



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELI CRISTINA SASSÁ

**QUITINASES DE *BEAVERIA BASSIANA*:
PRODUÇÃO E POLIMORFISMO GENÉTICO**

Londrina
2006

DANIELI CRISTINA SASSÁ

**QUITINASES DE *BEAUVERIA BASSIANA*:
PRODUÇÃO E POLIMORFISMO GENÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Londrina
2006

DANIELI CRISTINA SASSÁ

**QUITINASES DE *BEAUVERIA BASSIANA*:
PRODUÇÃO E POLIMORFISMO GENÉTICO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^o Dr^a Márcia Cristina Furlaneto

Prof^a Dr^a Elisabeth Y. S. Ono

Prof^a Dr^a Geni Varéa-Pereira

Londrina, 24 de julho de 2006.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Antonio e Lucia, pelo amor, humildade e honestidade com que me criaram, e
às minhas irmãs, pela amizade e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tudo pode, que me pôs em uma família maravilhosa e entre amigos insubstituíveis.

Aos meus pais, Antonio e Lucia, pela educação, amor, carinho e compreensão dedicados.

Às minhas irmãs, Micheli e Anelize, pelo apoio, amizade e carinho.

Ao meu namorado, Eduardo, pelo companheirismo, amor e compreensão, em todos os momentos.

Aos meus orientadores, professora Dr^a. Geni Varéa Pereira e Dr. José Eduardo Garcia, pelo conhecimento transmitido, dedicação, paciência, amizade e tempo desprendido.

Aos amigos do curso, Carolina C. B. O. Miranda, Eliana França, Gilcelene Bruzon, Flávio J. D. Castilho, Marcelo da Silva, que estiveram comigo desde o início, e aos que chegaram depois, Cassiano, Michele, Robson, Kaori e Isis, pelos momentos de descontração, mas, principalmente, pela amizade desenvolvida.

Aos amigos do laboratório, Elaine C. Moreno, Adriana P. da Silva, Vanessa Hitomi Sugahara, Evelyn Kamogawa, Wu Jo I e Daniel Maroneze, pela ajuda e amizade.

Ao técnico e amigo Nelson Janeiro Rodriguez, pela disponibilidade.

Às professoras Suely Obara Doi, Mara Lúcia Luiz Ribeiro, Maria Inês Rezende e Dalva Tomoe Miyagui, pela amizade e apoio.

A todos que de um modo ou de outro contribuíram para que eu alcançasse mais este objetivo.

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando a beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano de verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.” Isaac Newton

SASSÁ, Danieli Cristina. **Quitinases de *Beauveria bassiana*: produção e polimorfismo genético**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

RESUMO

Os fungos apresentam uma vantagem com relação a outros entomopatógenos, pois não precisam ser ingeridos para causar a infecção, penetrando o exoesqueleto do inseto por meio da ação de enzimas hidrolíticas como proteases e quitinases. *Beauveria bassiana* é um entomopatógeno amplamente estudado devido a sua capacidade de infectar e matar várias espécies de insetos. A produção de quitinases pode ser influenciada pela constituição da cutícula do hospedeiro e polimorfismos do gene codificador desta enzima pode ser uma das causas de alterações na capacidade de infecção do fungo. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o tempo de produção, propriedades cinéticas e purificação de quitinases de *B. bassiana* em meios de cultivo com e sem substratos indutores derivados de insetos; e verificar a existência de polimorfismos no gene da quitinase que possam estar relacionados com a atividade enzimática e mortalidade causada sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Para avaliar a produção e atividade de quitinases, a cepa CG432 foi cultivada em meio líquido contendo 1% de glucose ou adicionado de 1% de adultos mortos triturados de *Zabrotes subfasciatus* ou exúvias trituradas de larvas de *Tenebrio molitor* como substratos indutores, e inoculadas a 1% com uma suspensão 10^8 conídios/mL, a 28°C a 150rpm. A verificação da ocorrência de polimorfismos no gene da quitinase foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP em 30 cepas de *B. bassiana* isoladas de diferentes espécies de insetos e várias origens geográficas cultivadas em meio de cultivo líquido contendo 1% de glucose como fonte de carbono. As quitinases produzidas em meio contendo somente glucose demonstraram atividade ótima em pH ácido de 5,5 e 6,0, e alcalino 8,5, a 45°C. Estas quitinases apresentaram comportamento compatível com glicoproteínas de elevado teor de carboidratos durante a purificação, pois houve pequena definição do saldo de cargas elétricas da proteína durante a realização das cromatografias de troca-iônica em resinas tanto aniônicas como catiônicas. Os resultados obtidos durante a eletroforese e a dosagem de carboidratos, sugeriram que as quitinases poderiam estar associadas a outros carboidratos, possivelmente polissacarídeos produzidos durante o crescimento fúngico. A produção de quitinases ativas em pH ácido foi maior que as ativas em pH alcalino em todas as condições testadas. A atividade de quitinases com pH ótimo entre 5 e 6 foi detectada do 4º ao 9º dia de cultivo induzido enquanto que no cultivo sem indução quitinases ativas em pH ácido e alcalino, com pH ótimo de 8,5, foram detectadas com máximo de atividade no 5º dia de cultivo, diminuindo gradativamente até o 9º dia. A amplificação do gene da quitinase resultou em um produto de aproximadamente 1050pb para todas as cepas testadas e a análise do polimorfismo mostrou pouca variabilidade entre elas, uma vez somente 5 cepas apresentaram-se diferentes das demais não sendo possível correlacionar a ocorrência de variação com a mortalidade e a atividade enzimática.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*. Quitinase. Gene quitinase. Polimorfismo. Fungos entomopatogênicos.

SASSÁ, Danieli Cristina. ***Beauveria bassiana* Chitinases**: production and genetic polymorphism. 2006. 112f. Dissertation (Master Course in Biotechnology) – Londrina State University. Londrina, 2006.

ABSTRACT

Fungi present advantage regarding to other entomopathogens, therefore they do not need to be ingested to cause infection, penetrating in insect exoskeleton by hydrolytic enzymes action as proteases and chitinases. *Beauveria bassiana* is an entomopathogen widely studied which had its capacity of infect and killing many insects species. Production of chitinases can be influenced by host cuticle constitution and chitinase gene polymorphism can be one of the causes of alterations in the capacity of infection by fungus. In this way, the objective of this study was to evaluate the production time, kinetic properties and purification of chitinases produced by *B. bassiana* in medium with and without inductive substrate derived from insects; and to verify the existence of polymorphisms in chitinase gene that they can be related with the enzymatic activity and mortality caused on the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). To evaluate the chitinases production and activity, strain CG432 was cultivated in medium containing 1% glucose or added of 1% dead adults triturated of *Zabrotes subfasciatus* or exuviae triturated of *Tenebrio molitor* larvae as inductive substrate, and inoculated 1% with a 10⁸ conidia/mL, at 28°C at 150rpm. Verification of the occurrence of polymorphisms in chitinase gene was carried through by the technique of PCR-RFLP in 30 *B. bassiana* strains isolated of different insects species and geographic origins. Extracellular chitinases and the biomass were obtained by culture of *B. bassiana* in liquid culture medium containing 1% glucose as carbon source. Chitinases produced in medium containing only glucose had demonstrated optimal activity in acid pH of 5,5 and 6,0, and alkaline 8,5, at 45°C. These chitinases had presented compatible behavior with glycoproteins with high rate of carbohydrates during purification, therefore chitinases had protein electric load small defined during ion-exchange chromatography such in anionic as in cationic resins. The results obtained during electrophoresis and the dosage of carbohydrates, had suggested that chitinases could be associated to other carbohydrates, possibly polysaccharides produced during the fungal growth. Production of chitinases active in acid pH was greater than the active in alkaline pH at all test conditions. Optimum chitinases activity with pH between 5 and 6 was detected of 4th to 9th day of induced culture whereas in the culture without induction chitinases active in acid and alkaline pH, with pH excellent of 8,5, had been detected with maximum of activity in 5th day of culture, diminishing gradual until 9th day. The amplification of chitinase gene resulted in a product of 1050bp approximately for all strains tested and polymorphism analysis showed little variability between them, as 5 strains presented different, not being possible to correlate the occurrence of variation with mortality and enzymatic activity.

Keywords: *Beauveria bassiana*. Chitinase gene. Polymorphism. Entomopathogenic fungi.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 CONTROLE BIOLÓGICO	12
3.2 FUNGOS ENTOMAPATOGÊNICOS	12
3.3 BEAUVERIA BASSIANA.....	13
3.4 CUTÍCULA DO INSETO.....	13
3.4.1 Quitina	15
3.5 MECANISMO DE INFECÇÃO	15
3.5.1 Toxinas	16
3.5.2 Enzimas	17
3.5.2.1 Quitinases	19
3.6 GENÉTICA DE B. BASSIANA	22
3.6.1 Gene da Quitinase.....	24
3.7 VIRULÊNCIA	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 MICRORGANISMO	27
4.2 ATIVAÇÃO DO MICRORGANISMO	27
4.3 PREPARO DO INÓCULO.....	28
4.4 CULTIVO DO MICRORGANISMO.....	28
4.4.1 Curva de Crescimento	28
4.4.1.1 Cultivo Padrão	28
4.4.1.2 Cultivos Induzidos	30
4.5 INTERRUPÇÃO DO CULTIVO	30
4.6 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	30
4.7 DIÁLISE	30
4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	31

4.8.1 Determinação de Proteínas	31
4.8.2 Determinação de Açúcares Totais	31
4.8.3 Determinação de Açúcares Redutores.....	31
4.8.4 Determinação Den-Acetilglucosamina.....	31
4.8.5 Atividade de Quitinases.....	32
4.8.5.1 Preparo do Substrato.....	32
4.8.5.2 Determinação da Atividade de Quitinases	32
4.8.5.3 Determinação do Efeito do PH e Concentração do Tampão.....	33
4.8.5.4 Determinação do Efeito da Temperatura.....	33
4.8.5.5 Efeito do Tempo de Reação.....	33
4.8.5.6 Análise da Estabilidade Térmica das Quitinases.....	34
4.9 ISOLAMENTO DE QUITINASES	34
4.9.1 Cromatografia de Exclusão Molecular	34
4.9.2 Cromatografia de Troca Iônica	35
4.9.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	35
4.10 EXTRAÇÃO DO DNA.....	36
4.11 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	36
4.12 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA QUITINASE	37
4.13 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE DA QUITINASE	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS	47
ANEXO A. Artigo 1: “Efeito das condições de reação sobre a atividade de quitinases ativas em pH ácido e alcalino produzidas por <i>Beauveria bassiana</i> ”	48
ANEXO B. Artigo 2: “Indução de isoformas de quitinases do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em cultivos enriquecidos com substratos derivados de insetos praga”	69
ANEXO C. Artigo 3: “Análise do gene da quitinase de <i>Beauveria bassiana</i> relacionado com a mortalidade sobre a broca-do-café, <i>Hypothenemus hampei</i> , e a atividade enzimática”	91

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de clima tropical, com grande extensão territorial e diversidade agrícola, o que também favorece a proliferação de uma infinidade de pragas que causam prejuízos econômicos. Um exemplo comum à região Sul e Sudeste do Brasil é a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*. Este inseto não causa danos em folhas, galhos ou tronco das plantas de café, porém, nos grãos as fêmeas da broca-do-café formam galerias dentro do endosperma, sendo porta de entrada para outras infecções, levando a prejuízos econômicos que são devidos principalmente à queda da produtividade e da qualidade do produto final (DAMON, 2000).

