

USO DE LA TÉCNICA RAPD PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POSIBLEMENTE RELACIONADOS CON VIRULENCIA EN HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Martha Dávila¹, Karla Zambrano² y Miguel A. Castillo³

RESUMEN

Algunos hongos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* tienen un gran potencial como controladores biológicos de insectos como *Diatraea saccharalis* en caña de azúcar, siempre que se logre masificar aislamientos específicos, virulentos y eficientes. Esta tarea puede alcanzarse a través de la transformación genética, que ya es posible para algunas características de interés de los mismos y con la ayuda de marcadores moleculares. En esta investigación se estudiaron mediante la técnica RAPD cuarenta iniciadores o "primers" de las series OPD y OPE. A través de un análisis de perfiles de amplificación de segmentos de ADN de los tres hongos entomopatógenos mencionados, aislados del insecto, se encontraron ocho bandas comunes a los tres materiales biológicos, los cuales representan marcadores moleculares de utilidad para identificar fragmentos de ADN que contribuyen a la capacidad de causar enfermedad de estas especies.

Palabras clave adicionales: Marcadores moleculares, caña de azúcar, *Diatraea*, biotecnología

ABSTRACT

Use of RAPD technique for the identification of DNA fragments likely related to virulence in entomopathogenic fungus

Some entomopathogenic fungi as *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* have great potential for biological control of insects, such as *Diatraea saccharalis* in sugarcane, provided specific isolates with high virulence capacity and efficiency can be produced in large quantities. This task can be achieved through genetic transformation which is currently possible for some of the most interesting characteristics of these organisms with the support of molecular markers. In this research, we studied forty primers from series OPD and OPE using the RAPD technique. The amplification profiles of the DNA segments of the mentioned fungi isolated from the insect showed eight common bands for the three biological materials, which represented molecular markers of great utility to detect genes that could confere to these fungi the ability of causing diseases.

Additional key words: Molecular markers, sugar cane, *Diatraea*, biotechnology

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos están asociados con insectos que habitan en diversos ambientes, incluyendo ecosistemas agrícolas, por lo cual han sido utilizados como agentes de control biológico como alternativa o suplementos al uso de químicos (Hajek y St. Leger, 1994).

El comportamiento o potencialidad para "matar plagas" por parte de los microorganismos entomopatógenos, llamado comúnmente virulencia, está determinado por las características

genéticas del individuo (Burges, 1998; Lecouna, 1996; Tanada y Kaya, 1993).

Los hongos entomopatógenos presentan variaciones genéticas debido a su característica de parasexualidad. Los análisis moleculares del ADN permiten detectar las variaciones entre los aislamientos, razas o patotipos diferentes (Alves, 1986; Riba y Silvy, 1989). La importancia de estos estudios radica en la exactitud de las identificaciones, permitiendo a la industria de bioplaguicidas contar con aislados más puros.

Recibido: Septiembre 28, 2000

Aceptado: Septiembre 13, 2001

¹ Dpto. de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"

² Tesista. Dpto. de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"

³ Dpto. de Ciencias Morfológicas, Decanato de Medicina, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela.

El antagonismo microbiano, la resistencia inducida en plantas, la protección cruzada, el uso de cepas hipovirulentas, el uso de plantas con propiedades antagonistas y el desarrollo de plantas transgénicas son estrategias de control biológico que en un futuro no muy lejano serán de aplicación práctica (Zavaleta, 1999). Los estudios de los mecanismos moleculares de la infección y de la producción de toxinas están avanzando rápidamente y ya se han desarrollado sistemas para la obtención de hongos transgénicos. Lo anterior abre la posibilidad de aumentar la efectividad de los hongos entomopatógenos mediante la manipulación de los genes involucrados en el reconocimiento del huésped, la adhesión, la actividad enzimática y la producción de toxinas, entre otros (Papavizas, 1987; St. Leger, 1994).

En esta investigación, se planteó como objetivo la detección por comparación mediante la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ó amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN) de las bandas obtenidas como producto a partir de la amplificación con el ADN de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals), *Metarhizium anisopliae* (Metcht) Sor. y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, aislados de larvas del insecto *Diatraea saccharalis* F., para así mediante otras técnicas verificar su potencial como bandas marcadoras de ADN que puedan estar relacionadas con la patogenicidad de estos hongos. Así como también pueden emplearse en la verificación del control de calidad de los hongos entomopatógenos que se producen comercialmente, los cuales son sometidos regularmente a pruebas de patogenicidad y virulencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* utilizadas para generar las poblaciones de trabajo se obtuvieron de las larvas del insecto *Diatraea saccharalis*, infectadas por los hongos en estudio. El procedimiento consistió en realizar un aislamiento en medios PDA (papa, dextrosa, agar), pH 7,0 el cual se purificó en PDA + antibióticos con el fin de evitar el crecimiento de bacterias. Los hongos se mantuvieron en PDA ó

silicagel a 4 °C (C. Zambrano. Probioagro, 2000. Comunicación personal).

