



# Variabilidad de las esterasas de *Metarhizium anisopliae*

María Elena Estrada Martínez, Dolores R. Piñón, Mercedes C. Capote

Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Avenida Van Troi 172031, Boyeros, CP 19210, Ciudad Habana, Cuba.

## Resumen

Se determinó la variabilidad de las enzimas de tipo esterasa del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 8,5%. Se analizaron los zimogramas de 10 aislamientos de diferentes orígenes geográficos e insectos hospedantes y se distinguieron seis patrones de esterasas. El análisis electroforético permitió establecer diferencias y semejanzas entre los aislamientos lo que evidenció el polimorfismo *M. anisopliae* para el sistema enzimático estudiado.

## Palabras clave

*Metarhizium anisopliae*, Esterasas

## Variability in esterases of *Metarhizium anisopliae*

## Summary

The variability in esterases of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* was determined electrophoretically on 8,5% polyacrylamide gel. Ten isolates from diverse taxonomic groups of insects were analyzed. The electrophoretic analysis showed differences and similarities between these isolates and it was possible to distinguish six different patterns. The results obtained show a great polymorphism for the esterase system of *M. anisopliae*.

## Key words

*Metarhizium anisopliae*, Esterases

*Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin es un hongo entomopatógeno ampliamente utilizado en la lucha biológica contra los insectos plagas [1-3]. En Cuba, se utiliza este hongo de forma experimental en el cultivo de la caña de azúcar para el control de las poblaciones larvales de *Conoderus sp.* (Coleoptera: Elateridae) [4].

Se conoce que el estudio de las enzimas contribuye al conocimiento de la variabilidad de diferentes especies de hongos entomopatógenos [5-7]. Este análisis permite establecer diferencias no detectables desde el punto de vista morfológico [8]. Diversos autores han estudiado diferentes sistemas enzimáticos de las especies *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Tolypocladium cylindrosporum* y *Tolypocladium extinques* [9-11] y han apreciado diferencias entre aislamientos de una misma especie.

El interés agronómico y ecológico de las aplicaciones de *M. anisopliae* en el cultivo de la caña de azúcar para el control de las larvas de *Conoderus sp.*, precisa conocer las diferencias enzimáticas entre los aislamientos del microorganismo de forma tal que éstos puedan ser identificados luego de su aplicación en el agrosistema cañero. En este sentido en el presente trabajo se determina la variabilidad de las esterasas de *M. anisopliae*, sistema enzimático reportado polimorfo para esta especie [12].

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Resistencia Genética del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. En el mismo se uti-

lizaron 10 aislamientos monosporicos de *Metarhizium anisopliae* de diferentes orígenes geográficos e insectos hospedantes (tabla 1). Los aislamientos fueron cultivados durante siete días en 50 ml de medio de cultivo Adamek [13] agitado.

El micelio obtenido fue filtrado con papel de filtro y un gramo (peso seco) fue macerado con tampón fosfato a pH 6,5 con sacarosa al 20% en una proporción 1:3. El macerado fue centrifugado a 10 000 g durante 10 min.

Se realizaron 6 extracciones para cada aislamiento las que fueron examinadas comparativamente por electroforesis vertical [14] en geles de poliacrilamida al 8,5%. La corrida electroforética se realizó entre 50-60 mA durante 4 h. Para el revelado de los geles se utilizaron como sustratos  $\alpha$  y  $\beta$  naftil acetato [15]. Los geles fueron analizados visualmente tomando en cuenta el número y la posición de las bandas de cada aislamiento. La posición de las bandas se obtuvo mediante el cálculo de los Rf. Cada banda enzimática fue considerada como una variable cualitativa presente o ausente. No se consideró la intensidad de las bandas.

Se utilizó un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) el cual permite colocar los diferentes aislamientos y las variables sobre un mismo plano y posibilita la observación directa de sus relaciones. Cada plano está definido por dos ejes que describen las proporciones conocidas de la variabilidad total [16].

