

Seleção e caracterização genética por RAPD de linhagens de *Beauveria bassiana* para o controle de *Homalinotus coriaceus*

Ricardo P.C. Araujo¹
Joana M.S. Ferreira²
Myrian S. Tigano³
Fernanda B. Sarro⁴
Claudio Costa¹

RESUMEN. Selección y caracterización genética por RAPD de linajes de *Beauveria bassiana* para el control de *Homalinotus coriaceus*. La patogenicidad de veintidos linajes de *Beauveria bassiana* fue probada sobre adultos de *Homalinotus coriaceus*, cuyas larvas atacan el pedúnculo floral del coquero, ocasionando la caída de las flores y de los frutos inmaduros. El trabajo se desarrolló en Embrapa-CPATC y Embrapa-CENARGEM, siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado, con 23 tratamientos (22 linajes y un testigo) y cinco repeticiones, cada una con 20 insectos adultos. La prueba de patogenicidad fue realizada por la inmersión de adultos de *H. coriaceus* en suspensión conidial (10^9 conidios/mL). Los aislados fueron caracterizados genéticamente por RAPD, utilizando 16 imprimadores. Los linajes seleccionados, con patogenicidad superior a 80%, fueron: CG002, CG544, CG817, CG557 y CG219. La caracterización genética indicó correlación entre el dendrograma y la matriz, con una similitud de 95%. El linaje más patogénico (CG002) presentó 67% de similitud con el cuarto linaje más patogénico (CG817), mientras que los demás linajes seleccionados presentaron una similitud menor al 67%. Los análisis de RAPD no produjeron grupos bien definidos, concluyéndose que la virulencia de *B. bassiana* a *H. coriaceus* no tiene relación con la similitud genética verificada entre los linajes.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, coquero, Curculionidae, *Homalinotus coriaceus*.

ABSTRACT: Selection and genetic characterization of *Beauveria bassiana* by RAPD analysis for the control of *Homalinotus coriaceus*. The pathogenicity of twenty-two *Beauveria bassiana* strains was evaluated against adults of *Homalinotus coriaceus* (Coleoptera: Curculionidae), an important coconut pest in Brazil whose larvae attack the bunch, causing the flowers and the immature fruits to fall down. The research was carried out in Embrapa-CPATC and Embrapa-CENARGEM, following a completely randomized design, with 23 treatments (22 strains and a blank) and five replications, with 20 adult insects each. The pathogenicity test was carried out by immersing *H. coriaceus* adults in a conidial suspension (10^9 conidia/mL). The strains were genetically identified through RAPD, using 16 primers. The strains with a pathogenicity of over 80% were: CG002, CG544, CG817, CG557, and CG219. The genetic characterization showed a correlation of 95% between the dendrogram and the similarity matrix. The most pathogenic strain (CG002) showed a similarity of 67% with the fourth one (CG817). The other strains showed a similarity of under 67%. The RAPD analysis did not show well-defined groups, and we conclude that *B. bassiana* virulence to *H. coriaceus* is not correlated with genetic similarity between strains.

Keywords: *Beauveria bassiana*, coconut, Curculionidae, *Homalinotus coriaceus*.

Introdução

Nos grandes plantios comerciais alguns insetos representam uma ameaça à produção. Entre os fatores responsáveis pela regulação da população de

pragas na maioria das culturas destacam-se os agentes entomopatogênicos (Araujo 1997). Isto indica o grande potencial de uso de produtos microbianos

¹ Depto. de Biotecnologia, Inst. Química – UNESP, C. postal 355 – CEP 14800-900, Araraquara, SP. Brasil.

² Lab. de Entomologia - Embrapa Tabuleiros Costeiros, C. postal 44 – CEP 49025-040 – Aracaju - SE. Brasil.

³ Lab. de Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. postal 2372 – CEP 70770-900 – Brasília - DF. Brasil.

⁴ Depto. Produção Vegetal - FCA - UNESP – Faz. Exp. Lageado, C. postal 237 – CEP 18603-970 – Botucatu - SP. Brasil. fbsarro@fca.unesp.br

como parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, pode regular a população da praga mantendo-a abaixo do nível de dano econômico, além de contribuir para a economia de divisas e para a redução da poluição ambiental (Alves *et al.* 1998).

