

Caracterização filogenética de isolados de *Beauveria bassiana* originados de diferentes insetos hospedeiros

Phylogenetic characterization of Beauveria bassiana isolates originating from different host insects

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão^{1*}, Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva^{1,3}, Vanildo Alberto Leal Bezerra Cavalcanti², Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra¹

¹Laboratório de Genômica, Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Avenida General San Martin, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

²Laboratório de Controle Biológico, Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Recife, PE, Brasil

³Bolsista de Pós-Doutorado PNPD/CAPES/FINEP-IPA

*autor correspondente

✉ adalia.mergulhao@ipa.br

RESUMO: Este trabalho objetivou avaliar a variabilidade genética usando a região do espaço interno transcrito (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) e a filogenia de cinco isolados de *Beauveria bassiana*: IPA145, IPA148, IPA223, IPA225 e IPA226, obtidos de diferentes hospedeiros e origens geográficas, provenientes do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA. A região ITS foi amplificada usando os primers ITS1 e ITS4, em que foi observado um amplicon com tamanho médio de 800 pb, o qual foi sequenciado. As sequências de DNA dos isolados de *Beauveria* foram comparadas com as sequências do banco de dados (GenBank). Os resultados mostram que todos os isolados, com exceção do IPA145, apresentaram-se como grupo monofilético. O IPA145 apresentou uma identidade genética com *Cordyceps bassiana* e *B. bassiana* de 99%. O IPA148 foi o mais distante geneticamente com relação aos demais, com menos de 40% de similaridade. A maioria dos isolados de *Beauveria* estudados mostrou-se distinta filogeneticamente.

PALAVRAS-CHAVE: Fungo entomopatogênico, filogenia, ITS, *Cordyceps*, rDNA.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate genetic variability using the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA) and the phylogeny of five *Beauveria bassiana*: IPA145, IPA148, IPA223, IPA225 and IPA226, obtained from different hosts and geographical origin from the Biological Control Laboratory of the Agronomic Institute of Pernambuco - IPA. The ITS region was amplified using primers ITS1 and ITS4, where an amplicon with average size of 800 bp was observed and sequenced. The DNA sequences of *Beauveria* isolates were compared with sequences in the database (GenBank). The results show that all isolates, except IPA145, were presented as a monophyletic group. IPA145 showed a genetic identity of 99% with *Cordyceps bassiana* and *B. bassiana*. IPA148 was the most genetically distant from the others, with less than 40% similarity. Most of the *Beauveria* isolates studied proved to be phylogenetically distinct.

KEYWORDS: Entomopathogenic fungus, phylogeny, ITS, *Cordyceps*, rDNA.

Beauveria bassiana Bals. Vuill. (Deuteromycota: Hyphomycetes) é um fungo entomopatogênico, que existe naturalmente nos solos. É de grande interesse no controle biológico de diversas pragas agrícolas, o que lhe confere importância econômica no Brasil. Destaca-se por apresentar um amplo espectro de insetos hospedeiros, que podem ser controlados por este fungo (XIAO et al., 2012;