Se analizaron tres variables: esterasas presentes o ausentes, país de origen e insectos hospedantes.

## RESULTADOS

Los resultados del análisis electroforético se aprecian en la figura 1. Cada aislamiento presentó un importante número de enzimas representadas por las diferentes bandas (a-k) lo que permitió distinguir 6 patrones para las esterasas (I-VI). Los aislamientos 1, 5, 6, 7 y 10 manifestaron el patrón I mientras que el resto de los aislamientos manifestó patrones únicos.

Los resultados del AFC se muestran en la figura 2.

### Dirección para correspondencia:

Dra. María Elena Estrada Martínez, Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Avenida Van Troi, 17203 Rancho Boyeros, CP 19210 Ciudad Habana, Cuba.

Aceptado para publicación el 5 de Mayo de 1995.

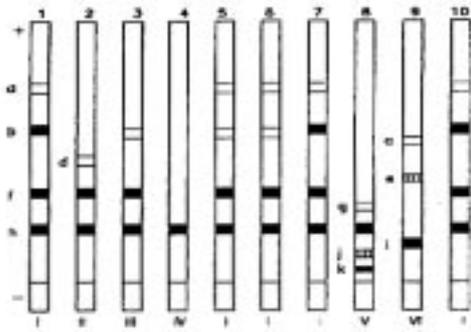


Figura 1. Zimograma para las esterasas de 10 aislamientos de *Metarhizium anisopliae*. Bandas representadas por letras, patrones representados por números romanos.

La proyección sobre el plano principal, es decir el plano más discriminante que representa el 69% de la variabilidad total evidencia que los aislamientos 1, 5, 6, 7 y 10 reagrupados en el patrón I son similares entre sí mientras que los aislamientos 8 y 9 representados alejados de la intersección de los ejes, resultaron muy diferentes. A pesar de que los aislamientos 1 y 8 presentan el mismo origen geográfico y fueron obtenidos a partir de coleópteros de diferentes familias (tabla 1), estos aislamientos mostraron diferentes patrones de esterasas.

Tabla 1. Origen geográfico y entomológico de 10 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.

Aislamientos	Hospedante de origen	Origen geográfico
1	Coleoptera: Curculionidae	Cuba
2	Coleoptera: Elateridae	Estados Unidos
3	Lepidoptera: Noctuidae	Bélice
4	Lepidoptera: Pyralidae	Francia
5	Homoptera: Delphacidae	Colombia
6	Homoptera: Delphacidae	Colombia
7	Coleoptera: Curculionidae	Cuba
8	Coleoptera: Scarabaeidae	Cuba
9	Homoptera: Cercopidae	Brasil
10	Coleoptera: Curculionidae	Cuba

## DISCUSIÓN

El análisis electroforético muestra diferencias y semejanzas entre aislamientos de *M. anisopliae*. La presencia de numerosas bandas evidencia el polimorfismo enzimático para esterasas de esta especie. El 50% de los aislamientos analizados mostró patrones electroforéticos únicos mientras que el otro 50% manifestó el mismo patrón para las esterasas. Similares resultados fueron obtenidos por de Conti *et al.* [9] y Riba *et al.* [17] al estudiar la variabilidad enzimática de *M. anisopliae*. Estos autores coinciden en afirmar que la variabilidad de las esterasas permite la caracterización de diferentes aislamientos de este hongo entomopatógeno.

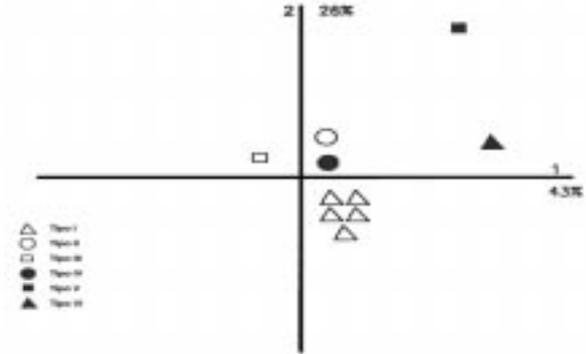


Figura 2. Resultado del análisis factorial de correspondencia plano más discriminante eje 1 (43%) y eje 2 (26%).

