

# CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *NOMURAEA RILEYI* ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE ESTERASES<sup>1</sup>

LEILA MARIA COSTAMILAN<sup>2</sup>, LUIZ CANICIO LOCH<sup>3</sup> e AIDA TEREZINHA SANTOS MATSUMURA<sup>4</sup>

**RESUMO** - Procedeu-se à identificação dos padrões eletroforéticos das isoenzimas alfa e beta-esterases de nove isolados do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, obtidos a partir de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Huebner (Lep.: Noctuidae) coletadas em lavouras de soja (*Glycine max*) de municípios do Rio Grande do Sul: Cachoeirinha, Guafba, Marau, Nova Prata, Palmeira das Missões, Pelotas, Santa Rosa, Tapera e Taquari. A eletroforese de micélio e de conídios foi realizada em gel de poliacrilamida em migração horizontal e corrente contínua de 10 v/cm, com 50 mA/placa. Registraram-se as bandas eletroforéticas através do cálculo de suas migrações relativas (MR) e suas intensidades relativas. A comparação entre os isolados foi realizada através da análise fenética, pelo índice de similaridade de Jaccard; e o agrupamento, pelo método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA). Observou-se que a diferenciação entre os isolados ao nível das esterases foi bastante pronunciada, tanto em localização como em intensidade das bandas, o que permitiu a caracterização dos isolados. A origem geográfica não influenciou na detecção de semelhança entre eles.

Termos para indexação: isoenzimas alfa-esterase, beta-esterase, fungo entomógeno, *Anticarsia gemmatalis*, soja, micélio, conídios.

## CHARACTERIZATION OF *NOMURAEA RILEYI* ISOLATES THROUGH ELECTROPHORESIS OF ESTERASES

**ABSTRACT** - This work aims at identifying the electrophoretic patterns of alpha- and beta-esterases isoenzymes from nine isolates of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. The isolates were obtained from *Anticarsia gemmatalis* Huebner (Lep.: Noctuidae) larvae collected in soybean (*Glycine max* Merrill.) fields in counties located in Rio Grande do Sul, Brazil: Cachoeirinha, Guafba, Marau, Nova Prata, Palmeira das Missões, Pelotas, Santa Rosa, Tapera, and Taquari. The micelia and conidia of isolates were submitted to electrophoresis using horizontal migration in polyacrylamide gel and continuous electrical current of 10 v/cm and 50 mA/plate. Electrophoretic bands, as well as their relative migrations (RM) and their relative intensities, were recorded. The comparison among isolates was done through phenetic analysis, using mathematical models of Jaccard Association and grouping according to the UPGMA method (unweighted pair group method using arithmetic average). It was observed that the differentiation among isolates at esterase level was quite accentuated, both in location and intensity of bands, permitting the characterization of isolates. Sites of origin of isolates had no influence in the detection of similarities among them.

Index terms: alpha- and beta-esterases isoenzymes, entomogenous fungus, *Anticarsia gemmatalis*, soybean, micelia, conidia.

## INTRODUÇÃO

A técnica de eletroforese de zona em gel de poliacrilamida baseia-se na migração diferencial de proteínas em um campo elétrico, causada por diferenças de carga líquida das proteínas, que são um reflexo da superfície tridimensional das macromoléculas, ou, ainda, ao seu tamanho e forma (Avisé 1975). Esta técnica tem sido utilizada na resolução de problemas de classificação de fitopatógenos e de entomopatógenos, bem como na investigação, ao nível bioquímico,

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 9 de junho de 1992.

Extraído da Dissertação apresentada pela primeira autora na Univ. Fed. do Rio Grande do Sul (UFRGS), para obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia. Projeto financiado pelo CNPq (Proc. nº 405440/86).

<sup>2</sup> Enga. - Agra., M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPQ), Caixa Postal 569, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Dr., Dep. de Fitos., Fac. de Agron., UFRGS, Av. Bento Gonçalves 7712, Caixa Postal 776, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS.

