VARIABILIDAD DE LAS ISOENZIMAS ESTERASAS DE *BEAUVERIA BASSIANA* (BALSAMO) VUILLEMIN

María E. Estrada Martínez y Dolores Piñón Gómez

Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Carretera CAI Manuel Martínez Prieto Km 2½, Boyeros, Ciudad de La Habana, CP 19390, fax: (53-7) 260 2571, meem@inica.edu.cu

RESUMEN

Se determinó la variabilidad de las isoenzimas esterasas del hifomiceto entomopatógeno Beauveria bassiana *(Balsamo) Vuillemin mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida a 8,5%. Se analizaron los zimogramas de 21 aislamientos de diferentes orígenes geográficos y entomológicos. A partir de la matriz de los datos originales se calculó la distancia genética y se realizó el análisis de agrupamiento de los individuos mediante el método de los promedios de las distancias no ponderadas. La presencia de 24 bandas diferenciales y de seis grupos de diversidad molecular evidenciaron la variabilidad genética de* B. bassiana *para el sistema enzimático estudiado.*

Palabras claves: *Beauveria bassiana, variabilidad, esterasas, Diatraea saccharalis, caña de azúcar*

ABSTRACT

Isoenzyme esterases variability of hyphomycete fungus Beauveria bassiana *(Balsamo) Vuillemin was determinated by means vertical electrophoresis on 8.5% polyacrylamide gel. Twenty one isolates from different geographical and entomology origin groups were analyzed. Starting from the matrix of the original data the genetic distance was calculated. The analysis of individuals cluster was carried out by means of the unweighted pair–group method, arithmetic average. The presence of 24 differential bands and six groups of molecular diversity evidenced the genetic variability* of B. bassiana *for the studied enzymatic system.*

Keys words: *Beauveria bassiana, variability, esterases, Diatraea saccharalis, sugar cane*

INTRODUCCIÓN

B*eauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es un hifomiceto entomopatógeno ampliamente utilizado en la lucha biológica contra los insectos plaga de los cultivos agrícolas [Moino *et al*., 2002; Sáenz de Cabezón *et al*., 2003; Estrada *et al*., 2004; Kauffman *et al*., 2005]. En Cuba se utiliza para disminuir las poblaciones larvales de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cambridae), barrenador de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido).

El estudio de las isoenzimas esterasas contribuye al conocimiento de la variabilidad genética de diferentes especies entomopatógenas [Estrada *et al*., 1997; Bruce *et al*., 2003]. Este análisis permite establecer diferencias no detectables desde el punto de vista morfológico.

El interés agronómico y ecológico de las aplicaciones de *B. bassiana* en el cultivo de la caña de azúcar precisa conocer las diferencias isoenzimáticas entre los aislamientos del hifomiceto, de forma tal que estos puedan ser identificados luego de su aplicación en el agroecosistema cañero. En este sentido en el presente trabajo se determina la variabilidad de las isoenzimas esterasas de *B. bassiana*, sistema enzimático reportado polimorfo para esta especie [Fernandes *et al*., 2006].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 21 aislamientos (*Tabla 1*) de *B. bassiana*, los cuales se cultivaron en 50 mL de medio de cultivo estático Adamek (1965) e incubados a 25°C durante siete días.

El micelio obtenido se pesó húmedo y seco, después de filtrarlo por papel Filtrak 390 y llevarlo a sequedad a temperatura ambiente durante tres días. Un gramo del secado se maceró con tampón fosfato a pH = 6,5 con sacarosa a 20% en una proporción de 1:3. El macerado se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min.