Se preparó una suspensión de conidios de los hongos (individualmente) reactivados en *Diatraea saccharalis* a la concentración de 1×10^7 conidios/ml. El hospedero desinfectado (larvas) se sumergió en esta solución por diez segundos, luego se colocó individualmente en cápsulas de Petri con papel húmedo a temperaturas de 25 °C por tres días bajo condiciones de luz artificial durante el día y oscuridad durante la noche.

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizaron micelios, obtenidos del crecimiento de esporas y micelios en Caldo Sabouraud Dextrose (SDB+Y) modificado (Bactopeptona 10 g/l, Dextrosa 40 g/l, extracto de levadura 5 g/l, pH 7,5) (Alves, 1986) colocados en baño de María con agitación a 27 °C por 24 - 48 horas. Pasado este tiempo, el contenido de cada tubo de ensayo estándar se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm, para separar los micelios del medio. Por último, los micelios obtenidos se lavaron con agua destilada para eliminar los restos del medio (A. Carmona UCLA, 2000. Comunicación personal).

A partir de los micelios obtenidos se procedió a realizar la extracción del ADN genómico total, siguiendo el protocolo descrito en Skroch y Nienhuis (1995). De 100 a 200 mg de tejido seco se incubaron por 1 h a 60 °C en 1000 µl de buffer de extracción (NaCl 0.7M, 0.1M buffers Tris pH 7,5; 0.01M EDTA pH 8, BME 1% y CTAB= Cetyltrimethyl-ammonium bromide 1%, Sigma) más 0,1% de β-mercaptoethanol (BME), agitando moderadamente cada 5-10 min. Después de la incubación, a cada muestra se le adicionó 200 µl de NaAc 3M y se colocó a -20°C durante 20 minutos para luego ser centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. Para la precipitación del ADN, se tomó 750 µl del sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf nuevos. A este sobrenadante se le adicionó 2 µl de ARNasa A + 8 µl de su respectivo buffer y se dejó a 37 °C por 30 min. luego de lo cual se colocó a -20 °C por 5 min. Se precipitó con 750 µl de isopropanol enfriado a -20°C por 20 min. Después de una centrifugación por 20 min. a 14.000 rpm el precipitado se lavó tres veces con etanol (70 %),

se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μ l de buffer TE 1X (1 mM tris, 0,1 mM EDTA). La solución de ADN se guardó a -20°C.

Luego de este procedimiento, la muestra de ADN se sometió a una digestión con la enzima de restricción EcoR I. A 5 μ l del ADN se añadió 1 μ l de la enzima, 5 μ l de buffer H 10X y se llevó a un volumen final de 50 μ l con agua destilada estéril. Se colocó en incubación a 37 °C durante toda la noche y por último 10 min. a 65 °C (Sambrook et al., 1989).

Amplificación del ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400. La mezcla final de 10 μ l consistió de 2 μ l de cada muestra de ADN más 8 μ l de una mezcla de reacción (0,1 mM DNTP, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Promega), 0,4 μ M de iniciador (primer), 1X de buffer de reacción, 2mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 8,5; 20 mM KCl y 0,5 mg/ml seroalbúmina bovina). La amplificación se dividió en dos pasos, para los dos primeros ciclos el perfil térmico fue de 1 min. a 90 °C, 7 seg a 36 °C, y de 70 seg a 72 °C. Seguidamente 40 ciclos adicionales se llevaron a cabo con desnaturalización por 1 seg. a 92 °C, alineación a 36 °C por 7 seg, y elongación a 72 °C por 70 seg. Luego de estos 42 ciclos se mantuvo constante la temperatura a 72 °C por 4 min.

Para la amplificación se utilizó en la mezcla de reacción los iniciadores o primers de Operon Technology, serie E (OPE-01 – OPE-20) y serie D (OPD-01 – OPD-20). Como patrón de peso molecular se utilizó el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción Hind III.