O uso de inseticidas químicos tem contornado de modo muito eficaz esses problemas, porém a alta toxicidade desses produtos em conjunto com a poluição ambiental, baixa especificidade de ação e desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos insetos (NAHAR; GHORMADE; DESHPANDE, 2004), têm levado ao desenvolvimento de metodologias ecologicamente favoráveis para o controle de pragas.

O controle biológico é uma técnica que utiliza inimigos naturais no combate às pragas (ALVES, 1998). Vários microrganismos podem ser utilizados no controle de insetos-praga nas lavouras. No combate à broca-do-café, por exemplo, o fungo *Beauveria bassiana* tem sido amplamente estudado quanto ao mecanismo de ação, produção de enzimas e toxinas, variabilidade genética, especificidade quanto ao inseto hospedeiro e região geográfica.

Proteases e quitinases extracelulares têm sido referidas como responsáveis pelo início da infecção, pois hidrolisam complexos poliméricos de proteínas e quitina (poli- β -1,4-*N*-acetilglucosamina), os maiores constituintes da cutícula dos insetos. Por serem de suma importância para a instalação da infecção, o grau de virulência das cepas de *B. bassiana* pode estar relacionado, entre outros fatores, com a qualidade e quantidade de proteases e quitinases extracelulares produzidas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o tempo de produção, indução, atividade de quitinases e a ocorrência de polimorfismos no gene da quitinase de *B. bassiana*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir e determinar o tempo de liberação de quitinases de *B. bassiana* em meio líquido com e sem substratos indutores.

Determinar o pH e temperatura ótimos para a atividade de quitinases.

Isolar quitinases.

Amplificar o gene da quitinase (*Bbchit1*) de *B. bassiana* e verificar a ocorrência de polimorfismos por meio da técnica de PCR-RFLP.

Analisar possíveis correlações de polimorfismos no gene da quitinase de *B. bassiana* com a atividade enzimática e a mortalidade causada sobre indivíduos adultos da broca-do-café, *Hypothenemus hampei*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Doenças em insetos são relatadas desde épocas antes de Cristo por chineses e egípcios. A primeira classificação de um microrganismo como entomopatógeno foi feita em 1726 por Réaumur ao identificar um fungo do gênero *Cordyceps* infectando um Lepidóptero. No Brasil as referências a patógenos de insetos começou há aproximadamente 80 anos (ALVES, 1998).

O controle biológico pode ser descrito como o método que utiliza inimigos naturais no controle de pragas, sendo que quando causam doença em insetos são chamados entomopatógenos. Nematódeos, protozoários, bactérias e fungos podem ser utilizados no controle biológico de insetos, com destaque para a bactéria *Bacillus thuringiensis* (ALVES, 1998) e os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, por apresentarem ampla ação bioinseticida (KANG; PARK; LEE, 1998; KHACHATOURIANS, 1996).

As vantagens da utilização de controle biológico estão na especificidade e seletividade dos patógenos; facilidade de multiplicação e dispersão; efeitos secundários nas próximas gerações dos insetos, como a diminuição da oviposição e viabilidade dos ovos; e o uso associado com inseticidas químicos (ALVES, 1998).

Alguns fatores que limitam a utilização do controle biológico como, por exemplo, a ação mais lenta e a necessidade de condições específicas de temperatura e umidade de alguns microrganismos, podem ser contornadas por aplicações planejadas de acordo com o período de incubação do microrganismo e com as condições ambientais (ALVES, 1998), ou mesmo com a utilização de técnicas como o melhoramento genético.

3.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Fungos entomopatogênicos foram os primeiros microrganismos a serem utilizados em controle biológico. A maioria possui a capacidade de penetrar o tegumento do

inseto por meio de pressão mecânica exercida pelo desenvolvimento do tubo germinativo e enzimas que degradam a cutícula (TANADA, 1993), sendo este fato uma vantagem sobre outros patógenos que precisam ser ingeridos para causar a infecção (ALVES, 1998).

M. anisopliae e *B. bassiana* são exemplos de fungos entomopatogênicos que infectam mais de 100 espécies pertencentes a muitas Ordens. Podem ser patógenos obrigatórios ou facultativos sendo que alguns são simbióticos. A patogenicidade e virulência de cada cepa podem estar associadas com a produção de enzimas e micotoxinas durante o curso da infecção e colonização do hospedeiro. Por outro lado, a especificidade pode estar associada com o estado fisiológico (maturidade do inseto e planta hospedeira), propriedades do tegumento e defesa celular do hospedeiro e com as necessidades nutricionais do fungo (ALVES, 1998; TANADA, 1993).

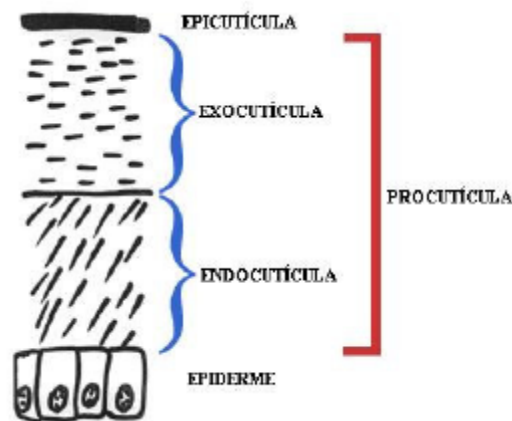
3.3 *Beauveria bassiana*

B. bassiana é um fungo Deuteromiceto pertencente à classe Hifomiceto de ocorrência cosmopolita (ALVES, 1998). Cepas saprófitas de *B. bassiana* têm sido isoladas de solos em todo o mundo, e cepas entomopatogênicas têm demonstrado variados graus de virulência como agente bioinseticida (ALVES, 1998). Destaca-se a ação entomopatogênica de *B. bassiana* sobre insetos hospedeiros economicamente importantes como a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), a broca do colmo do milho (*Ostrinia nubilalis*), traça das frutas (*Laspeyresia pomonella*), o besouro japonês de plantas lenhosas (*Popillia japonica*), o besouro colorado da batata (*Leptinotarsa decemlineata*), o percevejo das gramíneas (*Blissus leucopterus*) e a lagarta da couve (*Pieris brassicae*) (TANADA, 1993).

3.4 CUTÍCULA DO INSETO

A primeira barreira de proteção do inseto é a cutícula, secretada pela epiderme e que cobre todo o corpo do inseto (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). É dividida em duas regiões: uma camada mais interna chamada procutícula, caracterizada pela presença de quitina, e uma camada fina externa, a epicutícula, que não contém quitina (CHAPMAN,

1998), mas contém proteínas e é coberta por uma camada de cera contendo ácidos graxos, esteróis e lipídios (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). A procutícula é mais espessa e contém fibrilas de quitina embebidas na matriz protéica, juntamente com lipídios e quinonas (CHAPMAN, 1998). A região mais interna da procutícula, onde as ligações cruzadas das proteínas, que determinam a rigidez da cutícula são mais frouxas, é denominada endocutícula. A região mais externa, onde essas ligações são mais rígidas, é chamada exocutícula e localiza-se logo abaixo da epicutícula. (CHAPMAN, 1998).



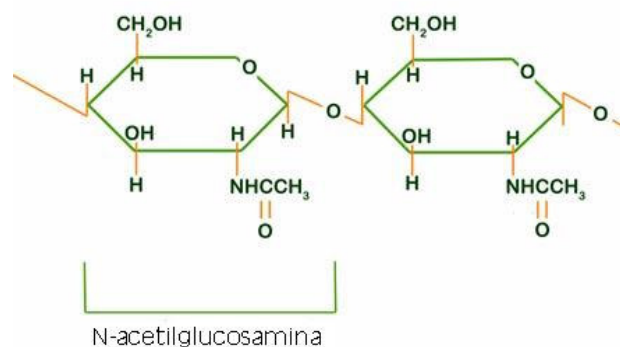
Fonte: Entomology... (2004)

Figura 1 – Estrutura da cutícula de insetos.

As proteínas podem representar até 70% da cutícula (CLARKSON; CHARNLEY, 1996) e são importantes na manutenção das propriedades mecânicas desta estrutura (KACHATOURIANS, 1996). A rigidez da cutícula é devido a ligações cruzadas entre as moléculas de proteína (CHAPMAN, 1998), e a remoção química dessas proteínas resulta na perda da integridade estrutural (KACHATOURIANS, 1996). Os lipídios representam cerca 7% do peso da cutícula sendo o ácido esteárico o ácido graxo mais abundante (KACHATOURIANS, 1996). Constituindo de 20-50% do peso seco da cutícula, as cadeias de quitina são unidas por pontes de hidrogênio e estão sempre associadas às proteínas provavelmente através de ligações covalentes (CHAPMAN, 1998).

3.4.1 Quitina

A quitina é o polímero natural mais abundante proveniente do exoesqueleto de artrópodes, incluindo crustáceos e insetos, de paredes celulares de fungos e algumas algas (SAHAI; MANOCHA, 1993). É um amino-polissacarídeo catiônico, essencialmente composto de resíduos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unidos por ligações β -1,4 e pode conter alguns resíduos de glucosamina (CHAPMAN, 1998). A quitosana, um co-polímero de resíduos de D-glucosamina (GlcN) (cerca de 80%) e *N*-acetilglucosamina (aproximadamente 20%), é um produto derivado da *N*-acetilação da quitina na presença de álcali. O peso molecular desses polissacarídeos pode ser tão alto quanto 10^6 Da (THARANATHAN; KITTUR, 2003).



Fonte: Horseshoe Crab History, Biology, Research and Conservation (2006).

Figura 2 – Estrutura química da quitina.

3.5 MECANISMO DE INFECÇÃO

O mecanismo de infecção de *B. bassiana* é comum a dos outros fungos entomopatogênicos. Como já citado acima, eles infectam o hospedeiro principalmente por via tegumentar, porém a infecção também pode ocorrer por meio de qualquer outra cavidade externa, como a cavidade bucal ou espaços intersegmentais. Uma vez que o esporo encontre a carapaça do inseto, a germinação ocorre sob condições favoráveis de temperatura e umidade (ALVES, 1998; TANADA, 1993).

Temperaturas ótimas para o desenvolvimento, patogenicidade e sobrevivência do fungo variam entre 20 e 30°C. Deuteromicetos encontrados em regiões tropicais e subtropicais, germinam em temperaturas ótimas próximas a 25°C. Um ambiente com alta umidade é necessário para a esporulação e desenvolvimento de micélio na superfície do inseto. As condições de luz, aeração e nutrição também são importantes, assim como a quantidade e qualidade dos nutrientes fornecidos pelo inseto (ALVES, 1998; TANADA, 1993).

A penetração ocorre devido à força mecânica exercida pelo tubo germinativo e pela ação de enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e quitinases), que causam a decomposição da cutícula do inseto (TANADA, 1993). Após chegar a hemocele, o fungo se reproduz, pois consegue combater as defesas imunológicas do inseto através do desenvolvimento de protoplastos e formação de estruturas leveduriformes (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). A doença se instala devido ao crescimento e esporulação do fungo, causando danos físicos, como o bloqueio mecânico do aparelho digestivo, e à produção de micotoxinas e enzimas degradativas. O inseto diminui a alimentação, ocorre transtorno das funções fisiológicas, sintomas de paralisia e perda da coordenação motora (TANADA, 1993). Após a morte do inseto, o micélio se desenvolve saprofiticamente e recobre toda a superfície do corpo, iniciando pelos espiráculos e áreas intersegmentais, podendo ser reconhecida por uma formação pulverulenta de conídios sobre o corpo do inseto, processo este chamado de mumificação. Esse processo é favorecido por metabólitos secundários, como antibióticos, que inibem a putrefação bacteriana e permitem o desenvolvimento do fungo (ALVES, 1998; KACHATOURIANS, 1996; TANADA, 1993).