As diversas descobertas na área de controle microbiano vêm contribuindo para a utilização cada vez maior de grupos de entomopatógenos no controle de pragas agrícolas e urbanas. Fungos entomopatogênicos têm sido isolados de pragas do coqueiro provenientes de várias localidades do estado de Sergipe. O fungo *Beauveria bassiana* tem ocorrido enzooticamente em coqueirais no estado de Sergipe, parasitando adultos da broca do cacho do coqueiro, *Homalinotus coriaceus* (Coleoptera: Curculionidae) (Ferreira *et al.* 2000), cujas larvas dilaceram os feixes libero-lenhosos do pedúnculo do cacho impedindo a translocação de seiva, o que acarreta a queda dos frutos (Ferreira *et al.* 2002).

Linhagens de *B. bassiana*, provenientes do Laboratório de Entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, bem como linhagens provenientes da coleção da Embrapa Recursos Genéticos/DF (CENARGEN), isoladas de várias famílias da ordem Coleoptera, têm sido testadas no controle de adultos de *H. coriaceus*. Testes preliminares de laboratório demonstraram a viabilidade de utilização da linhagem CG817, isolada de *H. coriaceus*, para o controle dos adultos desta espécie, além do potencial de produção em laboratório (Ferreira *et al.* 2000).

Devido a alta incidência natural de *B. bassiana*, em pragas do coqueiro, e a existência de diversas linhagens isoladas de coleópteras, desenvolveu-se esse trabalho para selecionar as linhagens mais patogênicas a *H. coriaceus* e através da caracterização genética por RAPD, avaliar a variabilidade genética dessas linhagens isoladas no estado de Sergipe e nas demais regiões geográficas do país, com o objetivo de verificar se havia correlação entre a patogenicidade, o polimorfismo molecular e o hospedeiro ou região geográfica.

Material e métodos

Manutenção dos insetos

Adultos de *H. coriaceus* foram coletados em coqueiros da variedade anão-verde, no Município de Saquarema/RJ, mantidos em caixas plásticas transparentes furadas contendo toletes de cana-de-açúcar.

Cultura dos fungos

Vinte e dois isolados de *Beauveria bassiana* foram utilizados nesse trabalho (CG207, CG817, Saq., CG138, CB, Malh., CG004, CG544, CG011, CG216, CG219, CG545, CG478, CG304, CG002, CG475, CG557, CG674, CG547, CG311, CG546, CG211). Algumas linhagens foram isoladas de espécimes da broca-do-cacho e da broca-do-olho do coqueiro (*Rhynchophorus palmarum*), coletados no campo já infectados, e outras foram obtidas da coleção de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-(CENARGEN)/DF, isolados de insetos da família Curculionidae, de diferentes regiões geográficas. A origem geográfica, a data de coleta dos insetos mortos e o inseto hospedeiro estão na Tabela 1. Os conídios utilizados no teste de patogenicidade foram obtidos de culturas inoculadas em arroz autoclavado mantidos a 25 °C por 15 a 20 dias até a esporulação. O micélio usado para análise RAPD foi obtido em placas contendo meio completo (0,001 g FeSO₄, 0,5 g KCl, 1,5 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 6 g NaNO₃, 0,001 g ZnSO₄, 1,5 g caseína hidrolisada, 0,5 g levedo de cerveja, 10 g glucose, 2 g peptona, 20 g ágar e 1 L de água destilada) a 27 °C por 15 dias, sendo o micélio liofilizado e estocado a -80 °C.

Análise RAPD

As linhagens selecionadas foram submetidas à caracterização genética por RAPD, no laboratório de Micologia da Embrapa Recursos Genéticos (CENARGEN). O DNA genômico dos 22 isolados de *B. bassiana* foi obtido usando o método de extração rápida denominado miniprep (Aljanibi & Martinez 1997). As reações de PCR foram feitas em volumes de 30 µL, com uma concentração padrão de 25 ng de DNA, usando um termociclador programável PTC-100 (MJ Research) cuja programação foi descrita por Tigano-Milani *et al.* (1995). As amplificações foram feitas usando os seguintes reagentes: 2 unidades de Taq polimerase (Cenbiotec), 5 µL de 10x solução tampão para Taq polimerase, 200 µM de cada desoxynucleotídeos trifosfatados (Pharmacia Biotec) e 0,4 µM de 10-mer primer (Operon Technologies, Alameda CA). Dezesesseis primers foram selecionados para análise: OPB-01, OPB-08, OPC-04, OPE-01, OPE-02, OPE-03, OPE-04, OPE-06, OPE-07, OPE-08, OPE-09, OPE-14, OPE-15, OPE-16, OPE-19 e OPAB-04. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 2% com

Tabela 1. Origem hospedeira e localização geográfica das 22 linhagens de *Beauveria bassiana* isoladas de insetos da ordem coleóptera e mortalidade média (\pm DP) de adultos de *H. coriaceus* após imersão em suspensão conidial (10^9 conídios/mL).