Tabla 1. Relación de los aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. utilizados en el trabajo

Aislamientos	País de origen	Hospedante de origen
1	Cuba	*Diatraea saccharalis*
2	Cuba	*Diatraea saccharalis*
3	Cuba	*Diatraea saccharalis*
4	Cuba	*Diatraea saccharalis*
5	Francia	*Leptinotarsa decemlineata*
6	Cuba	*Diatraea saccharalis*
7	Guadalupe	Insecta
8	Estados Unidos	*Artiples flloridus*
9	Cuba	*Diatraea saccharalis*
10	Cuba	*Diatraea saccharalis*
11	Cuba	*Diatraea saccharalis*
12	Francia	*Sitona discoideus*
13	Cuba	*Diatraea saccharalis*
14	Cuba	Insecta
15	Cuba	*Diatraea saccharalis*
16	Cuba	*Diatraea saccharalis*
17	Cuba	*Diatraea saccharalis*
18	Cuba	*Hysipyla grandella*
19	Cuba	*Diatraea saccharalis*
20	India	Insecta
21	Bulgaria	Insecta

Se realizaron seis extracciones para cada aislamiento, las que se examinaron comparativamente por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida a 8,5%. La electroforesis se realizó entre 50-60 mA durante 4 h. Para el revelado de los geles se utilizaron como sustratos α y β-naftil acetato, y se analizaron visualmente, para lo cual se tuvo en cuenta el número y la posición de las bandas de cada aislamiento. Las movilidades relativas de las manchas se calcularon a partir del punto de aplicación como:

Rf = Movilidad de la mancha / Movilidad del frente de corrida

Cada banda enzimática se consideró como una variable cualitativa presente (1) o ausente (0). Se utilizó el programa NTSYS versión 2.01, y a partir de la matriz de los datos originales se calculó la distancia genética mediante el coeficiente de similitud SM y se realizó el análisis de agrupamiento de los individuos por el método de los promedios de las distancias no ponderadas (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Los patrones de marcadores moleculares se determinaron según Cornide *et al.* (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La *Fig. 1* corresponde a los zimogramas para esterasas de los 21 aislamientos de *B. bassiana* estudiados. Se aprecia un total de 41 bandas. De ellas 24 son polimórficas, es decir, son bandas únicas para diferentes aislamientos que representan 58,53% del total de las bandas reveladas. La presencia de 18 patrones de bandas evidencia el polimorfismo para esterasas de *B. bassiana*, lo que ha sido demostrado por diferentes autores para esta especie entomopatógena [Liu *et al.*, 2003; Meyling y Eilenberg, 2005].