<sup>4</sup> Bióloga, Dra., Dep. de Fitos., Fac. de Agron., UFRGS.

da resistência de hospedeiros a patógenos e do efeito destes no metabolismo de seu hospedeiro (De Conti et al. 1980, Tigano & Riba 1990, Matsumura 1991).

O fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson ocorre em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera, sendo um dos mais importantes agentes de controle biológico no Brasil; cerca de 90% dos hospedeiros de *N. rileyi* pertencem à ordem Lepidoptera (Alves 1986). A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Huebner (Lep., Noctuidae), uma das principais pragas desta lavoura no Brasil, é controlada eficientemente por este fungo. Períodos de alta umidade relativa (acima de 70%) e temperatura em torno de 26°C, no verão, favorecem o desenvolvimento do fungo (Alves 1986), causando a “doença-branca” nas lagartas, diminuindo, ou mesmo evitando, a aplicação de inseticidas para o controle desta praga.

Estudos eletroforéticos com três patótipos de *N. rileyi* foram desenvolvidos por Joslyn & Boucias (1981), a partir de três hospedeiros: *Heliothis zea* (Lep.: Noctuidae), *Pseudoplusia includens* (Lep.: Noctuidae) e *A. gemmatalis* Huebner. Foram identificadas 39 bandas isoenzimáticas diferentes entre 17 sistemas enzimáticos testados, incluindo alfa e beta-esterases. Os patótipos de *H. zea* e de *P. includens* apresentaram padrões muito semelhantes entre si e distintos dos evidenciados pelo patótipo isolado de *A. gemmatalis*. Os dados eletroforéticos confirmaram as diferenças taxionômicas esperadas, baseadas na especificidade de hospedeiro, evidenciando a utilidade deste tipo de análise na distinção de isolados de *N. rileyi* intimamente relacionados.

Neste trabalho, fez-se a eletroforese de amostras de *N. rileyi* coletadas em nove municípios do Estado do Rio Grande do Sul, com os objetivos de caracterizar estes isolados através de seus padrões esterásicos, e de estudar, por análise fenética, a similaridade entre eles, em função de sua proximidade geográfica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e no Laboratório de Eletroforese do Departamento de Genética, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no ano de 1987.

As amostras de *N. rileyi* foram isoladas a partir de lagartas de *A. gemmatalis* mortas, com o sintoma da “doença-branca”, coletadas em lavouras de soja de nove municípios do Rio Grande do Sul, na safra 1986/1987. Os municípios e o código de identificação dos isolados foram: Cachoeirinha (CH), Guaíba (GU), Marau (MA), Nova Prata (NP), Palmeira das Missões (PM), Pelotas (PE), Santa Rosa (SR), Tapera (TP) e Taquari (TO) (Fig. 1).

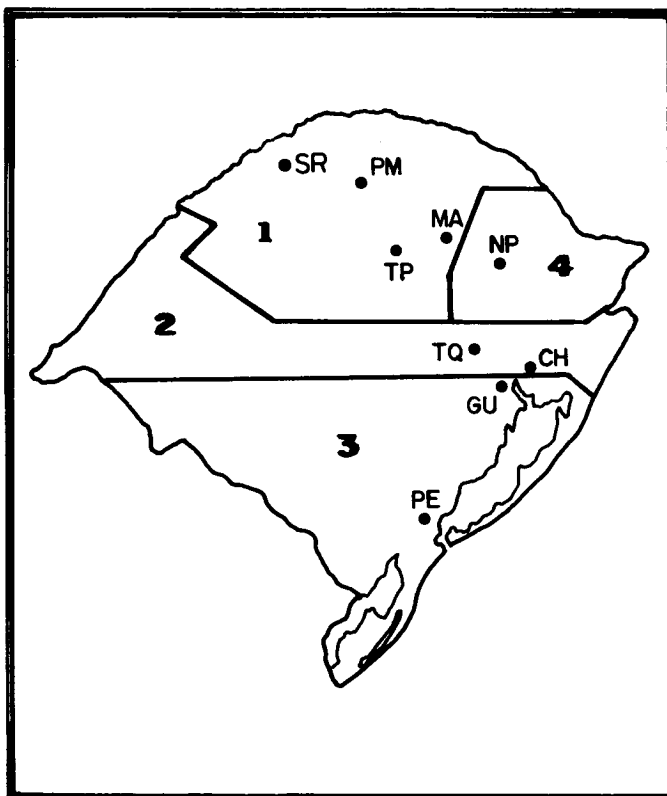
Utilizou-se o meio de cultura Sabourand maltose ágar enriquecido com 1% de extrato de levedura-SMAY (Kish & Allen 1976) para o desenvolvimento do fungo, em placas-de-Petri. Após a inoculação com uma suspensão de esporos, as placas, vedadas com fita adesiva de plástico, foram levadas a uma estufa, à temperatura de 26 ± 1°C e fotoperíodo de doze horas.