3.5.1 Toxinas

As toxinas também estão envolvidas na patogenicidade dos fungos e são importantes na relação parasita-hospedeiro (ALVES, 1998). Podem ser divididas em peptídicas e não-peptídicas. O grupo de toxinas não-peptídicas inclui pigmentos como os amarelos tenelina e bassianina, e o pigmento vermelho oosporina. Este último é uma dibenzoquinona vermelha com atividade antibiótica contra bactérias gram-positivas, que foi detectada em cadáveres de insetos infectados (FUGUET; THÉRAUD; VEY, 2004). Exemplos de toxinas peptídicas podem ser depsipeptídios cíclicos como a beauvericina de *B. bassiana* e

P. fumosoroseus, e a destruxina (DTX) de *M. anisopliae* (KACHATOURIANS, 1996). Os peptídeos cíclicos de baixo peso molecular produzidos por *B. bassiana*, como beauvericina, eniatinas e bassianolida, têm demonstrado propriedades inseticidas, além de atividade imunossupressora, como as ciclosporinas A e C, que apresentam efeito inseticida sobre larvas de mosquitos (FUGUET; THÉRAUD; VEY, 2004).

Sharma, Agarwal e Rajak (1994) estudaram as alterações patofisiológicas causadas por *B. bassiana* em *Heliothis armigera* e observaram que ocorreu diminuição da respiração devido ao aumento do metabolismo provavelmente ocasionado pela presença de toxinas, o que também levou a diminuição da quantidade de aminoácidos, RNA e DNA.

Fuguet, Théraud e Vey (2004) purificaram uma proteína de *B. bassiana* semelhante à quitosanase de *Fusarium solani* com peso molecular de 28kDa, pI igual a 4, e que aparentemente não possui parte glicosilada com D-glucose ou D-manose. Esta molécula não foi detectada em cepas não-melanizantes, que, entretanto, produz outras proteínas tóxicas. Nas cepas produtoras, causou alterações na melanização em células de hipoderme, traquéia e células sangüíneas da traça da cera de abelha (*Galleria mellonella*).

Uma toxina denominada bassiacridina de alto peso molecular foi purificada de *B. bassiana*. É uma proteína monomérica de 60kDa com atividade de β -galactosidase, β -glucosidase e *N*-acetilglucosaminidase. Estudos ultraestruturais mostraram que a cutícula de gafanhotos tornou-se pigmentada, com alteração de células epiteliais e necrose pela ação desta toxina. O microseqüenciamento mostrou que esta molécula exibe alguma similaridade com proteínas de leveduras que possuem afinidade com a quitina (QUESADA-MORAGA; VEY, 2004).

3.5.2 ENZIMAS

As principais enzimas envolvidas no processo de penetração do fungo são as proteases, quitinases e lipases (KANG; PARK; LEE, 1998; KHACHATOURIANS, 1996; MORAES; SCHRANK; VAINSTEIN, 2003; NAHAR; GHORMADE; DESHPANDE, 2004; ST.LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986), e a proporção entre elas pode estar relacionada com a constituição da cutícula do inseto hospedeiro (GUPTA *et al.*, 1992).

As proteases, além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos esporos, têm funções nutricionais importantes, sendo capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em cadeias menores, que são absorvidas pelas células. As lipases são

responsáveis pelo fracionamento dos lipídios existentes na superfície dos insetos para posterior metabolização. As quitinases promovem a hidrólise da quitina, a qual é realizada por um sistema quitinolítico que envolve duas hidrolases (quitinase e quitobiase) que atuam seqüencialmente (ALVES, 1998), além de possuírem papel importante na nutrição e no processo de desenvolvimento e morfogênese, uma vez que a quitina é o maior componente da parede celular em fungos (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

A secreção de enzimas parece acontecer de um modo seqüencial, aparecendo inicialmente as proteases seguidas pelas quitinases, uma vez que a quitina está presente na cutícula embebida numa matriz protéica (ST.LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986; ST.LEGER *et al.*, 1996). St.Leger, Cooper e Charnley (1986a) observaram que a degradação da cutícula só ocorreu quando esta foi primeiramente tratada com proteases. Comparada com controles tratados com proteases inativadas, a liberação de aminoácidos aumentou cerca de 3,5 vezes. Esses resultados sugerem que a rede de quitina está protegida por uma rede de proteínas, cuja decomposição disponibiliza a quitina para a hidrólise. Os lipídios podem representar o mesmo papel em alguma extensão.

St.Leger, Charnley e Cooper (1986) analisaram a seqüência de produção enzimática em *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Lecanicillium lecanii* e observaram que a atividade de esterase e enzimas proteolíticas (protease, aminopeptidase, carboxipeptidase) apareceram nas primeiras 24 horas, enquanto a quitinase foi produzida em níveis basais de três a cinco dias, e depois aumentou rapidamente. A aparição tardia da quitinase é presumivelmente um resultado da indução quando a quitina torna-se disponível após a degradação de proteínas cuticulares. Por meio de microscopia fluorescente foi confirmado que enzimas proteolíticas rapidamente removem proteínas da cutícula, o que resulta na exposição de quitina para enzimólise.

St.Leger *et al.* (1996) realizaram estudos imunocitoquímicos em *Manduca sexta* e observaram que a produção de quitinases foi pequena na superfície da cutícula, mas quantidade maior desta enzima pôde ser detectada em regiões já degradadas por proteases, sugerindo que a liberação da quitinase foi posterior à liberação das proteases e dependente da acessibilidade do substrato.

Embora pareça que as proteases iniciem a degradação, permitindo que a quitinase penetre a cutícula, há evidências *in vitro* de que proteases e quitinases atuem sinergisticamente na solubilização da cutícula (ST.LEGER *et al.*, 1996). A protease pode ser um determinante da virulência, mas não um fator essencial visto que a não-expressão do gene da protease somente reduziu a capacidade de infecção (ST.LEGER; JOSHI, 1997).

3.5.2.1 Quitinases

As proteases representam umas das principais enzimas envolvidas na invasão ao inseto hospedeiro, visto que as proteínas são os maiores constituintes da cutícula (CLARKSON; CHARNLEY, 1996; KACHATOURIANS, 1996), porém, como a quitina é o segundo maior constituinte, destaca-se a importância das quitinases (ST.LEGER *et al.*, 1996).

Quitinases e quitobiosidases são onipresentes na natureza e encontradas em plantas, leveduras e procaríotos. As quitinases, também definidas como carboidrolases, hidrolisam as ligações glicosídicas β ,1-4 entre resíduos de *N*-acetilglucosamina da quitina e entre *N*-acetilglucosamina e *N*-glucosamina da quitosana, porém, não são ativas sobre a ligação entre dois resíduos de *N*-glucosamina da quitosana (THARANATHAN; KITTUR, 2003). Podem ser divididas em dois grupos: endoquitinases (EC 3.2.1.14), que quebram as ligações glicosídicas internas de modo aleatório, resultando em oligossacarídeos de peso molecular variado, como quitotetraose, quitotriose e dímeros de di-acetilquitobiose; e exoquitinases, que quebram ligações externas. Estas podem ser subdivididas em: quitobiosidases (EC 3.2.1.29), que catalisam a liberação progressiva de di-acetilquitobiose começando pela extremidade não redutora, e β -1,4-*N*-acetilglucosaminidases (quitobiasas EC 3.2.1.30) que quebram oligo e dissacarídeos liberados pelas endoquitinases e quitobiosidases gerando monômeros de *N*-acetilglucosamina (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

As quitinases ainda podem ser classificadas de acordo com sua característica química em tipo A e tipo B. As quitinases tipo A são ácidas, possuem afinidade singular em gel dextrana e agem fracamente com quitina coloidal. As do tipo B são básicas e não zimogênicas possuem comportamento normal em filtração em gel e podem degradar mais facilmente a quitina coloidal (SAHAI; MANOCHA, 1993). *Metarhizium flavoviride*, *M. anisopliae* e *B. bassiana* produzem um complexo quitinolítico cujas enzimas podem ser divididas em ácidas ou básicas de acordo com seu ponto isoelétrico (ST.LEGER *et al.*, 1996).

St.Leger, Staples e Roberts (1993) verificaram que, em meio contendo quitina, *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Aspergillus flavus* produziram várias quitinases, representados por 10, 18 e 6 isoenzimas respectivamente, possivelmente resultantes de alterações sofridas após a tradução da proteína como, por exemplo, glicosilação, sendo que esta heterogeneidade teria papel importante na capacidade dos fungos em se adaptarem a diferentes hospedeiros. Os resultados deste estudo sugerem que os fungos produzem tipos complexos de quitinases coordenadamente induzidos por quitina e seus produtos de

degradação.

A análise da expressão de enzimas quitinolíticas durante o crescimento de *B. bassiana* em meio contendo 0,5% de cutícula de dois diferentes insetos, traça da cera de abelha, *Galleria mellonella*, ou lagarta-mede-palmo, *Trichoplusia ni*, mostrou que diferentes cepas de *B. bassiana* produzem várias enzimas com diferentes níveis de atividade que possivelmente estariam envolvidas com a virulência, o que também sugere que a produção enzimática pode estar relacionada com o hospedeiro (GUPTA *et al.*, 1992).

A produção de quitinases *in vitro* é influenciada pelos componentes do meio de cultivo sendo observada maior atividade desta enzima em meios enriquecidos com cutículas de insetos, quitina ou *N*-acetilglucosamina (CAMPOS *et al.*, 2005; KANG; PARK; LEE, 1999; MORAES; SCHRANK; VAINSTEIN, 2003; NAHAR; GHORMADE; DESHPANDE, 2004; SHUBAKOV; KUCHERYAVYKH, 2004; ST.LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986b). Isso sugere que a síntese dessa enzima é controlada por um sistema indutor-repressor onde a quitina e oligômeros de *N*-acetilglucosamina são os principais indutores; polímeros como celulose, xilana e pectina os repressores da síntese, e a glucose e altas concentrações de *N*-acetilglucosamina podem atuar como repressores metabólicos da síntese enzimática (SAHAI; MANOCHA, 1993; SILVA, *et al.*, 2005; ST.LEGER; COOPER; CHARNLEY; 1986b).

Shubakov e Kucheryavykh (2004) não detectaram atividade quitinolítica quando vários fungos, entre eles *B. bassiana*, foram cultivados em meio contendo somente 1% de glucose, sugerindo que quitinases são enzimas induzidas. Entretanto, a produção de enzimas pôde ser aumentada quando se utiliza duas fontes de carbono diferentes, uma visando o crescimento do fungo, no caso a glucose, e outra visando à indução da produção de enzimas, como a quitina. Quando *B. bassiana* foi cultivada em meio contendo 1% de glucose acrescida de 1% de quitina, a produção de quitinases foi 1,7 vezes maior.

Moraes, Schrank e Vainstein (2003) obtiveram maiores atividades de *N*-acetil- β -D-glucosaminidase e endoquitinase de sobrenadantes de cultivos contendo somente 0,5% de *N*-acetilglucosamina ou acrescido de cutícula, e em meios contendo glucose pouca atividade foi observada e maiores quantidades de quitinases foram obtidas quando essa fonte de carbono havia se esgotado.

