

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ESTUDO DE SISTEMAS ISOENZIMÁTICOS POLIMÓRFICOS PARA *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL.

Myrian S. Tigano¹

Guy Riba²

ABSTRACT

Study of polymorphic isoenzymatic systems for *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

The changes of biochemical characteristics of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. were studied. Fifteen strains were compared for some of their isoenzymes. The isoenzymes α -esterases showed a large number of bands of each strain, and in the total of strains as well. This polymorphic enzymatic system allows the characterization of the strains for this fungus.

RESUMO

Este estudo tem como objetivo determinar características bioquímicas variáveis para o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. (Bals.) Vuill. Para isso foram analisados extratos proteicos de 15 linhagens através de focalização isoelétrica. Foram estudados 9 sistemas enzimáticos. As isoenzimas α -esterases mostraram um grande número de bandas para cada linhagem, e no total das linhagens. Este sistema enzimático polimórfico permite caracterizar linhagens, assim como identificar diferenças em uma população.

Recebido em 10/07/89

¹ CENARGEN/EMBRAPA - Caixa Postal, 102372, 70849 Brasília-DF, Brasil.

² LAMINIÈRE/INRA - 78280 Guyancourt, França.

INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico que pode atacar um grande número de espécies de insetos - pragas de cultura. No entanto, testes em laboratório demonstram que as diferentes linhagens diferem quanto à patogenicidade segundo o hospedeiro contaminado (FARGUES, 1981; RIBA, 1985). Essa característica quantitativa permite a separação de linhagens extremas, mas torna difícil a discriminação de linhagens próximas. Assim, para melhor caracterização das linhagens e avaliação de variabilidade genética da espécie, se faz necessário o estudo de características qualitativas fáceis de serem identificadas.

A análise de proteínas, utilizadas para estudos de polimorfismo bioquímico das espécies, foi proposta por alguns autores para o estudo dos fungos entomopatogênicos (DE CONTI *et al.*, 1980; BOUCIAS *et al.*, 1982; FARGUES, 1981). Esta análise permite a identificação de diferenças celulares que não aparecem a nível morfológico.

Este trabalho se propõe a analisar características variáveis para a espécie *B. bassiana* através da variabilidade eletroforética de um certo número de enzimas. A separação de proteínas por focalização isoeletrica foi escolhida por ser uma técnica com boa resolução e alta produtividade, além de ser um método simples que permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo. (BABACAUCH, 1980; ERSELIUS & VALLAVIEILLE, 1984).

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas monospóricas de 15 linhagens de *B. bassiana*, isoladas de hospedeiros e origem geográfica diferentes, foram utilizadas neste trabalho.

Os conídios foram obtidos após 12 dias de cultura das linhagens em meio semi-sintético que contém: 0,16g KH₂PO₄; 1,42g Na₂HPO₄; 1g KCl; 0,6g MgSO₄ 7H₂O; 0,7g NH₄NO₃; 1g de extrato de levedura; 10g de glicose, 10g de agar em 1000 ml de água destilada.

Para produção de micélio, inoculou-se uma suspensão de conídios no meio de cultura líquido Adamek (ADAMEK, 1965) agitado a 150 rpm. Após 7 dias a 25°C, a massa hifal foi separada do meio por sucessivas centrifugações com água destilada. O micélio obtido foi seco, pesado e triturado com nitrogênio líquido. A extração de proteínas solúveis foi feita por uma centrifugação do pó micelial adicionado de 1 ml de tampão (tris-EDTA 5.10⁻³, pH 8,2) por 90 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi estocado em ampola a -35°C. As isoenzimas foram separa

das em géis de poliacrilamida (10%), contendo 6% de anfolinhas (R) Pharmalytes da Pharmacia; em placas de 1x115x230 m. A migração durou 90 minutos a 5°C com potência constante (30W). Após a migração, os géis foram incubados em soluções de coloração para as seguintes enzimas analisadas: α -esterases, fosfatases alcalinas e ácidas, álcool desidrogenases, glutamato desidrogenases, malato desidrogenases, isocitrato desidrogenases, fosfoglucomutases e glutamato oxalacético transaminases (BREWER, 1970; DICKSON *et al.*, 1971; SHAW & PRASAD, 1970).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de identificação isoelétrica permitiu colocar em evidência o fenótipo das 15 linhagens estudadas nos 9 diferentes sistemas enzimáticos.

As α -esterase se mostraram as mais polimórficas para *B. bassiana*, pois um número importante de isoenzimas foi detectado. Várias moléculas de atividades foram identificadas, tanto no interior de cada linhagem como no conjunto de linhagens analisadas (Figura 1). O trabalho de DE CONTI *et al.* (1980), sobre *Metarhizium anisopliae*, e o de BOUCIAS *et al.* (1982) com isolados de *Hirsutella tompsonii*, demonstraram que as esterases são facilmente detectadas e polimórficas para estes fungos.

Para as álcool desidrogenases, glutamato desidrogenases e malato desidrogenases, com os métodos de coloração utilizados as isoenzimas não foram detectadas e não constam portanto na figura 1. Os outros sistemas, fosfoglucomutases glutamato oxalacético transaminases, fosfatases ácidas e alcalinas e isocitrato desidrogenases demonstraram uma baixa variabilidade entre as amostras analisadas (Figura 1).