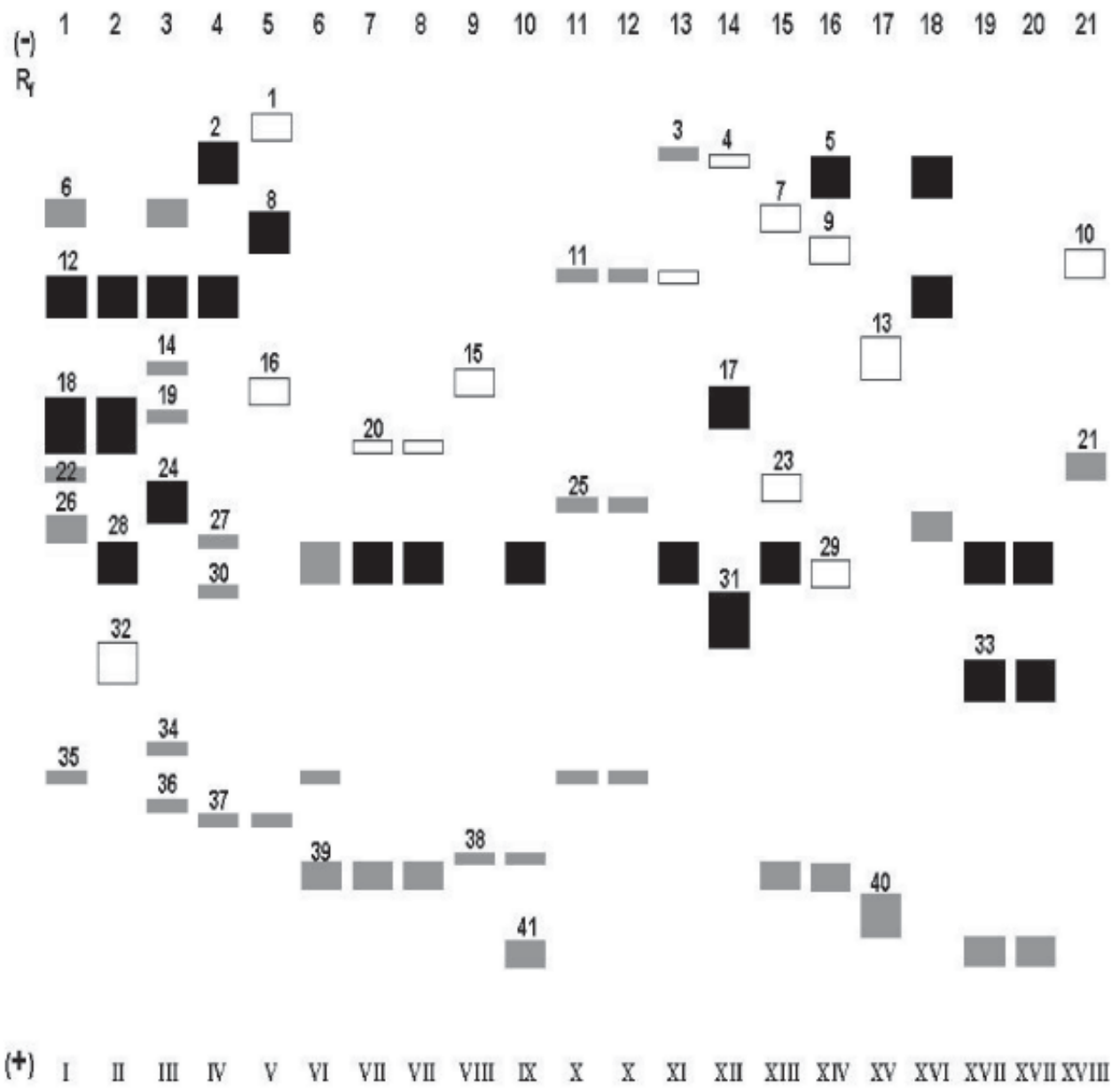


Figura 1. Zimograma para esterasas de 21 aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (1-41: bandas; I-XVIII: patrones)

De acuerdo con lo obtenido mediante el análisis de agrupamiento de los 21 aislamientos de *B. bassiana* estudiados, se formaron seis grupos de diversidad molecular (I, II, III, IV, V y VI) (*Fig. 2*), donde los aislamientos no aparecen agrupados por su origen geográfico y entomológico.

La presencia de bandas diferenciales (*Tabla 2*) permitió distinguir las bandas de los grupos de diversidad molecular. Así, por ejemplo, en el grupo I, formado por los aislamientos 1, 3, 18, 2, 4 y 5, se puede diferenciar el aislamiento 3 del 5 por la presencia de las bandas B14 y B34 en el primero, y la ausencia en el segundo. En el grupo II se evidencia la presencia de bandas diferenciales entre los aislamientos que conforman en este grupo. En el caso del grupo III los aislamientos 11 y 12 se identifican del resto de los aislamientos por presentar las bandas B11, B25 y B35; sin embargo, estos aislamientos no pudieron diferenciarse entre sí. El resto de los aislamientos que conforman los grupos IV, V y VI presentaron bandas diferenciales que permitieron identificarlos entre sí.