Electroforesis en agarosa

Cada muestra se analizó por electroforesis en geles compuestos de 1,0 % (p/v) de agarosa ultrapura disuelta en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA 0.5 M, pH 8), se corrió a 80 voltios y fue sometida luego a tinción con bromuro de Ethidio (1%), observándose a través de un transiluminador de luz ultravioleta (Weising et al., 1995).

Nomenclatura de los marcadores RAPD

El tamaño del marcador RAPD se determinó por comparación a la banda más próxima de 50 pares de base (pb) del marcador λ . A cada marcador RAPD se le denominó por las letras y el número que lo identifican en el kit de Operon Technologies y la longitud aproximada (pb) en subíndice (Jung et al., 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se pueden observar dos ejemplos de los productos de amplificación de los ADN pertenecientes a los tres hongos con cuatro de los 40 iniciadores utilizados, siete de éstos no produjeron amplificación de fragmentos de ADN en al menos uno de los tres materiales, lo cual indicó que bajo las condiciones de amplificación, por lo menos una de las secuencias determinadas no existía en ninguno de los hongos para que éstos iniciadores prelinearan. Los 33 iniciadores restantes amplificaron el ADN de los tres hongos estudiados.

Entre 11 y 12 fragmentos de ADN en promedio fueron amplificados por iniciador, dentro del rango de tamaño de 400 y 1500 pares de base. Dentro de todas estas combinaciones de iniciador-fragmento, la mayoría de ellas fueron diferentes entre los hongos (bandas polimórficas).

Se observó que la serie iniciadores OPE produjo en promedio un mayor número de bandas amplificadas (12,6 en *B. bassiana*; 10,95 en *M. anisopliae* y 15,1 en *P. fumosoroseus*) que la serie iniciadores OPD (9,75; 7,35 y 12,1, respectivamente).

Al menos ocho de las bandas que se observaron utilizando cuatro de los iniciadores, resultaron ser monomórficas para los materiales empleados. Probando la existencia de bandas de longitudes similares en otras especies de hongos patógenos podría darnos indicios de la posibilidad de utilizar los iniciadores involucrados como marcadores de virulencia bajo condiciones específicas.

Estudios más específicos de características genéticas deben ser llevados a cabo para precisar la utilidad de estos marcadores. Se hace necesario en este sentido proceder a clonar y secuenciar las bandas detectadas para luego realizar hibridaciones específicas. En otros sistemas de

patógeno-hospedero se han utilizado los marcadores RAPD como base para el diseño de otros tipos de marcadores más específicos y altamente reproducibles como los denominados SCAR (Sequense Characterized Amplified Region) (Paran y Michelmore, 1993; Haymes et al., 2000). Dioh et al. (2000) realizaron un mapa de

ligamiento para los genes de avirulencia en *Magnaporthe grisea*, hongo fitopatógeno en arroz utilizando marcadores RFLP y RAPD. De los marcadores RAPD identificados, el OPE-10 resultó ser una secuencia de copia única ligado estrechamente al gen de avirulencia AVR 1-Ku 86 cerca del extremo del cromosoma 1.