Estes resultados podem estar relacionados a pequenas quantidades destas enzimas nas extrações proteicas, mas também à ausência de bandas e as diferenças reduzidas poderiam ser atribuídas a limitações das técnicas utilizadas. Outros métodos de coloração devem ser pesquisados para estes sistemas. As α -esterases, no entanto, parecem ser as mais indicadas para estudos de variabilidade genética de *B. bassiana* e o polimorfismo isoenzimático de populações deste fungo nos agrossistemas de interesse.

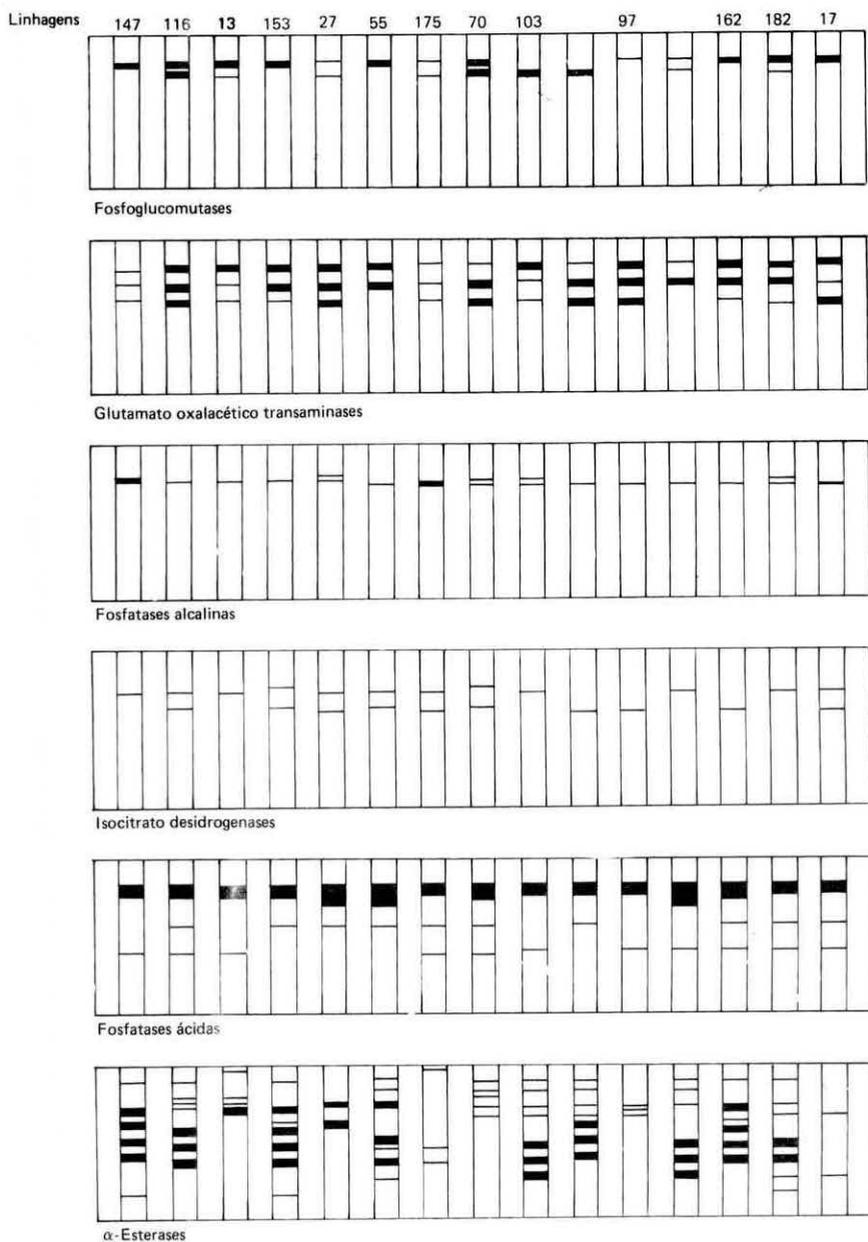


FIGURA 1 - Representação esquemática de zimogramas obtidos por isoeletoforalíse de proteínas solúveis do micélio de linhagens de *Beauveria bassiana*.

LITERATURA CITADA

- ADAMEK, L. Submerse culture of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Folia Microbiol.* 10: 255-257, 1965.
- BABACAUH, K.D. *Structure et dynamique des populations de Phytophthora sp., parasite du cacaoyer (Theobroma cacao L.)*. Paris, Université Paris Sud, 1980, 153 p. (Tese de Doutorado).
- BOUCIAS, D.G.; MC COY, C.M.; JOSLYN, O.J. Isozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutella thompsonii*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 329-337, 1982.
- BREWER, G.L. *An introduction to isoenzyme techniques*. New York, Acad. Press., 1970, 186 p.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L; DE SOUZA, M.; AZEVEDO, J.L. Eletrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia* 36: 293-294, 1980.
- DICKSON, D.W.; HUISING, O.; SASSER, J.N. Dehydrogenases and alkaline phosphatases and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus*. *J. Nematol.* 3:1-16, 1971.
- ERSELIUS, L. & VALLAVIEILLE, C. Variation in protein profiles of *Phytophthora* comparison of six species. *Trans. br. mycol. Soc.* 83:463- 472, 1984.
- FARGUES, J. *Spécificité des hyphomycètes entomopathogènes et résistance interspécifique des larves d'insetes*. Paris, Université Paris VI, 2 vol., 1981, 244 p. (Tese de Doutorado de Estado).
- RIBA, G. *Contribution à l'étude génétique de quelques hyphomycètes entomopathogènes*. Paris, Université Paris VI, 1985, 261 p. (Tese de Doutorado de Estado).
- SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gelelectrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochem. gen.* 4:297-320, 1970.