Linhagem	Data da coleta	Hospedeiro	UF	País	Mortalidade ⁽²⁾
CG002	22/09/2000	<i>Elaeidobius</i> sp.	AM	Brasil	19,4 \pm 0,89 a
CG544	09/03/2000	<i>Rhinostomus barbirostris</i>	SE	Brasil	18,6 \pm 0,89 ab
Malh.	24/02/2000	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	SE	Brasil	18,0 \pm 0,71 ab
CG817	12/09/1999	<i>Homalinotus coriaceus</i>	SE	Brasil	17,4 \pm 0,89 ab
CG557	22/09/2000	<i>H. coriaceus</i>	SE	Brasil	16,8 \pm 1,64 ab
CG219	15/03/2000	<i>Chalcodermus</i> sp.	MS	Brasil	16,4 \pm 1,52 abc
Saq.	10/01/2000	<i>H. coriaceus</i>	RJ	Brasil	16,0 \pm 1,00 bc
CG475	22/09/2000	<i>Sternechus subsignatus</i>	PR	Brasil	13,4 \pm 1,52 c
CG207	03/01/2000	<i>Chalcodermus aeneus</i>	GO	Brasil	12,2 \pm 0,84 d
CG211	24/03/1982	<i>Aracanthus</i> sp.	CE	Brasil	10,4 \pm 1,14 de
CB	13/01/2000	<i>Coralimela brunnea</i>	SE	Brasil	7,6 \pm 1,34 ef
CG674	22/09/2000	Coleoptera/Curculionidae	MT	Brasil	7,0 \pm 2,55 f
CG478	14/04/2000	<i>Anthonomus grandis</i>	SP	Brasil	6,8 \pm 2,77 f
CG011	14/03/2000	<i>S. subsignatus</i>	PR	Brasil	6,4 \pm 1,52 f
CG311	03/10/2000	<i>Aracanthus</i> sp.	PR	Brasil	5,6 \pm 2,07 fg
CG547	03/10/2000	<i>R. palmarum</i>	SE	Brasil	4,6 \pm 1,34 fgh
CG138	11/01/2000	<i>Cosmopolites sordidus</i>	PE	Brasil	3,8 \pm 0,84 fgh
CG216	15/03/2000	Coleoptera/Curculionidae	CE	Brasil	3,6 \pm 0,55 fgh
CG545	14/04/2000	<i>R. palmarum</i>	SE	Brasil	3,0 \pm 1,73 gh
CG546	06/10/2000	<i>R. palmarum</i>	SE	Brasil	2,8 \pm 1,64 gh
CG004	09/03/2000	<i>Deois flavopicta</i>	DF	Brasil	2,4 \pm 1,14 h
CG304	14/04/2000	<i>S. subsignatus</i>	RS	Brasil	2,2 \pm 0,44 h

⁽²⁾ Mortalidade média de cinco repetições contendo 20 adultos / repetição.

DMS: 3,28

brometo de etídeo durante 4 horas, em seguida o gel foi fotografado no EAGLE-EYE.

Teste de patogenicidade

A seleção das linhagens de *B. bassiana* mais patogênicas à *H. coriaceus* foi realizada no Laboratório de Entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju – SE e mantidos a 25 °C, 80% UR e fotofase de 12h. Foram avaliadas 22 linhagens, selecionando-se aquelas que apresentaram uma patogenicidade superior a 80%, sabendo-se que de acordo com Alves (1998), um microrganismo é considerado viável para ser utilizado como um agente de controle microbiano quando este apresenta uma patogenicidade igual ou superior a 80%. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, constando de 23 tratamentos (um testemunha e 22 linhagens) e 5 repetições com 20 adultos/repetição, totalizando 100 adultos por tratamento. O teste de patogenicidade foi realizado através da imersão de adultos de *H. coriaceus* em suspensão conidial (10^9 conídios/mL), contendo 0,1% de Tween[®] 80, por aproximadamente 10 segundos. Os insetos da testemunha foram tratados