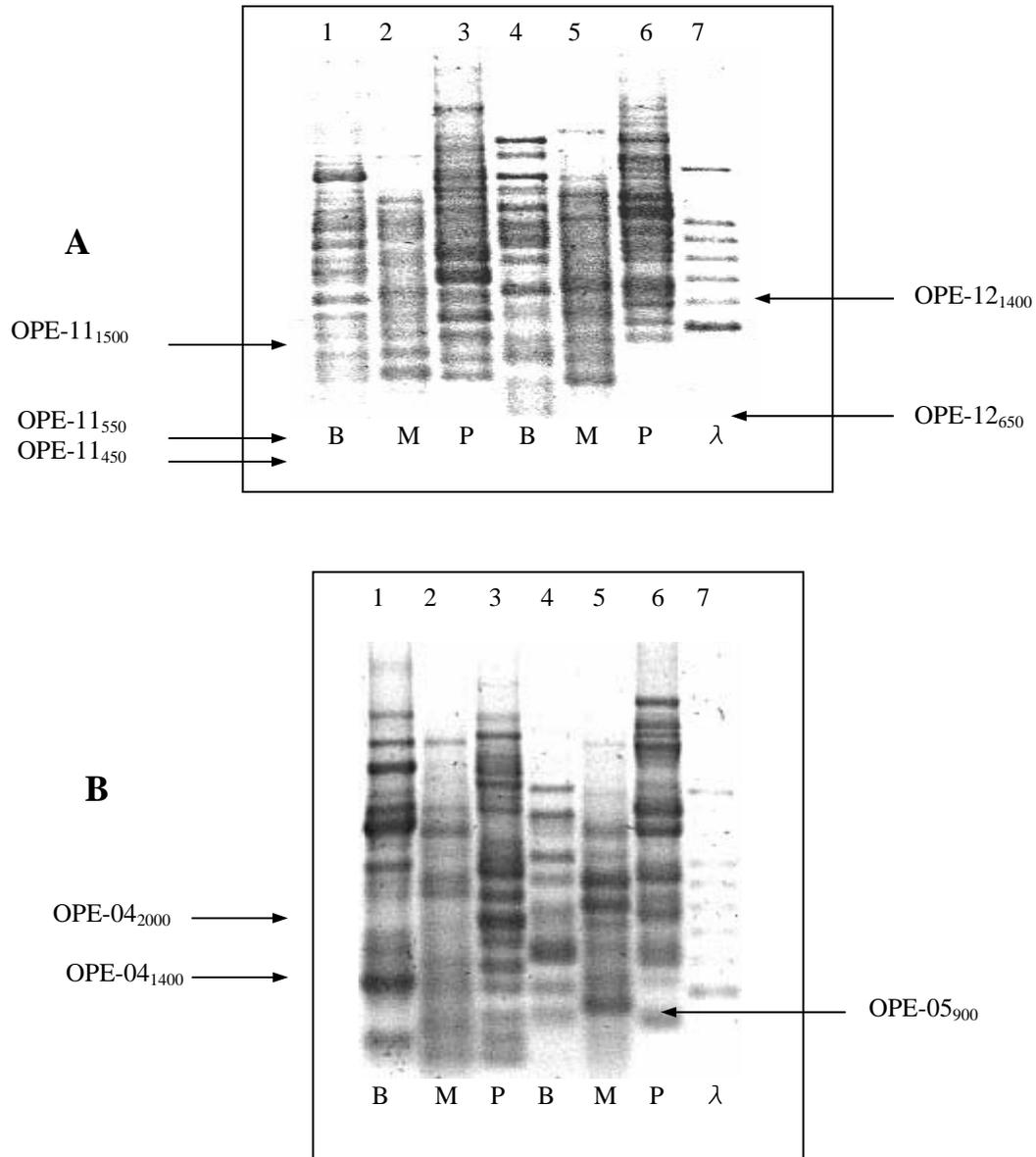


Figura 1. Productos de amplificación obtenidos usando la técnica RAPD en ADN digerido con la enzima Ecor I. A.- Iniciadores OPE-11 (líneas 1 a 3), OPE-12 (líneas 4 a 6), Marcador de Peso Molecular λ Hind III (línea 7). Se indican las bandas monomórficas OPE-11₁₅₀₀, OPE-11₅₅₀, OPE-11₄₅₀, OPE-12₁₄₀₀ y OPE-12₆₅₀. B.- Iniciadores OPE-04 (líneas 1 a 3), OPE-05 (líneas 4 a 6), Marcador de Peso Molecular λ (línea 7). Se indican las bandas monomórficas OPE-04₂₀₀₀, OPE-04₁₄₀₀ y OPE-05₉₀₀. B = *B. bassiana*, M = *M. anisopliae*, P = *P. fumosoroseus*.

Los marcadores moleculares RAPD (Williams et al., 1990) han revolucionado el análisis genético y la caracterización de genomas (Whisson et al., 1995; Gemas et al., 2000; Gwanama et al., 2000). Uno de los atractivos de esta técnica es que proporciona información en corto tiempo, y relativamente a bajo costo, ya que no requiere sondas de ADN o información de la secuencia del primer. Resultando ser un punto de partida relativamente sencillo y económico para emprender estudios de mayor envergadura.

St. Leger y Screen (1999a) emplearon diversos genes de patogenicidad para generar productos comerciales de hongos mejorados genéticamente para el control de insectos plagas. Las características de los hongos que pueden favorecerse del mejoramiento genético incluyen: mejoramiento de la virulencia, restricción o ampliación de la especificidad del hongo, reducción de los niveles de inóculo, alteración de la persistencia y obtener tolerancia a condiciones adversas del medio. Un banco de diversos genes aislados de *Metarhizium spp.*, muchos de los cuales codifican para potenciar y crear un agente insecticida selectivo, están siendo usados para mejorar la patogenicidad de entomopatógenos y para otras aplicaciones de biotecnología, como por ejemplo la resistencia a insectos en plantas (St. Leger y Screen, 1999b). La selección asistida por marcadores ha probado ser de gran utilidad para el mejor aprovechamiento de los recursos existentes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De un promedio aproximado de 68 fragmentos RAPD obtenidos, ocho resultaron ser monomórficos para las tres especies de hongos estudiadas. Estas bandas presentan un potencial para ser utilizadas como indicadores de la capacidad de virulencia de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* sobre las larvas del insecto *Diatraea saccharalis*. Se hace necesaria la continuación de este proyecto para la obtención de mayor información con el fin de realizar la transferencia de tecnología. Los marcadores moleculares detectados en este estudio podrían ser aislados a partir del gel, para ser secuenciados mediante otras técnicas a fin de determinar si los fragmentos

