septado e de cor branca, conídios ovóides suportados por fiálides com a porção terminal em zigue-zague. O DNA dos fungos, morfologicamente identificados como *B. bassiana*, foi analisado por técnicas de RAPD com o objetivo de acessar as variações dentre populações do fungo associadas com o mesmo inseto hospedeiro, *S. frugiperda*, para a identificação de isolados com potencial de agentes para o controle biológico.

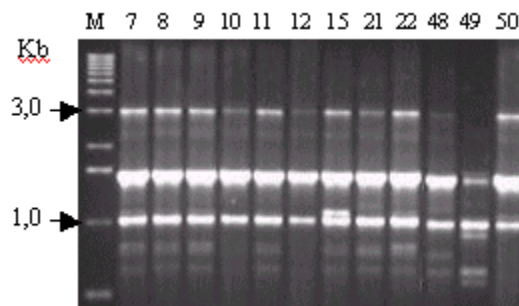
Nas análises de RAPD, um total de 10 oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados e amplificaram 53 bandas, das quais 33 foram polimórficas entre os isolados. O número de fragmentos amplificados variou entre 3 (OPB8) e 7 (OPO2 e OPO12), com uma média de 5,3 bandas por oligonucleotídeo, não sendo verificada nenhuma banda no controle negativo. O tamanho das bandas ficou entre 300 (OPZ19) e 3.800 (OPE9) pares de bases e a Figura 1 apresenta o padrão de amplificação obtido com o oligonucleotídeo OPQ4.

A distância genética entre os isolados baseada na análise das 53 bandas variou de 0% a 54%. As maiores distâncias genéticas foram verificadas entre o isolado 15, obtido da coleção de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, coletado em Goiânia e os demais isolados, coletados em Sete Lagoas, sendo separados com uma distância genética média de 48%. Análise de agrupamento, baseada nos dados moleculares evidenciou também a existência de variabilidade genética dentro da coleção de isolados coletados em Sete Lagoas, sendo que sete deles (isolados 7, 8, 10, 11, 12, 21 e 22) não apresentaram nenhuma diferença entre os oligonucleotídeos utilizados. Por outro lado, houve a formação de dois grupos distintos entre os isolados de Sete Lagoas, com uma distância genética de 20% (Figura 2).

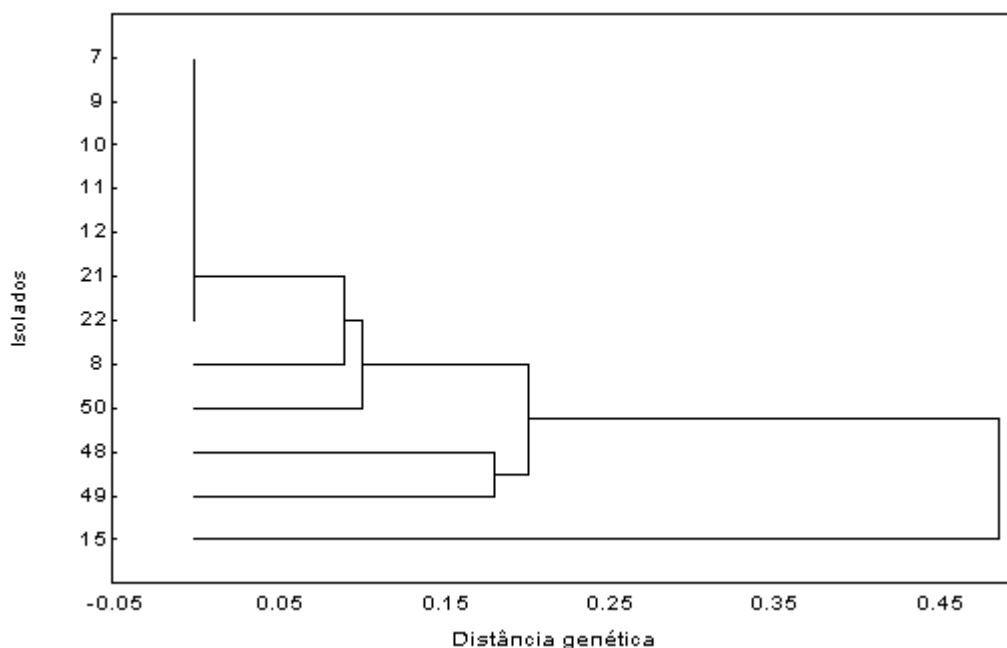
A técnica de RAPD foi capaz de diferenciar isolados obtidos numa mesma localidade, separando-os de um isolado de outra região. Assim, essa metodologia mostrou-se

eficiente para a caracterização da variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana*, em concordância com os trabalhos de Castrillo e Brooks (1998); Berretta et al. (1998); Bidochka et al. (1994).