Um estudo sobre o efeito da adição de quitina e *N*-acetilglucosamina ao meio de cultivo, na produção de quitinases e secreção de proteínas por *M. anisopliae* sugere que a *N*-acetilglucosamina tem alguma influência sobre essas enzimas. Em baixas concentrações de *N*-acetilglucosamina (0,05%) houve indução da produção de quitinases,

enquanto que em concentrações superiores a 0,5% a produção foi reprimida. Entretanto, mesmo com pequena produção de quitinases com 1,0% de *N*-acetilglucosamina, toda a quitinase produzida estava no líquido extracelular, enquanto que a 0,05% cerca de 60% da atividade enzimática permanecia ligada à parede celular. Como o transporte de proteínas não é bem conhecido, não se sabe como a *N*-acetilglucosamina interfere nesse transporte. A análise eletroforética de proteínas ligadas à parede celular produzidas em meios com e sem quitina mostrou duas regiões com atividade quitinolítica. A presença de quantidades crescentes de *N*-acetilglucosamina diminuiu gradativamente a intensidade da região de menor mobilidade eletroforética até que, na presença de 1% deste monossacarídeo, a região não foi detectada, evidenciando a influência de *N*-acetilglucosamina como inibidor para a síntese de quitinase e indutor da secreção, uma vez que atividade de quitinase foi observada na fração extracelular. Portanto, somente uma quitinase parece ser regulada pela *N*-acetilglucosamina uma vez que a outra está presente em todas as condições testadas. (BARRETO *et al.*, 2004).

A análise da expressão do gene CHIT30 de uma quitinase de *M. anisopliae* demonstrou que este gene é induzido por 1% de quitina, 1% de cutícula e 0,25% de *N*-acetilglucosamina, e reprimido por 1% de *N*-acetilglucosamina e 1% de glucose. Nem mesmo quando a glucose havia se esgotado o produto deste gene pôde ser detectado (SILVA *et al.*, 2005). Campos *et al.* (2005) também não detectaram atividade de quitinase produzida por *Beauveria amorpha* e *B. bassiana* em meios contendo 1% de glucose ou 1% de *N*-acetilglucosamina, sendo as maiores atividades detectadas quando 0,5% de quitina ou cutícula de carrapato eram adicionadas ao meio.

Sahai e Manocha (1993) em sua revisão sobre quitinases de fungos e plantas observaram que muitas demonstraram atividade ótima em torno de pH 5,0 e em temperaturas que variaram ente 38 e 50°C, além de possuírem alta estabilidade que poderia ser atribuída à glicosilação.

As enzimas parecem ser produzidas quando a sua efetividade pode ser maior, ou seja, quando o pH do meio está próximo do seu ótimo. St.Leger, Joshi e Roberts (1998) observaram que as proteases foram produzidas no início do crescimento fúngico, quando o pH do meio estava perto de 8,0, enquanto as quitinases, cujo pH é próximo de 5, foi melhor detectada quando o pH do meio estava ligeiramente ácido, porém, estas também foram produzidas em pH próximo de 8.

Algumas quitinases fúngicas já foram purificadas, entre elas, duas de *M. anisopliae* com massa molecular próxima a 30kDa (MORAES; SCHRANK; VAINSTEIN, 2003; PINTO *et al.*, 1997). Outra quitinase monomérica de aproximadamente 60kDa e pH

ótimo em torno de 5,0, foi também purificada e designada como quitobiase pois desempenhou maior atividade contra p-nitrofenol- β -D-*N,N'*-diacetilquitobiose que contra p-nitrofenol- β -D-*N,N',N''*-triacetilquitobiose (KANG; PARK; LEE, 1999).

Havukkala *et al.* (1993) induziram a produção de uma quitinase em *B. bassiana* pela adição de quitina coloidal 1% (p/v) ao meio de cultivo. O processo de purificação resultou em uma proteína de massa molecular em torno de 45kDa. Fang *et al.* (2005) purificaram uma outra quitinase de *B. bassiana* de aproximadamente 33kDa e ponto isoelétrico igual a 5,4 (*Bbchit1*), com atividade de endoquitinase.

3.6 GENÉTICA DE *B. bassiana*

A análise do genoma de *B. bassiana* revelou que este fungo possui oito cromossomos com tamanho total igual a 40,6Mpb (PFEIFER; KHACHATOURIANS, 1993).

Como a quantidade das enzimas produzidas por *B. bassiana* envolvidas na degradação da cutícula depende do hospedeiro e do ambiente que habitam (GUPTA *et al.*, 1992), vários grupos de pesquisa têm se empenhado em encontrar alguma correlação entre cepas de *B. bassiana*, região geográfica e inseto hospedeiro de origem (CASTRILLO; WIEGMANN; BROOKS, 1999; COATES; HELLMICH; LEWIS, 2002; GAITAN *et al.*, 2002; KOSIR; MACPHERSON; KHACHATOURIANS, 1991; LUZ *et al.*, 1998; MAURER *et al.*, 1997; MURO; MEHTA; MOORE, 2003; URIBE; KHACHATOURIANS, 2004; WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004).

Kosir, MacPherson e Khachatourians (1991), por meio da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), estudaram duas cepas de *B. bassiana*, uma mais e outra menos virulenta contra um tipo de gafanhoto, *Melanopus sanguinipes*. Apesar de ambas apresentarem o mesmo padrão de fragmentos gerados por enzimas de restrição, sondas heterólogas não hibridaram igualmente com as duas cepas, mostrando a existência de seqüências diferentes entre elas e isso possivelmente estaria envolvido na diferença de virulência.

O estudo de 38 isolados de *B. bassiana* obtidos de diversas espécies de Lepidópteros e Coleópteros de várias regiões geográficas, por RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) e RFLP mostrou clara relação entre a estrutura populacional do fungo e algumas espécies definidas de hospedeiro, porém não houve correlação evidente com a

localização geográfica. Por exemplo, cepas isoladas de insetos do gênero *Ostrinia* agruparam-se independentemente da origem geográfica, assim como as cepas isoladas da broca da cana de açúcar, *Diatraea saccharalis*. Similarmente, cepas isoladas de insetos do gênero *Sitona* foram distinguidas de cepas isoladas de outros curculóides. Como fungos entomopatogênicos são parasitas facultativos, eles estão sujeitos a fatores ambientais, e estes resultados sugerem que o inseto hospedeiro pode exercer uma pressão seletiva favorecendo um ou alguns genótipos (MAURER *et al.*, 1997).

Utilizando a técnica de RAPD, grande variabilidade genética foi encontrada dentro e entre populações de *B. bassiana* associada com o cascudinho da cama de frango, *Alphitobius diaperinus*, isolados de diferentes localidades, não sendo observada, portanto, relação com a região geográfica (CASTRILLO; WIEGMANN; BROOKS, 1999).

Uma outra abordagem tentando estabelecer uma correlação entre virulência e polimorfismo foi feita por Luz *et al.* (1998) que observaram grande similaridade entre 10 isolados de *B. bassiana* por RAPD, apesar dos diferentes níveis de virulência contra *Triatoma infestans*.

Coates, Hellmich e Lewis (2002) não observaram relação entre cepas de *B. bassiana* e inseto hospedeiro quando analisaram a região ITS (Internal Transcription Spacers) por RFLP.

Gaitan *et al.* (2002) também não encontraram relação do isolado com a região geográfica ou com o inseto hospedeiro. Mas, ao contrário de Castrillo, Wiegmann e Brooks (1999), encontraram baixa variabilidade entre 95 cepas de *B. bassiana* (68 isolados de *H. hampei* e outros hospedeiros na Colômbia, e 27 isolados de outras regiões do mundo) utilizando RAPD. Apesar do índice de similaridade médio de 0,7063 (máximo 1,0, quanto maior o número maior a similaridade), a variabilidade foi considerada baixa uma vez que isolados de diferentes continentes e hospedeiros foram incluídos. A análise do marcador ITS-RFLP só indicou dois genótipos muito conservados e dispersos em cepas de *B. bassiana*.

Wang *et al.* (2003) avaliaram a relação entre hospedeiro e região geográfica com *B. bassiana* utilizando as técnicas de PCR-RFLP do gene *pr1*, marcadores microsatélite e haplotipagem de 28S rDNA. A análise de restrição do gene *pr1*, que codifica uma protease-subtilisina, produziu padrões de corte altamente polimórficos entre as cepas. Além disso, as três metodologias indicaram que cepas de *B. bassiana* são mais geneticamente associadas com origem geográfica do que com ordem do inseto e, como somente duas das 56 cepas examinadas possuem haplótipos idênticos, desenvolvem um estilo de reprodução não-clonal.

Muro, Metha e Moore (2003) avaliaram a variabilidade genética de 47 cepas

de *B. bassiana*, uma *Beauveria* sp, e duas *Beauveria brongniartii*, isoladas de diferentes insetos e países, por ITS-RFLP e observaram o mesmo padrão de bandas para os isolados de *B. bassiana*, sendo diferente somente das cepas de *B. brongniartii*, sugerindo que a região ITS não é favorável como marcador para diferenciar cepas de *B. bassiana*. Por outro lado, análise genética por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) mostrou um rico padrão de bandas, podendo diferenciar isolados e agrupá-los com base na similaridade genética intraespecífica, apesar de não correlacionar o polimorfismo com o hospedeiro ou região geográfica de origem.

Uribe e Khachatourians (2004) observaram alta variabilidade intraespecífica no DNA mitocondrial entre 21 cepas de *B. bassiana* quando o DNA total foi digerido com enzimas de restrição e hibridizado com sondas de DNA mitocondrial. Entretanto, nenhum mitotipo pôde ser relacionado com o hospedeiro de onde foi isolada ou a origem geográfica.

Wang *et al.* (2004) estudaram o impacto de *B. bassiana* em insetos que não eram seu alvo. Duas cepas de *B. bassiana*, Bb17 e Bb13, foram espalhadas em uma área de 1000 hectares e a análise de recuperação das cepas em dois anos foram avaliadas por PCR para estudar o haplótipo 28S rDNA, marcadores microsatélite, PCR-RFLP de gene *pr1* e RAPD. A porcentagem de recuperação média foi de 9,1% para Bb17 e 5,2% para Bb13. A recuperação de Bb17 foi maior que de Bb13 provavelmente por ter sido aplicada quando a densidade de insetos era mais alta. Os resultados indicaram que a introdução de *B. bassiana* pode ser persistente no local e que a infecção em insetos não-hospedeiros pode ocorrer, porém a virulência é mais baixa.

3.6.1 Gene da Quitinase

Os genes de algumas quitinases já foram seqüenciados. Blaiseau e Lafay (1992) seqüenciaram o gene que codifica uma quitinase extracelular (*chi1*) de cerca de 42kDa do fungo filamentoso *Aphanocladium album*, um micoparasita. O gene possui 1269 pares de bases separados por três introns curtos (55, 53 e 49pb). A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida com outras quitinases indicou que *chi1* tem grande similaridade com algumas quitinases bacterianas. *Chi1* contém duas regiões conservadas, contendo 12 e 8 aminoácidos, encontradas em algumas quitinases bacterianas, de leveduras e de plantas, o que sugere que estas regiões sejam importantes para a função enzimática. Além disso, uma dessas

regiões contém resíduos ácidos, que é comum a várias outras enzimas que degradam ligações glicosídicas β -1,4.