Os isolados, após a purificação, foram inoculados em lagartas de *A. gemmatalis* de terceiro instar, visando à reativação do entomopatógeno e à uniformização das amostras. Posteriormente, os materiais foram reisolados e armazenados à temperatura de 4°C durante duas semanas, até a realização da eletroforese.

Procedeu-se à migração eletroforética das isoenzimas alfa e beta-esterases a partir de macerados de micélio e de contidos de cada isolado, aplicados, com duas repetições, em gel de poliacrilamida a 8%. No preparo do gel e na homogeneização das amostras, foram utilizados os tampões A e B de Scandalios (1969), na proporção de 1A:9B, em seu pH original de 8,3. A composição dos dois tampões era a seguinte:

Tampão A: borato de lítio pH 8,3	0,24 M
hidróxido de lítio	1,20 g
ácido bórico (anidro)	11,89 g
água destilada	até 1.000 ml
Tampão B: tris citrato pH 8,3	0,0595 M
tris	6,20 g
ácido cítrico	1,60 g
água destilada	até 1.000 ml

A migração horizontal ocorreu durante quatro horas, em corrente contínua de 10 v/cm com 50 mA/placa. Após, o gel foi revelado através de coloração en-



### Municípios

PM - Palmeira das Missões  
 TP - Tapera  
 MA - Marau  
 SR - Santa Rosa  
 NP - Nova Prata  
 TQ - Taquari  
 CH - Cachoeirinha  
 GU - Guaíba  
 PE - Pelotas

### Regiões Climáticas

**1**- Planalto Médio, Missões e Alto Vale do Uruguai;  
**2**- Baixo Vale do Uruguai, Depressão Central e Litoral Norte;  
**3**- Campanha, Serra do Sudeste e Litoral Sul;  
**4**- Serra do Nordeste e Planalto Superior.

FIG. 1. Mapa do Rio Grande do Sul com a localização dos municípios de origem dos isolados de *N. rileyi* e as regiões climáticas do Estado.

zimática específica (Matsumura 1991), segundo a composição descrita por Scandalios (1969), com algumas modificações:

$\alpha$ -naftil acetato (1%)	2 ml
$\beta$ -naftil acetato (1%)	3 ml
Fast Blue RR (sal)	50,0 mg
Tampão C*	50,0 ml
Tampão D**	10 ml
Água destilada	40 ml

\* Tampão C: fosfato pH 4,3  
 0,2 M  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ..... 27,80 g  
 água destilada ..... até 1.000 ml

\*\* Tampão D: fosfato pH 9,2  
 0,2 M  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ..... 53,63 g  
 água destilada ..... até 1.000 ml

O gel foi mantido na solução de revelação por 1 h 30 min, a 37°C. Após, foi lavado em água destilada e fixado em solução de água, álcool metílico e ácido acético, na proporção de 5:5:1, durante 15 minutos. Após este período, o gel foi envolto em película de plástico e armazenado à temperatura de 4°C.