identificados están asociados a la virulencia. En el caso de que sean parte de genes de virulencia, con el conocimiento de la secuencia de éstos, se podría contribuir con la protección de cultivos susceptibles a plagas agrícolas. Por otra parte, las bandas marcadoras serían de utilidad en lo que respecta a la tipificación de cepas u obtención de aislamientos específicos y eficientes de hongos. Igualmente, podrían servir para asegurar la calidad al momento de masificar un agente de biocontrol viable.

LITERATURA CITADA

1. Alves, S. 1986. Controle Microbiano de Insectos. Brasil. Ed. Manole. Sao Paulo.
2. Burges, H.D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. Klumer Academic Publ. London.
3. Dioh, W., D. Tharreau, J.L. Nottenghem, M. Orbach y M.H. Lebrun. 2000. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. Molecular Plant Microbe Interactions 13 (2): 217-227.
4. Gemas, V.J., M.J. Rijo-Johansen, R. Tenreiro y P. Fevereiro. 2000. Inter and intra-varietal analysis of three *Olea europea* L. cultivars using the RAPD technique. J. Horticultural Science and Biotechnology 75 (3): 312-319.
5. Gwanama, C., M.T. Labuschagne y A.M. Botha. 2000. Analysis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 113: 19-24.
6. Hajek, A. y R. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Ann. Rev. Entomol. 39: 293-322.
7. Haymes, K.M., W.E. Van de Weg, J.L. Maas y B. Vosman. 2000. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry Genotypes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125 (3): 330-339.

8. Jung, G., D.P. Coyne, P.W. Skroch, J. Nienhuis, E. Arnaud, J. Bokosi, H.M. Ariyaratne, J.R. Steadman, J.S. Beaver y S.M. Kaeppler. 1996. Molecular markers associated with plant architecture an resistanse to common blight, web blight and rust in common beans. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:794-803.
9. Lecouna, R. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas. Ed. R.E. Buenos Aires.
10. Papavizas, G. C. 1987. Genetic manipulation to improve the effectiveness of biocontrol fungi for plant disease control. *In: I. Chet (ed.), Innovak Approaches to Plant Disease Control.* Wiley. N. Y. pp. 193-212.
11. Paran, I. y R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
12. Riba, G. y C. Silvy. 1989. Combattre les Ravageurs des Cultures, Enjeux et Perspectives. INRA. Paris.
13. Sambrook, J., E. Fritsh y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor. N.Y. Vol. 1.
14. Skroch, P. y J. Nienhuis. 1995. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) Genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1078-1085.
15. St. Leger, R. J. 1994. Mycoinsecticides an opportunity for genetic engineering. Abstracts. Society of Invertebrate Pathology International Meeting. p. 299.
16. St. Leger, R. y S. Screen, 1999a. Insect pathogenic fungi as a resource of genes for biotechnology. Abstracts. Society for Invertebrate Pathology 32th Annual Meeting. University of California. Irvine. p. 72.
17. St. Leger, R. y S. Screen. 1999b. Isolation of pathogenicity realated genes by EST analysis of the insect pathogenic fungus *Metarhizium* spp. Abstracts. Society for Invertebrate Pathology 32th Annual Meeting. University of California. Irvine. p. 68.
18. Tanada, Y. y H. Kaya. 1993. *Insect Pathology.* Academic Press. San Diego.
19. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.S. Tingey. 1990. DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
20. Whisson, S.C., A. Drenth, D.J. Maclean y J.A.G. Irwin. 1995. *Phytophthora sojae* avirulence genes, RAPD, and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map. *Molecular and Plant Microbe Interactions* 8(6): 988-995.
21. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, y W. Meyer, 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi.* University of Florida. pp. 9-209.
22. Zavaleta, E. 1999. Control biológico de fitopatógenos. X Curso Nacional de Control Biológico. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp. 162-163