Bogo *et al.* (1998) seqüenciaram o gene de uma quitinase de *M. anisopliae*. Este gene contém 1521pb, possui três introns curtos de 101, 68 e 80pb e codifica uma proteína de 423 aminoácidos. A análise do polipeptídio completo indica que ele é sintetizado como uma proenzima de 45kDa. Calculando os 35 aminoácidos N-terminais o peso molecular é igual a 42kDa, que coincide com uma quitinase estudada anteriormente por St.Leger *et al.* (1996). A análise das duas proteínas mostrou pequenas diferenças (3/20) provavelmente refletindo uma variação entre os isolados.

Kang, Park e Lee (1998) seqüenciaram um outro gene de quitinase de *M. anisopliae* contendo 1902pb que codifica uma proteína inicialmente secretada com 552 aminoácidos, de peso molecular calculado de 58kDa.

Outro gene de quitinase (Chit1) de *M. anisopliae* foi seqüenciado e contém região de leitura de 1275pb que codifica uma proteína de 424 aminoácidos (SCREEN; HU; ST.LEGER, 2001).

O gene de uma endoquitinase de *B. bassiana* (*Bbchit1*) contém uma região aberta de leitura de 1047pb e, diferente de outros genes de quitinases já citados, não contém introns. A análise da seqüência de aminoácidos mostrou que essa enzima pertence à família 18 Glicosil-hidrolase. A similaridade entre os aminoácidos das quitinases *Bbchit1* e *Chit1*, de *M. anisopliae* é muito pequena, sendo filogeneticamente distantes. As diferenças entre as seqüências de aminoácidos e a estrutura tridimensional destas duas enzimas, que determinam a ligação à quitina e o modo de ação, resultam na diferença de funções que elas possuem (FANG *et al.*, 2005).

3.7 VIRULÊNCIA

A patogenicidade e virulência está relacionada com enzimas e toxinas produzidas pelo microrganismo. Kosir, MacPherson e Khachatourians (1991) estudaram duas cepas de *B. bassiana* comparando-as quanto à produção de enzimas extracelulares e virulência contra um tipo de gafanhoto, *M. sanguinipes*. A cepa mutante, GK2051, obtida por exposição da cepa selvagem, GK2016, a luz UV, foi similar a cepa selvagem com respeito ao perfil morfológico, entretanto foi menos virulenta. A cepa selvagem produziu duas vezes mais

esterase, esterase-lipase, e β -galactosidase, enquanto a mutante produziu duas vezes mais quitinase e protease, enzimas que parecem ser essenciais para sua capacidade de invadir e infectar insetos. A diferença na virulência e na produção de enzimas sugere que a virulência seja multifatorial e que alguns outros determinantes não estão operantes na cepa mutante.

Fang *et al.* (2005) obtiveram aumento da virulência de *B. bassiana* após o aumento da expressão do gene de uma endoquitinase sobre *Myzus persicae*, o pulgão-verde da alface. Nas cepas transformadas, a concentração de conídios e o tempo suficiente para matar 50% dos indivíduos foram menores que na cepa selvagem, indicando que o aumento da produção de endoquitinase pode aumentar a eficiência da infecção de *B. bassiana* em afídios e acelerar a infecção. Por outro lado, um estudo com aumento da expressão do gene de uma endoquitinase de *M. anisopliae* não mostrou aumento na virulência contra *Manduca sexta*, o mandarová do fumo (SCREEN; HU; ST. LEGER, 2001).

Vários são os fatores que determinam a virulência de um fungo. Entretanto, como as quitinases estão entre as primeiras enzimas produzidas durante o primeiro passo da infecção, suas funções parecem ser muito importantes e o estudo destas enzimas deverá contribuir para o esclarecimento das suas funções neste processo, assim como auxiliar na compreensão do mecanismo de patogenicidade do fungo. Além disso, o polimorfismo do gene da quitinase pode estar envolvido no grau de virulência dos fungos uma vez que esta é uma enzima importante e uma alteração na expressão genética pode causar uma maior ou menor atividade enzimática. Desta forma, o estudo do gene da quitinase também poderá ajudar na compreensão dos mecanismos de patogenicidade ou no desenvolvimento de cepas mutantes mais virulentas superprodutoras de quitinase para aplicação agroindustrial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

As cepas de *Beauveria bassiana* utilizadas neste trabalho foram provenientes do Banco de Patógenos, Laboratório de Controle Microbiano de Pragas do Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina.

4.2 ATIVAÇÃO DO MICRORGANISMO

As cepas de *B. bassiana* foram previamente testadas quanto à virulência contra a broca-do-café (*H. hampei*) (HIROSE, 2000). As cepas, estocadas a -20°C , foram inicialmente inoculadas em meio de cultivo sólido (20g de ágar, 10g de D-glucose anidra, 5g de extrato de levedura, 1,58g de NaNO_3 , 1,05g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g de KCl , 0,6g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,36g de KH_2PO_4 , 0,5g de estreptomicina, água para 1 litro) e incubadas a 25°C , 12h fotofase, durante 10 dias, como etapa inicial da ativação do fungo (NEVES; HIROSE, 2005).

O segundo passo de ativação das cepas foi o crescimento do fungo sobre a broca-do-café. As brocas, coletadas a campo, foram lavadas através da passagem dos insetos em solução de hipoclorito de sódio 0,5% e então mergulhadas durante aproximadamente 6 segundos em uma suspensão aquosa de conídios de *B. bassiana* produzidos em meio sólido. Os insetos foram mantidos em placas de Petri contendo algodão umedecido e pedaços de folha da planta de café a 25°C até a morte dos insetos e aparecimento de conídios. Com o auxílio de uma alça de platina esses conídios foram repicados em meio sólido do mesmo modo que descrito anteriormente para posterior preparo do inóculo (NEVES; HIROSE, 2005).

4.3 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado pela transferência de conídios do meio de cultivo sólido com dez dias de desenvolvimento, a água destilada contendo 0,03% (v/v) de Tween 20. A suspensão de conídios foi ajustada a 10^8 conídios/mL utilizando câmara de Neubauer (hematocitômetro) para a contagem das células.

4.4 CULTIVO DO MICRORGANISMO

O cultivo do fungo *B. bassiana* foi conduzido de duas maneiras: para a produção de quitinases extracelulares em meios com e sem agentes indutores, e para a obtenção de biomassa para extração do DNA e estudo do gene da quitinase.

4.4.1 Curva de Crescimento

Foram realizados três cultivos para caracterizar a produção de quitinases durante o crescimento do fungo, um cultivo padrão e dois cultivos testes acrescidos de substratos indutores da produção de quitinases. A cepa utilizada foi a CG432, isolada de um inseto da família Membracidae (Hemiptera), no Estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil.

4.4.1.1 Cultivo Padrão

Todos os cultivos foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade de 125mL contendo 50mL de meio de cultivo líquido de mesma composição que o meio sólido, porém sem o ágar e o antibiótico. Após autoclavagem a 120°C por 20 minutos,

os frascos foram inoculados a 1% (v/v) com a suspensão de conídios 10^8 /mL e mantidos em incubadora orbital a 150rpm, 28°C sob luz contínua. Os cultivos foram interrompidos em duplicata a cada 24 horas durante 9 dias juntamente com um controle sem o inóculo.

Para a obtenção de biomassa para a extração de DNA e estudo do gene, 30 cepas (Tabela 1) foram cultivadas conforme descrito acima, porém interrompidas no 5º dia de cultivo.

Tabela 1 – Hospedeiro e origem das cepas de *Beauveria bassiana* utilizadas para a verificação da atividade enzimática e polimorfismo no gene da quitinase.

Isolados	Hospedeiro	Família	Origem
CB102	solo		SP-Brasil
CB66	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	SP-Brasil
CB97	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	
CG82	<i>Diabrotica speciosa</i>	Coleoptera: Crysomelidae	TU-Argentina
CG425	<i>Rhammatocerus schistocercoides</i>	Orthoptera: Acrididae	MT-Brasil
447-ESALQ	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	MT-Brasil
CG481	<i>Diabrotica speciosa</i>	Coleoptera: Crysomelidae	BA-Brasil
CG26		Coleoptera	DF-Brasil
CG432		Hemiptera: Membracidae	RN-Brasil
CG458	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Curculionidae	PR-Brasil
CG138	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	PE-Brasil
CG368	solo		PE-Brasil
CB64	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	RO-Brasil
UEL54	<i>Diabrotica sp.</i>	Coleoptera: Crysomelidae	PR-Brasil
UEL08	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
UEL04	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
CG375	<i>Colaspis sp.</i>	Coleoptera: Crysomelidae	DF-Brasil
CB95	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	MT-Brasil
UEL55		Hemiptera	PR-Brasil
UEL07	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
CB74	<i>Lyssorhoptus oryzophilus</i>	Coleoptera: Curculionidae	Japão
CB82	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	
CG166	Não identificado		PR-Brasil
CG71	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lepidoptera: Pyralidae	PE-Brasil
CG25	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lepidoptera: Noctuidae	DF-Brasil
CG245		Hymenoptera: Megachilidae	GO-Brasil
CB35	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	BA-Brasil
CB47	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Curculionidae	SP-Brasil
UNI4	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Coleoptera: Tenebrionidae	PR – Brasil
CB17	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Curculionidae	SP – Brasil

4.4.1.2 Cultivos Induzidos

4.5 INTERRUPÇÃO DO CULTIVO

Os cultivos induzidos foram realizados nas mesmas condições do cultivo padrão, porém acrescidos de 1% de exúvias trituradas das larvas de *Tenebrio molitor* ou adultos mortos triturados de *Zabrotes subfasciatus*. Os substratos indutores foram acrescentados ao meio de cultivo juntamente com os demais reagentes e autoclavados.

Os cultivos foram interrompidos por filtração em papel filtro Whatman No.1 sob pressão negativa. A biomassa foi utilizada para determinação do peso seco, no caso da Curva de Crescimento, ou como fonte de DNA, para o estudo do gene da quitinase, e o extrato livre de células (ELC) utilizado como fonte de quitinases.

4.6 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa foi determinada por gravimetria. As biomassas obtidas em cada dia de cultivo foram lavadas duas vezes com 50mL de água destilada e secas a 70°C até peso constante.

4.7 DIÁLISE

O ELC foi submetido à diálise em membranas de 12kDa de exclusão contra tampão acetato 5mM pH 5,0 a 4°C durante 24 horas e realizadas três trocas do tampão.

4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.8.1 Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando como padrão soroalbumina bovina 1,0mg/mL.

4.8.2 Determinação de Açúcares Totais

O teor de açúcares totais foi determinado pelo método de Dubois *et al.* (1956) utilizando como padrão glucose 1,0mg/mL.

4.8.3 Determinação de Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi (1945) utilizando como padrão glucose 1,0mg/mL.

4.8.4 Determinação de *N*-acetilglucosamina

O teor de *N*-acetilglucosamina foi determinado pelo método de Reissig *et al.* (1955) utilizando como padrão *N*-acetilglucosamina 100µg/mL.

4.8.5 Atividade de Quitinases

4.8.5.1 Preparo do Substrato

Para preparar o substrato da reação, 10g quitina em flocos (Practical Grade, Sigma) foi dissolvida em 100mL de HCl concentrado sob agitação durante 30 minutos a 40°C. A quitina foi precipitada como uma suspensão coloidal, por meio de lenta adição de água gelada (1L). A suspensão coloidal foi coletada por centrifugação 7000xg por 20 minutos e submetida a várias lavagens em água de torneira, seguidas de centrifugação até que o pH da água de lavagem alcançasse valor em torno de 5,5 (KANG; PARK; LEE, 1999). A quitina coloidal assim obtida foi padronizada em 90% de umidade e utilizada para preparar uma solução 1% (p/v) em tampão adequado para cada experimento.