Na análise, foram registradas as bandas enzimáticas, a distância real de migração (em relação ao seu ponto de aplicação) e suas intensidades relativas, de acordo com o critério estabelecido de forte, média, fraca e fraquíssima. A comparação entre os isolados baseou-se no cálculo do MR (migração relativa) (Matsumura 1991), dividindo-se a distância de migração do ponto médio da banda pela distância de mi-

gração da banda mais distante, ou banda anódica, presente em todos os isolados, cujo MR foi considerado 1,00.

Cada banda foi tomada como uma variável qualitativa (ausência ou presença) para a análise fenética. Para se verificar a existência de homogeneidade intra-específica, calculou-se o índice de similaridade de Jaccard (Sneath & Sokal 1973), que reflete o número de bandas idênticas que dois grupos (linhagens, populações etc.) compartilham, sendo expresso como uma fração das variantes isoenzimáticas idênticas sobre o número total de variantes apresentadas pelos grupos. O método de agrupamento utilizado foi o UPGMA, ou método não-ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética. Calculou-se, ainda, o coeficiente de correlação cofenética, que é uma estimativa da medida da distorção interna da técnica e avalia o grau em que o fenograma representa os valores da matriz de semelhança inicial (Sokal & Rohlf 1962).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência das bandas eletroforéticas nos sistemas isoenzimáticos das alfa e beta-esterases dos diferentes isolados de *N. rileyi* está representada pelo zimograma da Fig. 2. Analisando-o, observa-se que a diferenciação entre os isolados ao nível das esterases foi bastante pronunciada, em termos de distância de migração e intensidade das bandas. Houve, em todos, a presença de uma banda anódica com idêntica migração relativa (MR = 1,00) e com intensidade aproximadamente uniforme. As bandas

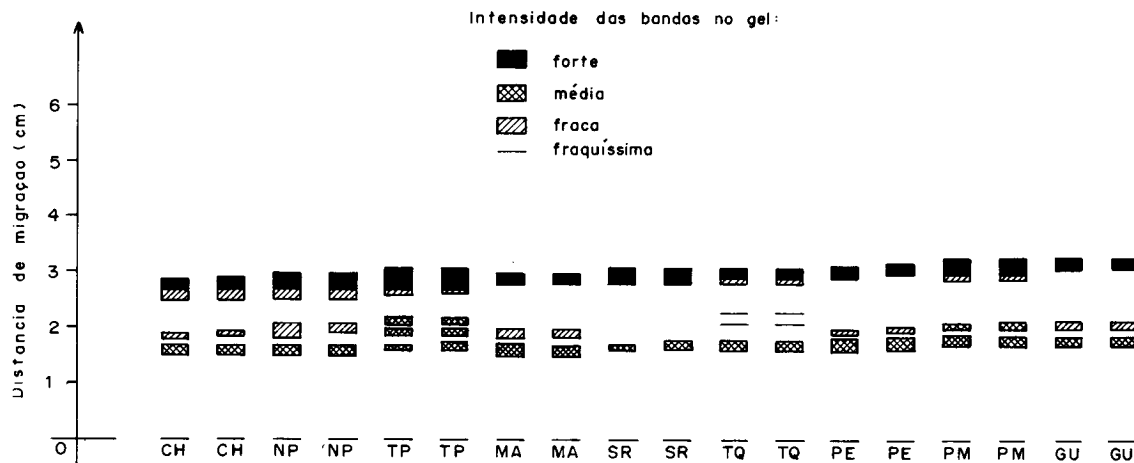


FIG. 2. Zimograma dos padrões eletroforéticos nos sistemas alfa e beta-esterases de isolados de *N. rileyi*. Código dos isolados de acordo com a Fig. 1.

mais próximas ao ponto de aplicação provavelmente constituem uma única banda, comum a todos os isolados. A variação observada ocorreu entre estas bandas extremas.