com a mesma solução, porém sem a presença de conídios. Após a imersão os insetos foram colocados isoladamente em garrafas plásticas de 250 mL contendo um pedaço de cana-de-açúcar, como substrato alimentar, trocado a cada dois dias. A avaliação foi diária durante 20 dias, tanto para insetos tratados como para testemunha, anotando-se o número de insetos mortos, o dia e a causa da morte. Para tanto, os insetos mortos foram colocados em câmaras úmidas para confirmação da infecção pelo fungo.

Análise de dados

A mortalidade observada no teste de patogenicidade foi submetida à análise descritiva do ANOVA, obtendo-se as médias e os respectivos desvios-padrão. A análise das bandas obtidas no RAPD foi analisada usando NTSYS-pc V1.8. Com base no número de bandas obtidas das 22 linhagens de *B. bassiana* através dos 16 primers selecionados, foi criada a matriz de similaridade utilizando o coeficiente de similaridade de Nei & Li e o método de cluster usando UPGMA adotado por Sneath & Sokal (1973).

Resultados e discussão

De acordo com o teste de patogenicidade verificou-se uma alta variabilidade na patogenicidade das 22 linhagens de *B. bassiana* aos adultos de *H. coriaceus*. As linhagens mais patogênicas foram: CG002, CG544, Malh, CG817, CG557, CG219 e Saq que apresentaram patogenicidade de: 97%, 93%, 90%, 87%, 84%, 82% e 80%, respectivamente (Fig.1).

Os 16 primers utilizados neste estudo geraram 198 bandas nas 22 linhagens de *B. bassiana* (Fig. 2). O número de bandas geradas para cada primer variou de 7 a 18 bandas. Os resultados do dendrograma foram comparados com a matriz de similaridade que foi calculada a partir da contagem binária de primers arbitrários. A correlação entre o dendrograma e a matriz de similaridade foi de 95%.

A análise de cluster e a matriz de similaridade usando o método de UPGMA evidenciou 4 grupos. O grupo 1 compreende três linhagens que estão agrupadas a 56% de similaridade. A linhagem CG674 encontra-se isolada (grupo 2) e as linhagens Malh., CG547, CG546, CG545 e CG544, isoladas de adultos de *R. palmarum* e *Rhinostomus barbirostris* em Sergipe, apresentam 70% de similaridade (grupo 4), sendo que a patogenicidade das linhagens CG544 e

Malh. diferiu estatisticamente das linhagens CG547, CG546 e CG545 (Tabela 1). As demais linhagens formam o grupo 3, apresentando 63% de similaridade (Fig. 3).

Dentre as sete linhagens mais patogênicas, a CG544 e a Malh, apresentam 70% de similaridade. Em relação às outras cinco linhagens mais patogênicas a similaridade observada foi de 60%. A linhagem CG002, que apresentou patogenicidade de 97%, possui 67% de similaridade com a quarta linhagem mais patogênica (CG817), sendo que em relação às outras a similaridade foi menor.

As linhagens isoladas de adultos de *H. coriaceus* (Saq., CG557 e CG817) apresentaram uma alta variabilidade, mesmo entre as linhagens provenientes do estado de Sergipe, porém a patogenicidade não diferiu estatisticamente (Tabela 1) variando de 80 a 87% no controle deste inseto (Fig. 1). Por outro lado, as três linhagens de *B. bassiana* (CG545, CG546 e CG547) isoladas de *R. palmarum*, apresentaram uma similaridade de 88% e baixa patogenicidade à adultos de *H. coriaceus* (15%, 14% e 23%, respectivamente). Nossos resultados concordam com Berretta *et al.* (1997) que avaliaram a variabilidade genética de isolados de *B. bassiana*, provenientes do Brasil e da