ALVES et al., 2012). Por possuir uma grande vantagem sobre os pesticidas convencionais, devido à sua persistência na população hospedeira, por reduzir a longevidade e ocasionar altas taxas de mortalidade em larvas e adultos das populações de insetos, torna-se um grande aliado para o uso como controle biológico (ALVES, 1998; ROBERTS; CASTILLO, 1980). Outra grande vantagem do uso de fungos entomopatogênicos é a sua resistência a alguns pesticidas, como estudado por Kaaya e Hassan (2000), que observaram que estes fungos reduzem a frequência do uso de acaricida químico, bem como diminuem a necessidade de tratamentos de doenças causadas pelo carrapato. A *B. bassiana*, além de ser de fácil dispersão, possui grande variedade de hospedeiros (Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera e Orthoptera). Segundo Rehner e Buckley (2005), as espécies de *B. bassiana* que infectam apenas um hospedeiro é chamada de *sensu stricto* e aquelas que infectam mais de um hospedeiro é chamada de *sensu lato*. Já Rehner et al. (2011) concluíram, através de análise dos genes RNA polimerase I da subunidade grande (RPB1), RNA polimerase II da subunidade grande (RPB2) e subunidade alfa do factor de alongamento (TEF), que *B. bassiana* é um agregado de cinco espécies, tais como *B. bassiana sensu stricto*, *B. varroae*, *B. kipukae*, *B. pseudobassiana* e *B. sungu*. Fernandes et al. (2006), trabalhando com vários isolados de *Beauveria* de diferentes regiões geográficas, verificaram diferenças genéticas quando utilizaram o marcador da região ITS. *Beauveria* apresenta atividades de proteases e quitinases que hoje são aceitas como fatores determinantes na virulência dos fungos entomopatogênicos, que passam a ter habilidade de hidrolisar os principais polímeros constituintes da cutícula, proteínas e quitina, organizados em camadas denominadas exo e endocutícula (SILVA et al., 2006; SAMISH; GLAZER, 1991; St. LEGER; COOPER; CHARLEY, 1986). Apesar de haver um interesse crescente no uso deste agente de controle biológico, há pouco conhecimento acerca do seu efeito sobre o meio ambiente. As espécies do gênero *Beauveria* têm sido reportadas por produzir metabólitos secundários, como bassianina, bassiacridina e beauvericina, entre outros (QUESADA-MORAGA; VEY, 2004). Hoje, a grande pergunta com relação ao conceito de espécies morfológicas em *Beauveria* é se o padrão de variação morfofisiológica tem relação com a filogenia; outra questão é se as espécies morfológicas são crípticamente diversas, ou seja, se estas espécies estão reprodutivamente isoladas umas das outras, apesar de sua morfologia ser muito semelhante (SCHAEFER, 1998).

De acordo com Devi et al. (2001), alguns isolados de *Beauveria* têm sido avaliados devido ao seu potencial como biopesticidas, porém as características fenotípicas não são suficientes para distinguir os diferentes tipos de isolados estudados (GAITAN et al., 2002). Nesta perspectiva, estudos moleculares envolvendo a técnica da PCR e os clusters gênicos do rDNA (DNA ribossomal) têm facilitado a identificação taxonômica e contribuído para expandir o conhecimento sobre a diversidade e distinguir diferenças entre gêneros e isolados de uma mesma espécie de *Beauveria* (WADA et al., 2003; COATES; HELLMICH; LEWIS, 2002). Recomenda-se que

o fragmento de rDNA a ser amplificado para a análise da diversidade intraespecífica ou entre grupos de isolados com elevada afinidade filogenética deve incluir o espaço interno transcrito (ITS1 e ITS2), uma região que apresenta maior variabilidade tanto na composição de bases quanto no tamanho do fragmento (MENEZES et al., 2010; ROSADO; DUARTE; MENDONÇA-HAGLER, 1999). Segundo Carneiro et al. (2008), a variabilidade genética – inter e intraespecífica – pode ser capaz de identificar e caracterizar isolados de *Beauveria*. Dessa forma, o trabalho em questão teve como objetivo avaliar a variabilidade genética da região do espaço interno transcrito (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) e a filogenia de isolados de *B. bassiana* obtidos de diferentes hospedeiros e origens geográficas distintas, provenientes do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA.

Os cinco isolados de *Beauveria sensu lato* foram obtidos da coleção do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA. Cada isolado foi oriundo de hospedeiros diferentes e de regiões geográficas distintas, como descrito a seguir: IPA145 (Coleoptera: Curculionidae; Indeterminado); IPA148 (Coleoptera: Coccinellidae; Indeterminado); IPA223 (Lepidoptera: Pyralidae, Paraíba-BR); IPA225 (Orthoptera: Acrididae; Recife-PE-BR); IPA226 (Coleoptera: Curculionidae; Cabo de Santo Agostinho-PE-BR). A extração de DNA foi realizada colocando os isolados para crescer em 25 mL de meio BDA líquido por 72 h, à temperatura ambiente (28 °C), sem agitação. Após este período, 20 g do micélio foram macerados em nitrogênio líquido, sendo então utilizado o kit de extração de DNA genômico da QIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit), conforme metodologia do fabricante. O DNA extraído foi quantificado usando o marcador de massa molecular (Invitrogen); a qualidade e a quantidade do DNA foram visualizadas em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5X a 100 V e corado com SybrGold (Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada utilizando os *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE et al., 1990). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5%, tampão TBE 0,5X e corados com SybrGold em corrente elétrica de 100 V, sendo visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em fotodocumentador (LPIX-Loccus Brasil). Os fragmentos de ITS1 e ITS4 amplificados foram purificados usando a metodologia de acetato de amônio a 7M (LYRA, 2001). O sequenciamento do DNA foi realizado na plataforma do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN-EMBRAPA). As sequências direta e reversa foram alinhadas no programa BioEdit v.7.0.0, e foi realizada a análise de reconstrução filogenética com o programa MEGA v.4.0 (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004), usando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) com teste de filogenia Bootstrap 1000 repetições, *gaps* com deleção Pairwise e modelo de nucleotídeo: Maximum Composite Likelihood Tamura-Nei. Sequências do banco de dados de genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram utilizadas para auxiliar as análises fenéticas com base nas sequências de nucleotídeos obtidas.