4.8.5.2 Determinação da Atividade de Quitinases

A atividade de quitinases foi determinada por adaptações da técnica de Nahar, Ghormade e Deshpande (2004). 1mL de quitina coloidal 1% e 0,5mL do ELC dialisado foram incubados durante 1 hora. O tubo branco foi composto de 1mL de substrato e 0,5mL de tampão e o tubo controle 1mL de tampão e 0,5mL de ELC. A reação foi interrompida em banho-maria fervente por 1 (um) minuto. A quitina residual foi separada por centrifugação a 1000xg por 15 minutos e o sobrenadante usado para a determinação de *N*-acetilglucosamina produzidos pela ação enzimática empregando o método descrito por Reissig *et al.* (1955). Nesta metodologia 250µL do sobrenadante foram incubados com 50µL de tetraborato de sódio 0,8M pH 8,9 a 100°C por 3 minutos, resfriados, adicionado 1,5mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído e mantidos a 37°C por 20 minutos. A absorvância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 585nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade em microgramas de *N*-acetilglucosamina liberados por mililitros de ELC nas condições da reação.

4.8.5.3 Determinação do Efeito do PH e Concentração do Tampão

Para a determinação do efeito do pH sobre a atividade de quitinases as reações foram realizadas a 50°C durante 1 hora utilizando soluções tampão 50, 100 e 200mM em diferentes pHs para o preparo do substrato. Para os valores de pH iguais a 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0 foi utilizado tampão acetato, pH de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0, tampão fosfato, e para pH 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 e 10,0, tampão glicina-NaOH. Reações branco e controle para cada tampão foram realizadas conforme descrito anteriormente.

4.8.5.4 Determinação do Efeito da Temperatura

Para a determinação do efeito da temperatura sobre a atividade de quitinases as reações foram realizadas utilizando o substrato preparado em tampões acetato e fosfato 50mM pH 5,5 e 6, respectivamente, para todas as amostras, e glicina-NaOH 50mM pH 8,5 para o cultivo padrão, e pH 8,0 para os cultivos induzidos. As reações foram incubadas durante 1 hora em temperaturas entre 30 e 60°C, em intervalos de 5 unidades de temperatura.

4.8.5.5 Efeito do Tempo de Reação

Para a análise do efeito do tempo de reação sobre a atividade de quitinases, o ELC foi incubado com quitina coloidal preparada em soluções 50mM dos tampões acetato pH 5,5, fosfato pH 6,0 e glicina-NaOH pH 8,5 a 45°C durante 1 hora. A atividade das quitinases foi medida a cada 15 minutos de incubação.

4.8.5.6 Análise da Estabilidade Térmica das Quitinases

Para analisar a estabilidade térmica das quitinases extracelulares produzidas por *B. bassiana*, os ELC do 5º dia de cultivo das três condições testadas foram mantidos a 30, 40 e 50°C e incubados periodicamente com o substrato quitina coloidal para a determinação da atividade enzimática até que a atividade detectada fosse próxima de zero.

Para a análise de quitinases ativas em pH ácido a reação enzimática foi realizada a 45°C em tampão acetato 50mM pH 5,5. As quitinases ativas em pH alcalino foram analisadas a 45°C em tampão glicina-NaOH 50mM pH 8,5 para o cultivo padrão e pH 8,0 para os cultivos induzidos.

4.9 ISOLAMENTO DE QUITINASES

Para os procedimentos de isolamento, o ELC foi inicialmente filtrado em aparelho de ultrafiltração (Millipore modelo 8400) em membrana de porosidade controlada de 100kDa (PBHK polietersulfona-Millipore) sob pressão de nitrogênio igual a 14psi (1kgf/cm²). O filtrado foi submetido à concentração em membrana de porosidade controlada de 10kDa (YM30 celulose regenerada-Millipore) sob mesma pressão de nitrogênio e o material retido (R10) foi fracionado por cromatografia de exclusão molecular seguida de troca iônica.

4.9.1 Cromatografia de Exclusão Molecular

O ELC concentrado (R10) foi eluído em gel Sephadex G-100 em coluna de vidro de 1,20cm de diâmetro e 120cm de altura, contendo 194,38mL de gel, volume morto de 87mL, utilizando como eluente tampão fosfato 10mM pH 7,0 a 18mL/hora, 10 minutos por tubo. As frações de 3mL coletadas foram analisadas quanto à presença de proteínas por leitura de absorvância em $\lambda=280\text{nm}$ e quanto à atividade de quitinases conforme descrito anteriormente. As frações com atividade de quitinases, de tamanhos moleculares e tempo de retenção semelhantes foram reunidas e quantificadas quanto ao teor de proteínas e atividade de quitinases.

4.9.2 Cromatografia de Troca Iônica

A fração reunida obtida da cromatografia de exclusão molecular foi concentrada em aparelho de ultrafiltração em membrana de porosidade controlada de 10kDa e submetida à separação por cromatografia de troca iônica em 35,34mL de resina de DEAE-celulose (1,50cm diâmetro x 15cm altura) utilizando tampão fosfato 10mM pH 7,0 como eluente em fluxo de 40mL/hora, 3 minutos por tubo. As proteínas adsorvidas na resina foram desorvidas utilizando 120mL de gradiente linear de concentração de 0 a 1M de NaCl. As frações de 2mL coletadas foram analisadas quanto à presença de proteínas por leitura de absorvância em $\lambda=280\text{nm}$ e atividade de quitinases. As frações contendo maiores atividades de quitinases foram reunidas e quantificadas quanto ao teor de proteínas e atividade de quitinases.

A primeira fração reunida da cromatografia em resina de DEAE-celulose foi concentrada em aparelho de ultrafiltração conforme descrito e aplicada em coluna cromatográfica de resina de CMC-celulose. Os procedimentos de eluição, desorção e análise das frações foram realizados da mesma maneira que descrito para a cromatografia em DEAE-celulose.

4.9.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As frações contendo atividade de quitinases obtidas durante o processo de purificação foram analisadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 9% (PAGE) em condições nativas em tampão TRIS-HCl pH 8,9 a 70mV (DAVIS, 1964). As bandas proteicas foram reveladas pela complexação com a prata (NIELSEN; BROWN, 1984) e as bandas glicoproteicas com o reagente de Schiff -PAS (SEGREST; JACKSON, 1972).

4.10 EXTRAÇÃO DO DNA

Os ácidos nucléicos foram extraídos segundo Bogo *et al.* (1996), com modificações. O micélio obtido pela filtração do meio de cultivo foi lavado em água deionizada, filtrado e seco em papel toalha. O material assim tratado foi reduzido a pó em gral de porcelana na presença de nitrogênio líquido. O pó obtido foi distribuído em tubos de microcentrífuga de 2mL, adicionados 800µL de tampão de extração (TRIS-HCl 200mM pH 8,0; EDTA 25mM pH 8,0; SDS 1% p/v; NaCl 250mM), homogeneizado e incubado a 65°C durante 1 hora.

À mistura de extração foram adicionados 800µL de fenol, misturando-se levemente as fases, seguida de centrifugação a 15.000xg por 15 minutos. A fase aquosa, onde permanece o DNA, foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e adicionado volume equivalente de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico (25:24:1). A solução foi levemente agitada e submetida à nova centrifugação a 15000xg por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo de microcentrífuga e tratada com volume igual de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), homogeneizada e centrifugada a 15.000xg por 15 minutos. Após a centrifugação a fase aquosa foi dividida em dois tubos contendo 400µL cada.

Após esta fase de desproteínização, o DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de cloreto de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi mantida a -20°C por cerca de 1 hora. O DNA foi recuperado por centrifugação a 15.000xg por 5 minutos a temperatura ambiente, lavado com etanol 70% e seco. Após seco, o pellet foi ressuspenso em 100µL de água ultrapura.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA obtido foi realizada por comparação da intensidade das bandas do DNA extraído com bandas de DNA de concentração conhecida em eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio visualizada em transiluminador sob luz ultravioleta.

A corrida eletroforética foi realizada com tampão Tris-borato pH 8,0 e EDTA. Após a quantificação, as amostras de DNA foram padronizadas, por diluição, em soluções contendo aproximadamente 5ng/µL e conservadas a -20°C.

4.12 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA QUITINASE

A seqüência do gene da quitinase (*chit1*) de *B. bassiana* contendo 1047 pares de bases foi obtida da base de dados *on line* National Center for Biotechnology Information (NCBI www.ncbi.nih.gov), número de acesso *GenBank* AY145440 (FANG *et al.*, 2005). A partir da seqüência foram desenhados os “primers” (*Chit1forward*: 5'-GCTCGCAACATAACCAATC-3' e *Chit1reverse*: 5'-GTCGCCAAATGTCCAATTC-3') pelo programa Gene Runner (Hastings Software, Hasting on Hudson, NY) e utilizados para amplificação do gene da quitinase de *B. bassiana* via reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987). O processo de amplificação foi realizado com um volume final de 10µL, contendo 1,0µL de tampão (Invitrogen – 200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl, 10x concentrado), 1,0µL de dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados, Eppendorf 2,5mM) contendo 200µM de cada nucleotídeo, 10pmol de cada “primer”, 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen – 50mM), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen – 5 U/µL), 1,0µL de amostra de DNA (5ng/µL) e água ultrapura suficiente para 10µL. Reações controle negativas foram realizadas. Para amplificação do DNA foi utilizado um termociclador Biometra nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguido por mais 5 minutos a 72°C e 5°C por 5 minutos. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em transiluminador sob luz ultravioleta e o tamanho do produto obtido foi calculado com auxílio do software DNAfrag (ROOD; GAWTHORNE, 1984).

4.13 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE DA QUITINASE

Os produtos de amplificação foram analisados quanto à existência de polimorfismo por meio da digestão do produto de PCR por endonucleases. As enzimas utilizadas foram selecionadas baseando-se na mesma seqüência utilizada para desenho dos “primers”. A seleção das enzimas foi feita através do programa AcaClone pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>). Neste módulo, o programa utiliza um banco de seqüências correspondentes a sítios de enzimas de restrição, atualizado via internet, que por comparação apresenta o número e a localização destes sítios dentro da seqüência analisada. Além de

fornecer e posicionar os sítios, o programa permite uma simulação de restrição simples ou múltipla, permitindo a seleção baseando-se no número e tamanho de fragmentos gerados. Nove enzimas foram selecionadas: *DrdI*, *HgaI*, *FokI*, *AflIII*, *BtgI*, *BstF5I*, *KasI*, *BseYI* e *BglI* (Tabela 2).

Tabela 2 – Enzimas de restrição selecionadas com o auxílio do programa pDRAW32 e utilizadas na verificação de polimorfismo no gene da quitinase de *B. bassiana*, seus respectivos sítios de restrição, unidades de enzimas empregadas na reação, temperatura de reação e tamanho esperado dos fragmentos.