A análise fenética dos resultados possibilitou a elaboração do fenograma apresentado na Fig. 3. Constatou-se que, de maneira geral, formaram-se dois grupos distintos entre os nove

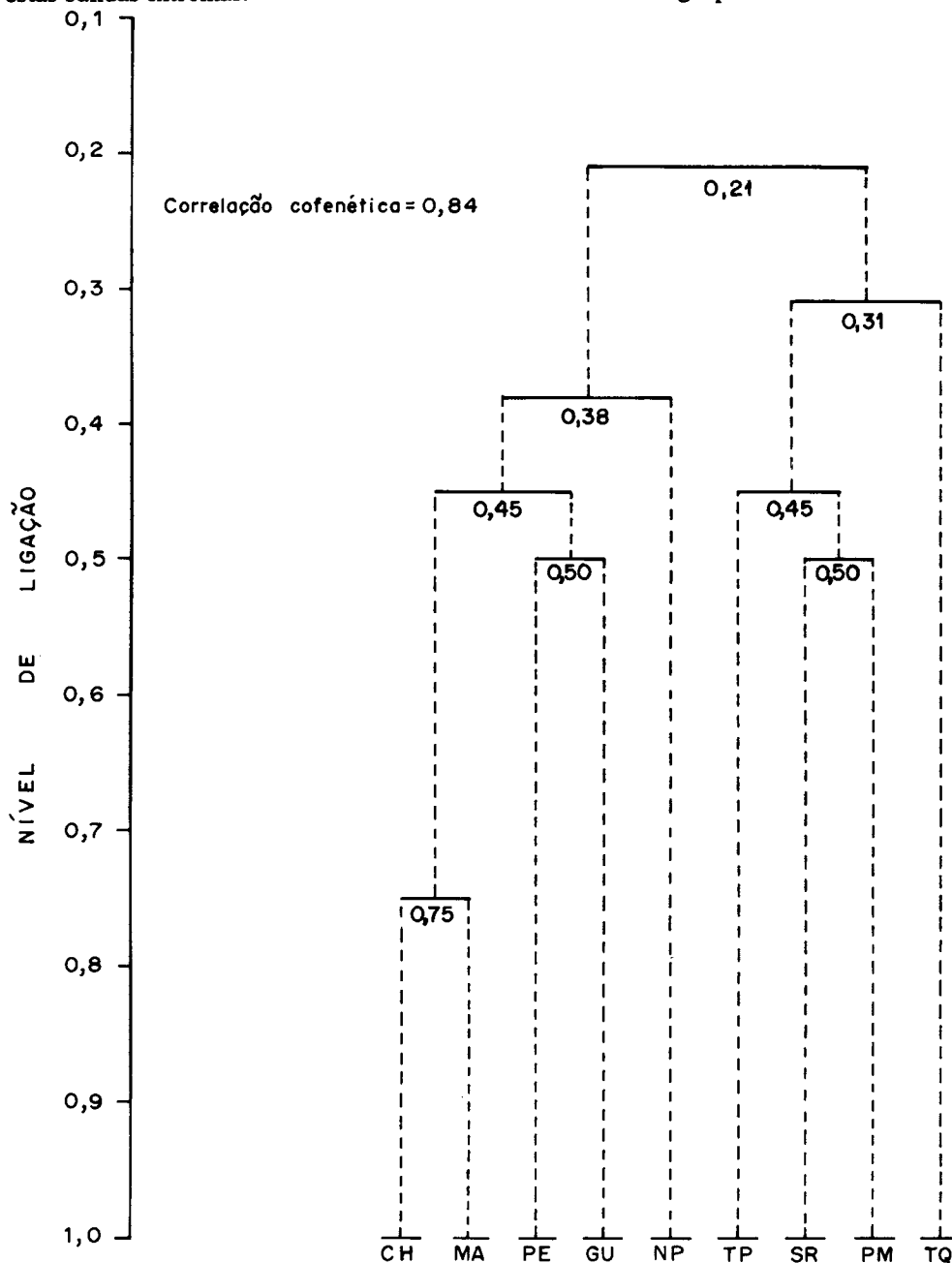


FIG. 3. Fenograma de isolados de *N. rileyi* com base nos padrões eletroforéticos dos sistemas alfa e beta-esterases, analisados pelo índice de similaridade de Jaccard e agrupados por UPGMA. Código dos isolados de acordo com a Fig. 1.