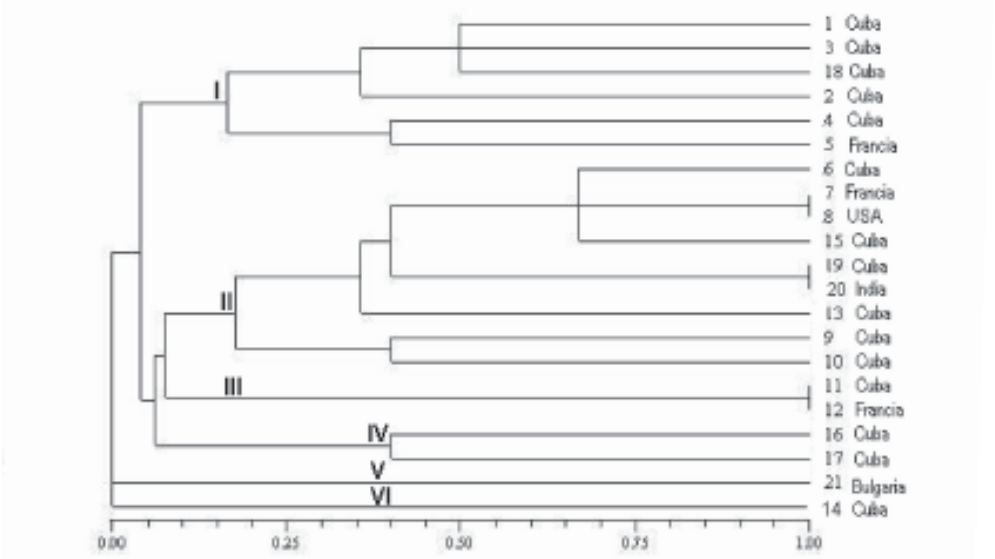


Figura 2. Análisis de agrupamiento de los 21 aislamientos de *B. bassiana* basado en la matriz de similitud.

Tabla 2. Patrones de descriptores moleculares de los aislamientos de *B. bassiana* con isoenzimas esterasas

Grupos de diversidad molecular	Aislamientos	B11	B12	B25	B28	B35	B38	B39	B41
I	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	3	0	1	0	0	0	0	0	0
	18	0	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	1	0	0	0	0	0	0
	4	0	1	0	1	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
II	6	0	0	0	1	1	0	1	0
	7	0	0	0	1	0	0	1	0
	15	0	0	0	1	0	0	1	0
	19	0	0	0	1	0	0	0	1
	20	0	0	0	1	0	0	0	1
	8	0	0	0	1	0	0	1	0
	13	1	0	0	1	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	1	0	0
	10	0	0	0	1	0	1	0	1
III	11	1	0	1	0	1	0	0	0
	12	1	0	1	0	1	0	0	0
IV	16	0	0	0	0	0	0	1	0
	17	0	0	0	0	0	0	0	0
V	21	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	14	0	0	0	0	0	0	0	0

Bandas diferenciales entre grupos de diversidad molecular.

Bandas diferenciales entre aislamientos de un mismo grupo de diversidad molecular.

La caracterización basada en el estudio de las isoenzimas esterasas evidenció la variabilidad genética de *B. bassiana* y permitió contar con otro criterio para diferenciar los aislamientos del hifomiceto por sus patrones de bandas, lo que resulta de utilidad práctica para la colección de microorganismos entomopatógenos.

La determinación de un carácter discriminante para *B. bassiana* a partir de las bandas diferenciales resulta de interés agronómico, pues fue posible diferenciar el aislamiento 3 que se aplica en el cultivo de la caña de azúcar del 5 que se aplica en la agricultura no cañera. Como *B. bassiana* se ha aislado a partir de larvas y crisálidas de *D. saccharalis* colectadas en diferentes partes de la planta y a partir de muestras de suelo (*Tabla 1*), la evaluación de la aplicación del aislamiento 3 en el campo requiere de su caracterización para la diferenciación de los aislamientos que aparecen naturalmente en el agroecosistema cañero.

Generalmente los patrones isoenzimáticos no se correlacionan con los insectos hospedantes, con el país de origen ni con otro carácter. Ellos pueden emplearse como marcadores individuales, y se han utilizados para conocer la estabilidad genética de especies de hifomicetos entomopatógenos sometidas a diferentes presiones de selección [Rakotoniainy *et al*., 1994].