Enzima de restrição	Sítio de restrição	Unidades	Temp. (°C)	Fragmento (pares de bases)
<i>DrdI</i>	5' -GAC(N) ₄ ī(N) ₂ GTC -3'	2,5	37	593 – 319 – 123
<i>HgaI</i>	5' -GACGC(N) ₅ ī -3'	1	37	726 – 216 – 93
<i>FokI</i>	5' -GGATG(N) ₉ ī -3'	2	37	776 – 199 – 60
<i>AflIII</i>	5' -AīCPuPyGT – 3'	2,5	37	579 – 344 – 112
<i>BtgI</i>	5' -CīCPuPyGG – 3'	5	37	546 – 418 – 71
<i>BglI</i>	5' – GCCNNNNīNGGC – 3'	5	37	518-517
<i>BseYI</i>	5' – CīCCAGC – 3'	2,5	37	899-136
<i>BstF5I</i>	5' – GGATGNNī – 3'	5	65	763 – 212 – 60
<i>KasI</i>	5' – GīGCGCC – 3'	4	37	528 – 414 -93

As reações de restrição foram realizadas em tubos individuais contendo 10µL do produto de PCR, 1,5 µL de tampão 10X, 1,5 µL de soro albumina bovina 100µg/mL de acordo com as recomendações do fabricante, unidades enzimáticas conforme descrito na Tabela 2 e completados para um volume final de 15µL com água ultrapura. As reações foram incubadas durante 4 horas observando-se as condições descritas pelo fabricante. Os resultados da digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados na forma de dos artigos 1, 2 e 3, que constam nos anexos A, B e C, respectivamente.

Artigo 1, intitulado: “Efeito das condições de reação sobre a atividade de quitinases ativas em pH ácido e alcalino produzidas por *Beauveria bassiana*”.

Artigo 2, intitulado: “Indução de isoformas de quitinases do fungo *Beauveria bassiana* em cultivos enriquecidos com substratos derivados de insetos praga”.

Artigo 3, intitulado: “Análise do gene da quitinase de *Beauveria bassiana* relacionado com a mortalidade sobre a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, e a atividade enzimática”.

6 CONCLUSÕES

A cepa CG432 de *B. bassiana*, previamente ativada em adultos vivos de broca do café, produziu quitinases durante a fase estacionária de crescimento. As quitinases apresentaram atividade ótima a 45°C e em valores de pH ácidos 5,5 e 6,0 em todas as condições de cultivo testadas. As quitinases produzidas no cultivo padrão demonstraram atividade ótima também em pH 8,5, enquanto que as quitinase produzidas nos cultivos induzidos, em pH 8,0. Além disso, as quitinases apresentaram, caracteristicamente, estabilidade térmica superior a outras quitinases fúngicas. Os meios de cultivo enriquecidos com substratos quitinosos derivados de insetos praga induziram pelo menos 50% da atividade e aumentaram o tempo de produção das quitinases, especialmente daquelas quitinases ativas em pH ácido.

Durante o isolamento por métodos cromatográficos de gel filtração e troca-iônica, e eletroforese, estas quitinases apresentaram comportamento compatível com moléculas de carga elétrica efetiva pouco definida característica de glicoproteínas, mas o elevado teor de carboidratos das frações com atividade de quitinases sugere associações com polissacarídeos, aparentemente produzidos durante o cultivo do fungo.

A amplificação do gene da quitinase resultou em um produto de aproximadamente 1050 pares de bases nas 30 cepas testadas. Destas, três apresentaram polimorfismo quando digeridas com a enzima *FokI*, uma quando utilizada a enzima *DrdI* e uma quinta cepa quando a enzima *KasI* foi utilizada. Os polimorfismos observados não possibilitaram uma correlação dos polimorfismos observados no gene da quitinase com a mortalidade causada sobre indivíduos adultos da broca-do-café ou com a atividade enzimática. Isto sugere que a virulência diferencial entre as cepas talvez não esteja ligada diretamente com a estrutura ou com as quitinases expressas e sim, a outros fatores enzimáticos ou toxigênicos dos fungos que atuam de modo sinérgico.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed.Piracicaba:FEALQ, 1998, 1163p.

BARRETO, C.C.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, MH. Distribution of chitinases in entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. **Current Microbiology**, v.48, p.102-107, 2004.

BLAISEAU, P.L.; LAFAY, J.F. Primary structure of a chitinase-encoding gene (*chi1*) from the filamentous fungus *Aphanocladium album*: similarity to bacterial chitinases. **Gene**, v.120, p.243-248, 1992.

BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; GIMÉNEZ, D.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isomeric viral particles isolated from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 100, p.1468-1472, 1996.

BOGO, M.R.; ROTA, C.A.; PINTO Jr., H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current Microbiology**, v.37, p.221-225, 1998.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T.; SILVA, M.V.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology**, v.50, p.257-261, 2005.

CASTRILLO, L.A.; WIEGMANN, B.M.; BROOKS, W.M. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p. 269-275, 1999.

CHAPMAN, R.J. Integument. In: _____. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge University Press, 1998. p.415-440.

CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v.4, n.5, p.197-203, May, 1996.

COATES, B.S.; HELLMICH, R.L.; LEWIS, L.C. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. **Mycological Research**, v.160, n.1, p.40-50, Jan. 2002.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.270-277, 1998.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.90, p.456-465, 2000.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p.404-427, Dec. 1964.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ENTOMOLOGY. Disponível em
<<http://bugs.bio.usyd.edu.au/Entomology/InternalAnatomy/imagepages/cuticlestructure.htm>>
> Acesso em 26 jan 2005.

FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y. ; FENG, J. ; YANG, X. ; ZHANG, Y. ; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.1, p.363-370, Jan. 2005.

FUGUET, R.; THÉRAUD, M.; VEY, A. Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.138, p.149-161, 2004.

GAITAN, A.; VALDERRAMA, A.M.; SALDARRIAGA, G.; VELEZ, P.; BUSTILLO, A. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. **Mycological Research**, v.106, n.11, p.1307-1314, Nov. 2002.

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v.16, p.132-137, 1992.

HAVUKKALA, I.; MITAMURA, C.; HARA, S.; HIRAYAE, K.; NISHIZAWA, Y.; HIBI, T. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.97-102, 1993.

HIROSE, E. **Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: hyphomycetes) virulentos à broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)**. 2000. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 66p.

HORSESHOE CRAB HISTORY, BIOLOGY, RESEARCH AND CONSERVATION.

Disponível em <<http://www.ocean.udel.edu/horseshoecrab/Research/chitin.html>>. Acesso em 09 fev 2006.

KANG, S.C.; PARK, S.; LEE, D.G. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, p.267-271, 1998.

_____. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.276-281, 1999.

KHACHATOURIANS, G.G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In _____: **The Mycota VI: human and animal relationships**. Howard/Miller (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

KOSIR, J.M.; McPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, n.7, p.534-541, Jul. 1991.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M. Selection of *B. bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.93, n.6, p.839-846, nov/dez. 1998.

MAURER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P.A.; BRIDGE, P.D.; RIBA, G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**, v.101, n.2, p.159-164, 1997.

MORAES, C.K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v.46, p.205-210, 2003.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.

MURO, M.A.; MEHTA, S.; MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenia and other countries, and their correlation with host and geographical origin. **FEMS Microbiology Letters**, v.229, p.249-257, 2003.

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.80-88, 2004.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n.1, p. 77-82, 2005.

NIELSEN, B.L., BROWN, L.R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.141, n.2, 311-315, Sep., 1984.

PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Eletrophoretic karyotype of the entomopathogenic deuteromycete *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.231-235, 1993.

PINTO, A.S.; BARRETO, O.C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C.J.; VAINSTEIN, M.H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.322-327, 1997.

QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v.108, n.4, p.441-452, Apr. 2004.

REISSIG, J.L.; STROMINGER, J.L.; LELOIS, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugar. **Journal of Biological Chemistry**, v.217, n.2, p.959-966, 1955.

ROOD, J.I.; GAWTHORNE, J.M. Apple software for analysis of the size of restriction fragments. **Nucleic Acids Research**, v.12, n.1, p.689-697, Jan. 1984.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.317-338, 1993.

SCREEN, S.E.; HU, G.; ST.LEGER, R.J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* *sf.anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae sf. acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.260-266, 2001.

SEGREST, J.P.; JACKSON, R.L. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. **Methods in Enzymology**, v.28, p.54-63, 1972.

SHARMA, S.; AGARWAL, G.P.; RAJAK, R.C. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.32, p.168-171, Mar. 1994.

SHUBAKOV, A.A.; KUCHERYAVYKH, P.S. Chitinolytic activity of filamentous fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.5, p.445-447, 2004.

SILVA, M.V.; SANTI, L.; STAATS, C.C.; COSTA, A.M.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exo chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v.156, p.382-392, 2005.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, p.61-68, Sep. 1945.

ST.LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.85-95, 1986.

ST.LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.167-177, 1986a.

_____. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal of General Microbiology**, v.132, p.1509-1517, 1986b.

ST.LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; RIZZO, N.W.; ROBERTS, D.W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.3, p.907-912, Mar. 1996.

ST.LEGER, R.J.; JOSHI, L. The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. In _____: **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Lacey, L. (Ed.). Academic Press, New York, 1997.

ST.LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.2, p. 709-713, Feb. 1998.

ST.LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.81-84, 1993.

TANADA, Y. Fungal infections. In: _____. **Insect Pathology**. Academic Press, 1993. p.318-387.

THARANATHAN, R.N.; KITTUR, F.S. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.64-87, 2003.

URIBE, D.; KHACHATOURIANS, G.G. Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveals high intraspecific variation. **Mycological Research**, v.108, n.9, p.1070-1078, Sep. 2004.

WANG, C.; FAN, M.; LI, Z.; BUTT, T.M. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.861-870, 2004.

WANG, C.; SHAH, F.A.; PATEL, N.; LI, Z.; BUTT, T.M. Molecular investigation on strains relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, v.5, n.10, p.908-915, 2003.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo 1: “Efeito das condições de reação sobre a atividade de quitinases ativas em pH ácido e alcalino produzidas por *Beauveria bassiana*”.

Efeito das condições de reação sobre a atividade de quitinases ativas em pH ácido e alcalino produzidas por *Beauveria bassiana*

SASSÁ, Danieli Cristina¹; VARÉA-PEREIRA, Geni³; WU, Jo I²; SUGAHARA, Vanessa Hitomi²; MIYAGUI, Dalva Tomoe³.

¹Mestrado em Biotecnologia, ²Acadêmica do Curso de Farmácia, ³Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário, CEP 86051-990 Londrina – PR, Brasil, telefone (43) 33714270 www.uel.br/cce/bioquimica, gpvarea@uel.br

RESUMO

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico utilizado no controle biológico de insetos-praga causadores de prejuízos para a produção agrícola de alimentos. O mecanismo de infecção envolve a produção de proteases, quitinases e lipases extracelulares que degradam a cutícula do inseto. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do pH, temperatura, concentração do tampão e tempo de reação sobre a atividade de quitinases extracelulares de *B. bassiana* CG432 previamente ativada em broca do café (*Hypothenemus hampei*). Extratos livres de células foram separados pela filtração do meio líquido (10g de D-glucose anidra, 5g de extrato de levedura, 1,58g de NaNO₃, 1,05g de Na₂HPO₄.7H₂O, 1g de KCl, 0,6g de MgSO₄.7H₂O e 0,36g de KH₂PO₄ e água para 1 litro) obtido no quinto dia de cultivo. A atividade das quitinases foi determinada pela quantificação de resíduos de Nacetilglucosamina liberados pela degradação do substrato quitina coloidal a temperaturas de incubação de 40 a 60°C, concentrações de 50, 100 e 200 mM de tampão acetato pH 4,0 a 6,0, tampão fosfato pH 6,0 a 8,0, tampão glicina-NaOH pH 8,0 a 10,0, e a cada 15 minutos durante 60 minutos de reação. A atividade das quitinases aumentou gradativamente com o tempo de reação e foi mais elevada a 45°C, nos valores de pH iguais a 5,5; 6,0 e 8,5 utilizando as soluções dos tampões acetato, fosfato e glicina-NaOH 50mM, respectivamente. Associações de diferentes intensidades entre quitinases e moléculas de polissacarídeos, aparentemente produzidos durante o cultivo do fungo, foram propostas, pois verificou-se baixa mobilidade eletroforética e coloração PAS positiva das frações com atividade de quitinases, mesmo após cromatografia de gel filtração e troca-iônica.