isolados. O primeiro grupo consistiu dos isolados CH, MA, PE, GU e NP; o segundo, formou-se com TP, SR, PM e TQ. Os isolados CH e MA apresentaram o nível de ligação mais elevado (0,75), o que significou que, entre os nove isolados, estes foram os mais semelhantes. A seguir, em nível decrescente de similaridade, uniram-se os isolados PE e GU, no primeiro grupo, e SR e PM, no segundo, ao nível de 0,50, e assim sucessivamente, até os dois grupos tornarem-se unidos ao nível de 0,21. Por este tipo de análise, o isolado TQ pode ser considerado o mais diferenciado, pois apresentou o mais alto nível individual de ligação.

O coeficiente de correlação cofenética calculado foi de 0,84, e mostrou-se satisfatório, pois valores acima de 0,80 indicam uma boa representação da matriz de semelhança inicial por parte do fenograma.

Não se constatou uma relação clara entre a semelhança genética dos isolados e a sua proximidade geográfica. Os isolados que foram considerados mais assemelhados (CH e MA) são de regiões climáticas diferentes: um é do município de Cachoeirinha, que se localiza na Depressão Central, e o outro é de Marau, município do Planalto Médio. No caso do grupo formado pelos isolados TP, SR, PM e TQ, sem a ocorrência do isolado de Taquari (TQ), da Depressão Central, poder-se-ia considerar que os isolados do Planalto Médio e Alto Vale do Uruguai (Tapera-TP, Santa Rosa-SR e Palmeira das Missões-PM), por serem regiões tipicamente produtoras de soja, teriam uma semelhança genética bastante grande. Outro fator que poderia influir na diversidade genética apresentada pelos nove isolados de *N. rileyi* seria a variação própria do hospedeiro, no caso dos indivíduos da espécie *A. gemmatalis*, o que não foi considerado neste estudo.

Esta análise de semelhanças entre isolados teve como base apenas a manifestação das isoenzimas alfa e beta-esterases, obtidas através de processo eletroforético. Embora sejam consideradas enzimas que refletem a diversidade do ambiente, uma caracterização mais precisa de isolados deve levar em consideração um maior número de aspectos, como caracteres morfoló-

gicos e fisiológicos, entre outros. A análise eletroforética reflete a identificação de uma possível ocorrência de variabilidade intra-específica ao nível molecular, o que foi constatado nos sistemas alfa e beta-esterases para os nove isolados de *N. rileyi*.

## CONCLUSÕES

1. Houve diferenciação entre isolados de *N. rileyi* com base nos padrões eletroforéticos de micélio e de conídios nos sistemas das isoenzimas alfa e beta-esterases.

2. A proximidade geográfica dos locais de origem das lagartas contaminadas por *N. rileyi* não influenciou na detecção de semelhanças entre os diferentes isolados.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: \_\_\_\_\_. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.73-126.
- AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology**, v.23, p.465-481, 1975.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; DE SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarrhizium anisopliae*. **Experientiae**, Basel, v.36, p.293-294, 1980.
- JOSLYN, D.J.; BOUCIAS, D.G. Isozyme differentiation among three pathotypes of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.27, n.3, p.364-366, 1981.
- KISH, L.P.; ALLEN, G.E. **The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatalis* in soybean**. Gainesville: University of Florida, 1976. 46p.
- MATSUMURA, A.T.S. **Variabilidade intraespecífica quanto à patogenicidade, característica de cultura e padrão isoesterásico em populações naturais de *Bipolaris sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*)**. Porto Alegre: UFRGS, 1991. 262p. Tese de Doutorado.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. A review. **Biochemical Genetics**, v.3, p.37-39, 1969.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 573p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of

dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p.33-40, 1962.

TIGANO, M.S.; RIBA, G. Polimorfismo das  $\alpha$ -esterases e da patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.19, n.2, p.315-327, 1990.