*B. bassiana* é classificado entre os fungos imperfeitos da classe deuteromicetos por causa da ausência da fase perfeita. Esse fungo reproduz preferencialmente via assexual e é predominantemente haplóide. Fungos que se reproduzem via assexual são geralmente menos diversos que os microrganismos que possuem reprodução sexual devido à ausência de recombinação genética, exceto em casos de hibridização somática e/ou ciclo parassexual que podem compensar a ausência de reprodução sexual (Burdon, 1993). Na maioria dos casos, a única fonte de variação genética desses microrganismos são as mutações. Apesar de seu modo de reprodução assexual, a espécie *B. bassiana* apresentou uma considerável variabilidade genética devido a sua ubiquidade, ampla distribuição geográfica e larga faixa de hospedeiros. Esse polimorfismo genético pode conferir ao microrganismo uma plasticidade para adaptar e sobreviver em ambientes heterogêneos. Mesmo considerando que todos os isolados analisados foram coletados do mesmo hospedeiro (*S. frugiperda*), parte do ciclo de vida do fungo ocorre no solo, competindo com outros microrganismos e interagindo com vários fatores abióticos.



**Figura 1.** Padrão de amplificação de isolados de *B. bassiana* utilizando o oligonucleotídeo OPQ4, separados por eletroforese em gel de agarose. Sete Lagoas. MG. 2002.



**Figura 2.** Análise de agrupamento entre 12 isolados de *B. bassiana* baseados em dados de RAPD, utilizando a técnica de UPGMA. Sete Lagoas. MG. 2002.

#### Referências bibliográficas

- Berretta, M. F., Lecuona, R. E., Zandomeni, R. O., Grau, O. 1998. Genotyping Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with Fluorescent Labels. *J Invertebr Pathol.* 71, 145–150.
- Bidochka, M. J., McDonald, M. A., St. Leger, R. J., Roberts, D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr Genet.* Feb;25(2):107-13.
- Broome, J. R., Sikorowski, P. P., Norment, B. R., 1976. A mechanism of pathogenicity of *Beauveria bassiana* on larvae of the imported fire ant, *Solenopsis richteri*. *J Invertebr Pathol.* Jul;28(1):87-91.
- BURDON, J.J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 305-323.
- Castrillo, L. A., Brooks, W. M. 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses *J. Invertebr. Pathol.* Nov;72(3):190-6.
- Castrillo, L. A., Wiegmann, B. M., Brooks, W. M. 1999. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *J. Invertebr. Pathol.* May;73(3):269-75.
- CRUZ, I. Manejo Integrado de Pragas de milho com ênfase para o controle biológico. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 4., 1995, Campinas, SP. Anais. Campinas: Instituto Biológico, 1995. p. 48-92.
- Culliney, T. W., Grace, J. K. 2000. Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. *Bull Entomol Res.* Feb;90(1):9-21. Review.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2 ed. Brasília Cenargen/Embrapa, 204p.

- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 23:409-442.
- HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B.W.S.; MCCLELLAND, M. 1995. tRNA intergeneric spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology*, v.141: p.3229-3239.
- LEE, S.B, TAYLOR, J.W. (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (M.A Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky e T.J. White, eds): 282-287. Academic Press, San Diego.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chick-peas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rizobium mediterraneum* sp. Nov. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 640-648.
- OLIVEIRA, V.M.; COUTINHO, H.L.C.; SOBRAL, B.W.S.; GUIMARÃES, C.T.; van ELSAS, J.D.; MANFLIO, G.P. (1999). Discrimination of *rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Letters in Applied Microbiology*, 28: 137-141.
- Riba, G., and Silvy, C. 1989. "Combattre les ravageurs des cultures.Enjeux et perspectives." INRA, Paris.
- Wagner, B. L., Lewis, L. C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.*;66(8):3468-73
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, v.18: p.6531-6535.