El conocimiento de la variabilidad de las isoenzimas esterasas constituye una herramienta para la caracterización de los aislamientos de *B. bassiana* en el Programa Nacional de Lucha Biológica contra el barrenador de la caña de azúcar *D. saccharalis*.

CONCLUSIONES

- La caracterización basada en el estudio de las isoenzimas esterasas evidenció la variabilidad genética de *B. bassiana* y permitió contar con otro criterio para diferenciar los aislamientos del hifomiceto por sus patrones de bandas.
- Fue posible diferenciar el aislamiento 3, que se aplica en el cultivo de la caña de azúcar, del aislamiento 5 que se aplica en la agricultura no cañera.
- La evaluación de la aplicación del aislamiento 3 en el campo requiere de su caracterización para la diferenciación de los aislamientos que aparecen naturalmente en el agroecosistema cañero.

REFERENCIAS

Adamek, L.: «Submerse Cultivation of the Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok», *Folia Microbiológica* 10: 255-257, 1965.

Bruce, L.; M. Skinner; S. D. Costa; S. Gouli; W. Reid; M. El Bouhssini: «Entomopathogenic Fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): Collection and Characterization for Development», *Biological Control* 27 (3):260-272, 2003.

Cornide, M. T.; O. Coto; D. Calvo, E. Canales; F. de Prada; G. Pérez: «Molecular Markers for the Identification and Assisted Management of Genetic Resources for Sugarcane Breeding», *Plant Varieties and Seeds* 13:113-123, 2000.

Estrada, M. E.; D. Piñón; M. Capote: «Variabilidad de las esterasas de *Metarhizium anisopliae*», *Revista Iberoamericana de Micología* 14(1):29-30, 1997.

Estrada, M. E.; M. Romero; M. J. Rivero; F. Barroso: «Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum sp* hibrido) en Cuba», *Revista Iberoamericana de Micología* 21(1):42-43, 2004.

Fernandes, E. K.; G. L. Costa; A. M. Moraes, V. Zahner; V. R. Pinheiro: «Study on Morphology, Pathogenicity and Genetic Variability of *Beauveria bassiana* Isolates Obtained from *Boophilus microplus* Tick», *Parasitology Research* 98 (4):324-832, 2006.

Kauffman, P. E.; R. Collen; A. Donald; J. Rutz; K. Ketzis; J. James: «Evaluation of *Beauveria bassiana* Applications Against Adult House Fly, *Musca domestica*, in Commercial Caged-Layer Poultry Facilities in New York State», *Biological Control* 33 (3):360-367, 2005.

Liu, H.; M. Skinner; M. Brownbridge; B. L. Parker: «Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisoplaie* Isolates for Management of Tarnished Plant Bug *Lygus lieolaris* (Hemiptera: Miridae)», *Journal of Invertebrate Pathology* 82 (3):139-147, 2003.

Meyling, N. V; J. Eilenberg: «Isolation and Characterization of *Beauveria bassiana* Isolates from Phylloplanes of Hedgerow Vegetation», *Mycological Research* 110 (2):188-195, 2005.

Moino Jr., A.; S. B. Alves; R. B. Lopes; P. M. O. J. Neves; R. M. Pereira; S. A. Vieira: «External Development of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the Subterranean Termite *Heterotermes tenuis*», *Scientia Agricola* 59 (2):267-273, 2002.

Rakotoniainy, M. S.; M. L. Cariou; Y. Brigoo; G. Riba: «Phylogenetic Relationships Within the Genus *Metarhizium* Based on 28S RNA Sequences and Isozyme Comparison», *Mycological Research* 98 (2):225-230, 1994.

Sáenz-de-Cabezón, J. F.; V. M. Mancebón; I. P. Moreno: «The Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* and Its Compatibility with Triflumuron: Effects on the Two Spotted Spider Mite *Tetranycus urticae*», *Biological Control* 26:168-173, 2003.