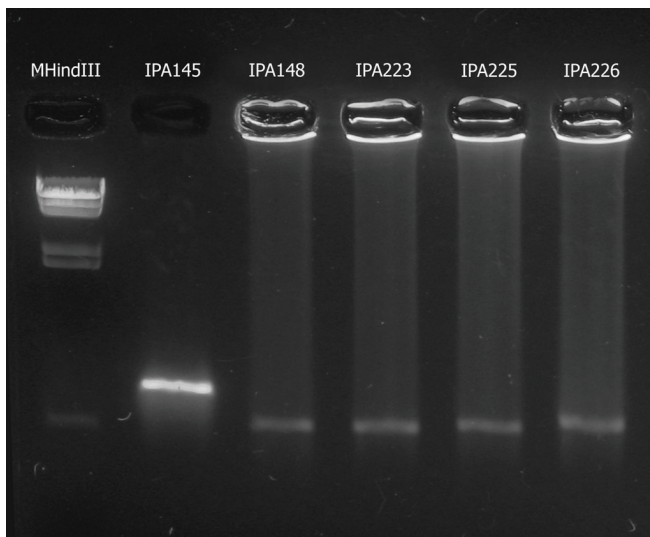


Figura 1. Amplificação da região ITS do rDNA de isolados de *Beauveria* (IPA145, IPA148, IPA223, IPA225 e IPA226) obtidos da coleção do Laboratório de Controle Biológico do IPA, Marcador (M): *Hind*III pb Ladder.

O tamanho dos fragmentos amplificados dos cinco isolados de fungos a partir da utilização dos iniciadores ITS1 e ITS4 foi de aproximadamente 800 pb, e apenas um *amplicon* foi gerado. O sequenciamento da região ITS do isolado IPA145 revelou homologia de 99% com as sequências de *B. bassiana* depositadas no GenBank (Figuras 1 e 2). Os fragmentos amplificados visualizados na mesma posição no gel de agarose foram considerados de mesmo tamanho. Segundo Carneiro et al. (2004), um fragmento amplificado de 600 pb de isolados de *B. bassiana* foi sequenciado e revelou uma homologia de mais de 97% com sequências do rDNA de *B. bassiana* depositadas no GenBank. De acordo com Carneiro et al. (2008), sequências da região ITS do rDNA são capazes de identificar e caracterizar isolados de *Beauveria*, e são úteis para detectar variabilidade inter e intraespecífica dentro deste gênero. Entretanto, o marcador utilizado neste estudo não diferenciou todos os isolados de *Beauveria* no nível de espécie. Desta forma, a região ITS foi sequenciada, para uma melhor análise da variabilidade genética entre os grupos