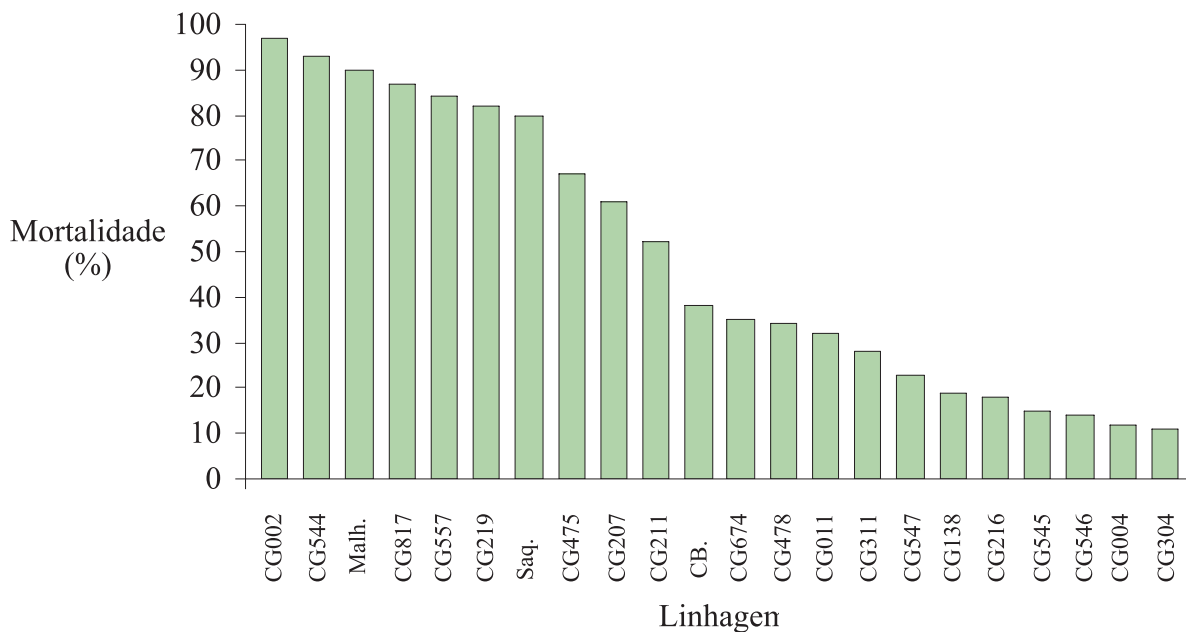


Figura 1. Porcentagem de mortalidade de adultos de *Homalinotus coriaceus* tratados em suspensão contendo 10^9 conídios/mL de 22 linhagens do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (25 °C, UR 80% e fotofase 12 h).

Argentina, através de RAPD com marcadores fluorescentes, observando não haver nenhuma correlação entre a origem geográfica ou hospedeira com a variabilidade, pois cada isolado apresentou um genótipo distinto.

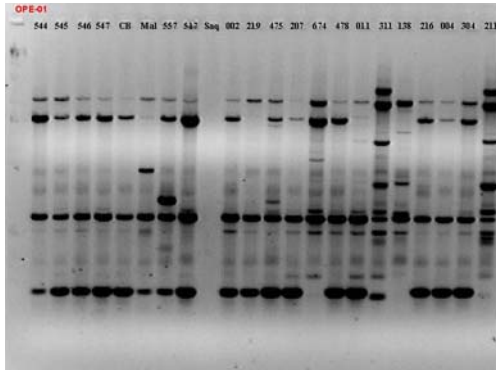


Figura 2. Padrão em gel de poliácridamida representativo de bandas obtidas por RAPD através da amplificação com o primer OPE-01 (5'CCCAAGGTCC3') de 22 linhagens do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*.

Castrillo e Brooks (1998) avaliaram a diferenciação de linhagens *B. bassiana* isoladas do mesmo hospedeiro, proveniente de regiões diferentes, usando isoenzimas e RAPD, observando que ambos os marcadores foram capazes de identificar variações nas linhagens provenientes da Carolina do Norte e da Virgínia, porém os marcadores RAPD proporcionaram uma melhor resolução na diferenciação entre as linhagens.

As análises de RAPD indicaram que as linhagens de *B. bassiana* são relativamente homogêneas, apresentando uma similaridade superior as 50%, porém a virulência contra *H. coriaceous* é divergente. Segundo Leucona *et al.* (1996) as análises de isoenzimas de *B. bassiana* têm mostrado que não é possível correlacionar o polimorfismo molecular com a virulência, também Luz *et al.* (1998) observaram que a virulência de 10 isolados de *B. bassiana* não poderia ser distinguida apenas pelos marcadores moleculares usados. Assim um maior número de amostras de isolados deveria ser analisado para que se conseguisse identificar grupos mais definidos.