En nuestras condiciones el AFC no permitió distinguir a los aislamientos en función de sus orígenes (insecto hospedante y región geográfica), sólo el carácter enzimático fue discriminante.

El conocimiento de un carácter polimorfo para *M. anisopliae* resulta importante desde el punto de vista ecológico. En presencia de epizootias naturales o inducidas, el estudio electroforético pudiera permitir la distinción entre los aislamientos naturales y los aislamientos introducidos lo cual ha sido demostrado por Silvie *et al.* [18] para otros hongos entomopatógenos.

## Bibliografía

- Kramm KR. Termite pathogens: transfer of the *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *J Inverteb Pathol* 1982; 40: 1-6.
- Rombach MC, Aguda RM, Shepard BM *et al.* Infection of rice planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by field application of entomopathogenic hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environ Entomol* 1986; 15: 1070-1073.
- Allard GB, Chose CA, Heale JB *et al.* Field evaluation *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane frog hopper, *Aenolamia varia saccharina* (Hemiptera: Cercopidae). *J Inverteb Pathol* 1990; 55: 4146.
- Estrada ME. Lucha biológica contra las principales plagas de la caña de azúcar en Cuba. *Les Coloq INRA* 1991; 58: 14-24.
- May B, Roberts DW, Soper RS. Intraspecific genetic variability in laboratory strains of *Entomophthora* as determined by enzyme electrophoresis. *Exp. Mycol.* 1979; 3: 289-297.
- Riba G, BouYier-Fourcade I, Caudal A. Isoenzymes polymorphism *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. *Mycopathologia* 1986; 96: 161-169.
- Poprawski TJ, Riba G, Jones A *et al.* Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona weevils* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ Entomol* 1988; 17: 275-279.
- Tigano M, Riba G. Estudo de sistemas isoenzimáticos polimórficos para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Ann Soc Entomol Brasil* 1990; 19: 488-491.
- De Conti E, Messias CL, Souza HM L *et al.* Electrophoretic variation in esterasas and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experient* 1980; 36: 293-294.
- Tigano M. Contribution a l'étude de la variabilité génétique de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. hyphomycete entomopathogène. Tesis Doct Univ Paris VI, 1985.
- Riba G, Soares G Jr, Samson RA *et al.* Isoenzyme analysis of isolates of the entomogenous fungi *Tolydoctadium cylindrosporum* and *Tolydoctadium extinguens* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) *J Inverteb Pathol* 1986; 48: 362-367.
- Riba G. Contribution a l'étude génétique de quelques hyphomycetes entomopathogènes. Tesis Doct Univ Paris VI, 1985.
- Adamek L. Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Fol Microbiol* 1965; 10:255- 257.
- De Robertis EDP, De Robertis EMF. *Biología celular y molecular*. Barcelona, El Ateneo, S. A., 1981.
- Ruiz A, Maribona RH, Korneva S *et al.* Biochemical markers for sugar cane selection. *Proc 19th Congr ISSCT*, 1986: 273-283.
- Cailleux F, Pages JP. Introduction à l'analyse des données. Paris, Smash (2ª Ed).
- Riba G, Aquino ML, Ribeiro SA. Polymorphisme chez des souches brésiliennes de l'hyphomycete entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin inféodées à des Cercopidae. *Agron* 1987;7:763-768.
- Silvie P, Dedryver CA, Tanguy S. Applications experimentales de mycelium de *Erynia neophidus* (Zygomycetes: Entomophthorales) dans des populations de pucerons sur latitudes en serre maraichère: l'étude du suivi de l'inoculum par caractérisation enzymatique. *Entomoph* 1990;33:375-384.