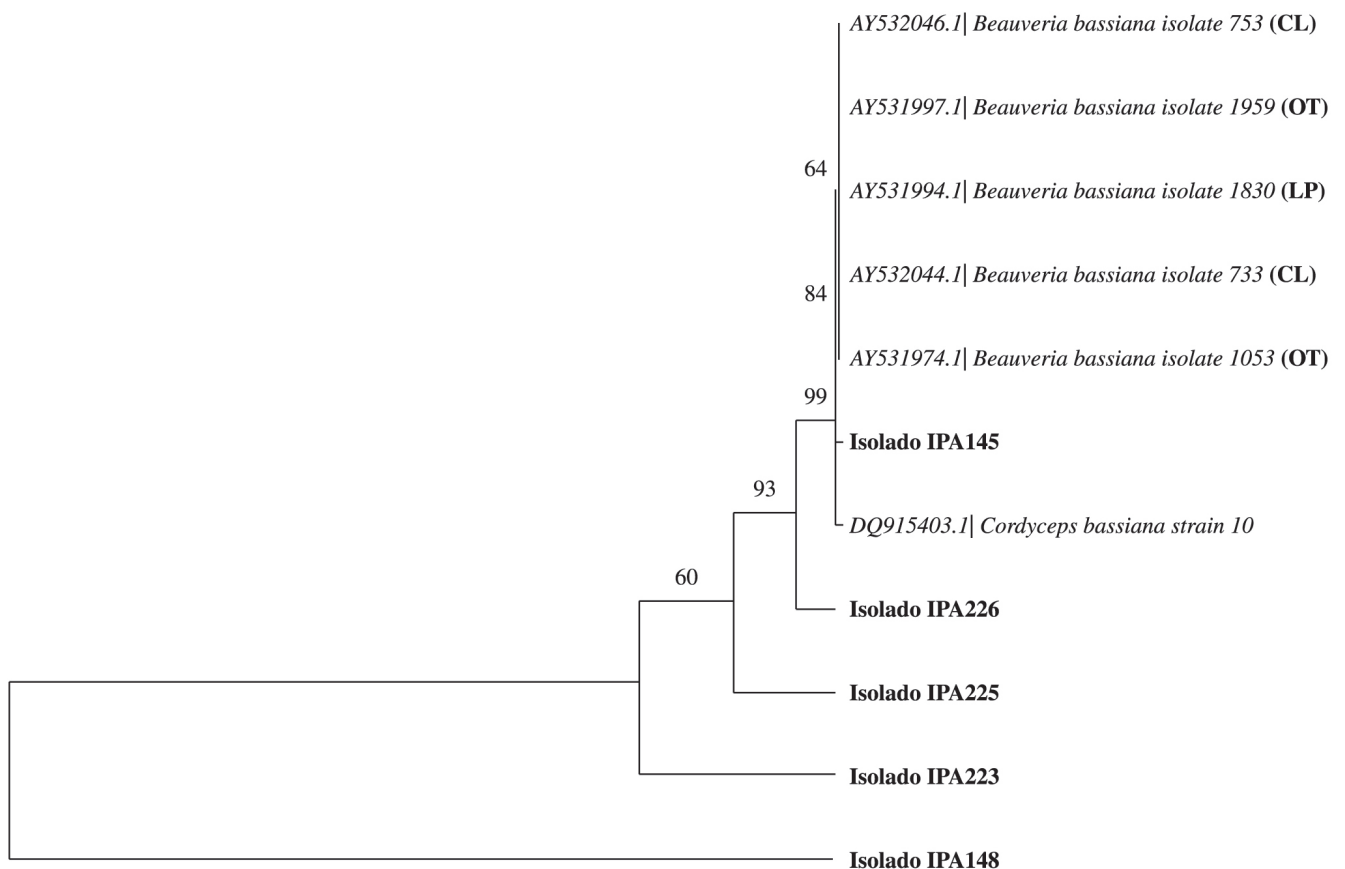


Figura 2. Árvore filogenética construída com base no sequenciamento da região ITS1 e ITS4 de isolados de *Beauveria* (IPA145, IPA148, IPA223, IPA225 e IPA226) da coleção do IPA alinhadas pelo programa BioEdit v.7.0 usando Neighbor-Joining (NJ) com Tamurai-Nei e testes de 1000 Bootstrap no programa MEGA v.4.0.

de isolados de *Beauveria* estudados. Utilizaram-se sequências do GenBank – AY532046 e AY532044 isoladas de Coleoptera (CL); AY531997 e AY531974 isoladas de Orthoptera (OT) e AY531994 isolada de Lepidoptera (LP) – para comparar com as nossas sequências (Figura 2). Os resultados demonstraram que todos os isolados estudados, com exceção do IPA145, apresentaram-se como grupo monofilético, resultado este diferente do encontrado por Rehner e Buckley (2005), que também analisaram a região ITS em isolados de *Beauveria* coletados no Brasil de diferentes hospedeiros. Usamos, para comparar com os nossos dados, sequências de *B. bassiana* do GenBank que tinham hospedeiros de mesma Ordem dos insetos. Entretanto, observamos que, neste caso, independentemente de serem isolados de hospedeiros de uma mesma ordem – como Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera –, não houve influência na taxonomia destes isolados, mostrando serem isolados distintos filogeneticamente, exceto para o isolado IPA145. O interessante foi que o IPA145 apresentou uma identidade genética com *Cordyceps bassiana* de 99%. O IPA148 foi o mais distante geneticamente com relação aos demais isolados estudados, com menos de 40% de similaridade. Podemos inferir, diante dos resultados, que a filogenia molecular de *Beauveria* não está definida, devido ao pouco entendimento taxonômico atual deste gênero. Segundo Rehner e Buckley (2005), que trabalharam com 87 isolados de *Beauveria* e *Cordyceps* oriundos de toda parte do mundo, encontrados em diferentes hospedeiros, observou-se que a diversidade filogenética pode indicar uma história de diversificação críptica e que as análises moleculares são ferramentas úteis para a avaliação de espécies, para elucidar a história evolutiva e ecológica destes gêneros.