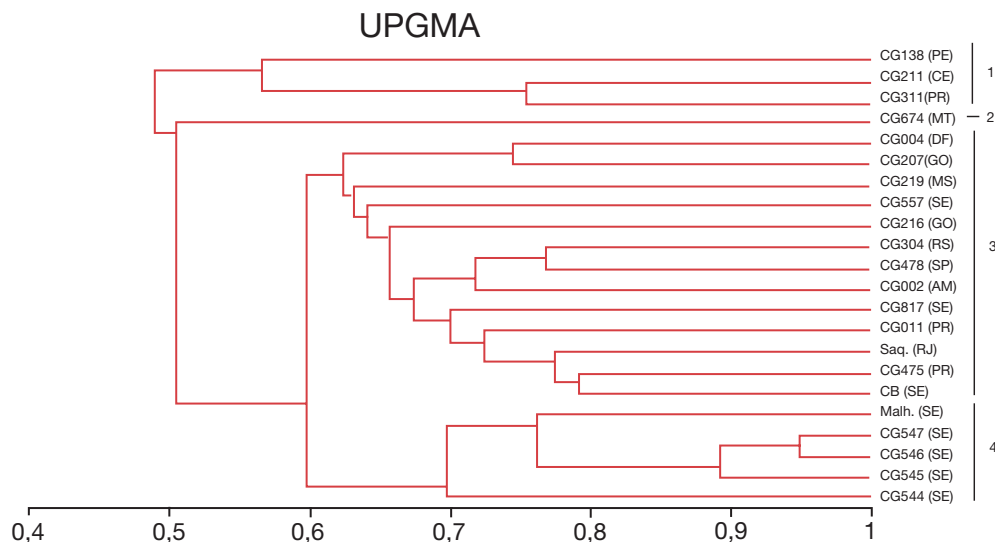


Figura 3. Dendrograma construído com base nos dados obtidos das análises de RAPD, indicando a relação entre as 22 linhagens de *Beauveria bassiana*. A matriz de similaridade foi calculada utilizando o coeficiente de Nei & Li e a análise de cluster foi gerada usando o método UPGMA. Os números de 1 a 4 indicam os grupos formados de acordo com a porcentagem de similaridade observada.

Literatura citada

- Aljanabi, SM; Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Research* 25: 4692-4693.
- Alves, SB. 1998. Controle microbiano de insetos. Piracicaba, BR.
- Araujo, RPC. 1997. Avaliação do controle biológico da broca do pedúnculo floral (*Homalinotus coriaceus* Gyll.) do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) pelo fungo entomopatogênico *Metharizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin. Dissertação. Brasil, Instituto de Química do Campus de Araraquara, UNESP. 63 p.
- Berretta, MF; Lecuona, ME; Zandomeni, RO; Grau, O. 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 145-150.
- Castrillo, LA; Brooks, WM. 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the Darkling Beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 190-196.
- Ferreira, JMS; Warwick, DRN; Siqueira, LA. 1998. A Cultura do Coqueiro no Brasil. 2 ed. Brasília, BR, Embrapa-SPI, Aracaju. 292 p.
- _____; Araujo, RPC; Sarro, FB. 2000. Efficiency of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (057) on adults of the Black bunch weevil (*Homalinotus coriaceus*). *In International Congress of Entomology* (21, 2000.). Annals. Foz do Iguaçu, BR. v. 1, p. 519.
- _____; Araujo, RPC; Sarro, FB. 2002. Insetos e ácaros. *In Ferreira, JMS. ed. Frutas do Brasil: coco fitossanidade.* Brasília, BR, Embrapa Informação Tecnológica. p.10-40.
- Lecuona, RE; Tigano, MS; Diaz, BM. 1996. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25: 299-307.
- Luz, C; Tigano, MS; Silva, LG; Cordeiro, SMT; Aljanabi, SM. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 839-846.
- Sneath, PHA; Sokal, RR. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco, US, Freeman. 573 p.
- Tigano-Milani, MS; Honeycutt, RJ; Lacey, LA; Assis, R; McClelland, M; Sobral, BWS. 1995. Genetic variability of *Paecylomices fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *Journal of Invertebrate Pathology* 65: 274-282.