Podemos dizer que, neste trabalho, as diferentes origens dos fungos estudados e os distintos hospedeiros dos quais foram isolados mostraram uma distância genética entre si e que estudos polifásicos (moleculares, culturais) e genéticos, como as teleomórfas de *Cordyceps* e anamórfas de *Beauveria*, podem dar resultados relevantes para futuras pesquisas deste grupo de grande importância, que são os fungos entomopatogênicos. Além do mais, essas informações irão beneficiar futuros estudos moleculares no que diz respeito à interação inseto-fungo e facilitar o custo-benefício do desenvolvimento de *Beauveria* como micoinseticidas e biocatalisadores microbianos, resultando em benefícios diretos ao pequeno produtor brasileiro.

Referências

- ALVES, L. F. A. et al. First record of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on adults of cassava lace bug *Vatiga manihotae* (Drake) (Hemiptera: Tingidae) in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 309-311, 2012.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. p. 289-381.
- CARNEIRO, A. A. et al. **Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas do milho – *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n. 93).
- CARNEIRO, A. A. et al. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Recife, v. 43, n. 4, p. 513-520, 2008. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/491183>>.
- COATES, B. S.; HELLMICH, R. L.; LEWIS, L. C. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 40-50, 2002. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756201005305>
- DEVI, K. U. et al. Laboratory evaluation of the virulence of *Beauveria bassiana* isolates to the sorghum shoot borer *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) and their characterization by RAPD-PCR. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 131-137, 2001. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016633427739>
- FERNANDES, E. K. K. et al. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, Berlin, v. 98, p. 324-332, 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-005-0058-y>
- GAITAN, A. et al. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and other insects. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 1307-1314, 2002. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756202006676>
- KAAYA, G. P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 24, p. 913-926, 2000. Disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/acarology/saas/e-library/pdf000200/a000169.pdf>.
- LYRA, M. C. C. P. **Estudios genéticos y fisiológicos del gen *nolT* de la región específica de cultivar, *nolXWBTUV*, de la bacteria de amplio rango de nodulación HH103 y sus implicaciones en el Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS)**. 2001. 159 f. Tese (Doutorado)-Universidad de Sevilla, Espanha, 2001.
- MENEZES, J. P. et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>
- QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 441-452, 2004. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756204009724>
- REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 84-98, 2005. Disponível em: <<http://www.mycologia.org/content/97/1/84.full.pdf>>.
- REHNER, S. A. et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, New York, v. 103, p. 1055-1073, 2011. Disponível em: <<http://www.mycologia.org/content/103/5/1055.full.pdf+html>>.
- ROBERTS, D. W.; CASTILLO, J. M. Bibliography on pathogens of medically important arthropods. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 58, p. 190-197, 1980.
- ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Eds.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 429-228.

- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/4/4/406.full.pdf+html>>.
- SAMISH, M.; GLAZER, J. Killing ticks with parasitic nematodes of insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 58, p. 281-282, 1991.
- SCHAEFER, C. W. Phylogeny, Systematics, and Practical Entomology: The Heteroptera (Hemiptera). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 499-511, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0301-80591998000400001>
- SILVA, A. S. et al. Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1944-1947, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000600047>
- St. LEGER, R. J., COOPER, R. M.; CHARLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 47, n.2, p. 167-177, 1986. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(86\)90043-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(86)90043-1)
- TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, 2004. Disponível em: <<http://www.pnas.org/pnas.0404206101>>.
- WADA, S. et al. Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) by RFLP or the rDNA-ITS regions. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 38, p. 551-557, 2003. <http://dx.doi.org/10.1303/aez.2003.551>
- WHITE T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322. PMID:1696192.
- XIAO, G. et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, London, v. 483, p. 1-10, 2012. <http://dx.doi.org/10.1038/srep00483>(2012).

Recebido: 27/02/2013
Aprovado: 17/12/2013