Palavras-chave: quitinases, *Beauveria bassiana*, pH, temperatura

ABSTRACT

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungus used for biological control of plague insects that cause damages on the agricultural food production. The infection mechanism involves the production of extracellular proteases, chitinases and lipases that degrade insect cuticle. The objective of this study was to verify the effect of pH, temperature, buffer concentration and time of reaction on the activity of extracellular chitinases of *B. bassiana* CG432 previously activated on adults of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). Cell free extracts was separated by filtration of the fifth day culture in liquid medium (10g D-glucose anidra, 5g yeast extract, 1.58g NaNO₃, 1.05g Na₂HPO₄.7H₂O, 1g KCl, 0.6g MgSO₄.7H₂O and 0.36g KH₂PO₄ and water for 1 liter). The activity of chitinases was determined by the quantification of set free residues of *N*-acetylglucosamine for the degradation of the substrate colloidal chitin in the incubation temperatures from 40 to 60°C, buffers concentrations of 50, 100 and 200mM acetate pH 4.0 to 6.0, phosphate pH 6.0 to 8.0, glycine-NaOH pH 8.0 to 10.0, and each 15 minutes during 60 minutes of reaction. The activity of chitinases increased gradually with the reaction time and was optimal at 45°C, at values of pH the 5.5; 6.0 and 8.5 using acetate, phosphate and glycine-NaOH 50mM buffers, respectively. Associations of different intensities between chitinases and polysaccharides apparently produced during fungus growth, was suggested, therefore it was verified low electrophoretic mobility and positive PAS coloration of the fractions with activity of chitinases, even after gel filtration and ion-exchange chromatography.

Keywords: chitinase, *Beauveria bassiana*, pH, temperature.

1 INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos têm sido utilizados como alternativa para o controle de insetos-praga na agricultura e redução do uso de inseticidas químicos. Estes fungos apresentam vantagens em relação a outros agentes microbianos de controle biológico, porque não necessitam ser ingeridos para causar doença nos insetos (ALVES, 1998). A infecção ocorre via tegumentar como resultado da pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e produção de enzimas hidrolíticas, especialmente proteases e quitinases, que degradam os principais constituintes da cutícula do inseto, proteínas e quitina (KHACHATOURIANS, 1996). A quitina consiste de uma cadeia de poli- -1,4-*N*-acetilglucosamina (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998), e representa em torno de 25-40% da cutícula do inseto (ST.LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986). As cadeias adjacentes de quitina estão interligadas por pontes de hidrogênio formando microfibrilas que ficam embebidas e unidas, através de ligações cruzadas, com moléculas de proteínas que perfazem até 70% da cutícula (CHAPMAN, 1998). Cultivos dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviridae*, *Beauveria bassiana* e *Aspergillus flavus* demonstraram a produção de múltiplas isoformas de quitinases extracelulares resistentes à ação proteolítica, reguladas por mecanismos de indução-repressão exercidos pela quitina e seus produtos de degradação liberados no meio de cultivo (ST.LEGER; STAPLES; ROBERTS, 1993), classificadas como quitinases ácidas ou alcalinas, com pH isoelétricos iguais a 4,8 e 7,5, respectivamente (ST.LEGER *et al.*, 1996).

Imagens de microscopia eletrônica da cutícula de larvas de *Manduca sexta* tratadas com anticorpo anti-quitinases e infectadas pelos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *M. flavoviridae* e *B. bassiana*, revelaram aumento significativo da atividade de quitinases em regiões internas da cutícula, coincidentes com locais previamente degradados

por proteases, sugerindo a ação complementar destas enzimas na solubilização da cutícula e penetração do fungo (ST.LEGER *et al.*, 1996).

B. bassiana cepa CG432 isolada de inseto morto na região nordeste do Brasil, demonstrou significativos níveis de mortalidade e esporulação sobre adultos de broca do café (*Hypothenemus hampei*) (NEVES; HIROSE, 2005), e elevada produção de proteases extracelulares em apenas 3 dias de cultivo inoculados com conídios previamente ativado em seu hospedeiro (ITO *et al.*, 2006), tempo inferior aos obtidos por cultivos de *B. bassiana* em meiosw enriquecidos com substratos protéicos como gelatina e caseína (URTZ; RICE, 2000) ou derivados de insetos como cutícula moída de gafanhoto migratório (*Melanoplus sanguinipes*) (BIDOCHKA; KHACHATORIANS, 1993) e broca do café (GIRALDO-CARDOZO *et al.*, 2001). Estas proteases, precocemente produzidas, apresentaram atividade em pH alcalino 9,5 como outras proteases descritas anteriormente (BIDOCHA; KHACHATORIANS, 1987), mas se caracterizaram também por apresentar atividade em pH ácido 4,5 (STÜRMER *et al.*, 2004).

Considerando as evidências de que a instalação da infecção de fungos entomopatogênicos é resultante da ação sinérgica e complementar de proteases e quitinases, o presente trabalho teve como objetivo estudar as propriedades cinéticas e purificação de quitinases produzidas por *B. bassiana* CG432 após ativação em adultos vivos de broca do café. Foram também discutidas possíveis agregações das quitinases com outros polímeros produzidos durante o cultivo do fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A cepa de *B. bassiana* CG432, estocada a -20°C no Banco de Patógenos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, foi inicialmente repicada em meio de cultivo sólido (20g de ágar, 10g de D-glucose anidra, 5g de extrato de levedura, 1,58g de NaNO₃, 1,05g de Na₂HPO₄.7H₂O, 1g de KCl, 0,6g de MgSO₄.7H₂O e 0,36g de KH₂PO₄, 0,5g de estreptomicina, água para 1 litro) a 25°C, 12h fotofase, durante 10 dias e posteriormente ativada em adultos vivos de broca-do-café (*H. hampei*) conforme descrito por Neves e Hirose (2005). Após a morte dos insetos e exteriorização dos fungos, os conídios foram novamente repicados em meio de cultivo sólido e utilizados para o preparo do inóculo em meio de cultivo líquido.

2.2 Produção de quitinases

Foram realizados cultivos submersos da cepa de *B. bassiana* CG432 a 28°C, 150rpm por meio da inoculação da suspensão de 10^8 conídios/mL ativados em meio de cultivo líquido com a mesma composição do meio sólido, conforme descrito por Ito *et al.* (2006), aumentando a relação meio de cultivo/ar para 1/5. Após cinco dias de cultivo, o extrato livre de células (ELC) foi separado da biomassa por filtração em papel de filtro Whatman No. 1, dialisado em membrana com limite exclusão molecular de 12kDa contra tampão acetato 5mM pH 5,0 a 4°C durante 24 horas, e utilizado para determinação da atividade das quitinases extracelulares.

2.3 Preparo do substrato

10g de quitina em flocos (Practical Grade, Sigma) foi digerida em 100mL de HCl concentrado, precipitada como quitina coloidal em água gelada até pH 5,5 (KANG; PARK; LEE, 1999), e padronizada a 90% de umidade.

2.4 Determinação da atividade de quitinases

A atividade de quitinase foi determinada por adaptações da técnica de Nahar, Ghormade e Deshpande (2004). Alíquotas de 0,5mL do ELC foram incubadas com 1mL de quitina coloidal preparada a 1% em tampões com diferentes concentrações e pH, e em diferentes temperaturas, conforme o experimento realizado. Após 1 hora, a reação enzimática foi interrompida em banho-maria fervente por 1 (um) minuto. A quitina residual foi separada por centrifugação a 1000xg por 15 minutos e o sobrenadante usado para a determinação de *N*-acetilglucosamina produzidos pela ação enzimática empregando o método descrito por Reissig *et al.* (1955). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como microgramas de *N*-acetilglucosamina liberados por mL de ELC nas condições da reação.

2.5 Efeito do pH e concentração do tampão

A atividade de quitinases foi determinada a 50°C utilizando suspensão de quitina coloidal 1% preparada em soluções 50, 100 e 200mM de tampão acetato pH 4,0 a 6,0; tampão fosfato pH 6,0 a 8,0; e tampão glicina-NaOH pH 8,0 a 10,0, em intervalos de 0,5 unidades de pH.

2.6 Efeito da temperatura e do tempo de reação

Alíquotas de ELC e substrato quitina coloidal preparado em soluções 50mM de tampão acetato pH 5,5, fosfato pH 6,0 e glicina-NaOH pH 8,5 foram incubados nas temperaturas 30 a 60°C e a atividade de quitinases foi determinada em intervalos de 5°C.

Alíquotas de ELC foram incubadas com quitina coloidal preparada em soluções 50mM dos tampões acetato pH 5,5, tampão fosfato pH 6,0 e tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 45°C durante 1 hora. A atividade das quitinases foi medida a cada 15 minutos de incubação.

2.7 Purificação de quitinases

Ultrafiltração

O ELC obtido no quinto dia de cultivo foi inicialmente ultrafiltrado (Millipore modelo 8400) em membranas de porosidade controlada de 100kDa (PBHK polietersulfona-Millipore), e o filtrado resultante foi concentrado (100 vezes) e dialisado em membranas de porosidade controlada de 10kDa (YM30 celulose regenerada-Millipore).

Cromatografia

O concentrado (R10) foi submetido à cromatografia de gelfiltração em coluna (120cm altura x 1,2cm diâmetro) empacotada com resina Sephadex-G100 empregando fluxo de 18mL/h.

As frações separadas pela gelfiltração e que apresentaram maior atividade de quitinases foram reunidas e submetidas à separação por cromatografia de troca-iônica em coluna (15cm altura x 1,5cm diâmetro) empacotada com resina DEAE-Celulose empregando fluxo de 40mL/h. A separação das proteínas foi obtida aplicando-se 120mL de gradiente linear de 0 a 1mM de NaCl no tampão de equilíbrio.

As frações que não se ligaram à resina DEAE-celulose (Pico I) que

apresentaram maior atividade de quitinases foram reunidas e submetidas à separação por cromatografia de troca-iônica em coluna empacotada com resina CM-celulose, nas mesmas condições descritas para DEAE-Celulose.

Em todos os procedimentos cromatográficos, o equilíbrio das colunas e a eluição das proteínas foi realizada em tampão fosfato 5mM pH 7,0 e as frações coletadas foram monitoradas por leitura de absorvância em 280nm, e pela determinação da atividade de quitinases em pH ácido e alcalino.

2.8 Determinação de proteínas e carboidratos

Alíquotas de ELC e das frações reunidas em todas as etapas do isolamento foram analisadas quanto ao teor de proteínas, carboidratos totais e redutores pelos métodos espectrofotométricos de Bradford (1976), Dubois *et al.* (1956) e Somogy (1945), utilizando soluções padrão soro albumina bovina e glucose 1mg/mL, respectivamente

2.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Alíquotas contendo cerca de 15µg de proteínas isoladas nas frações R10, Sephadex, DEAE-celulose (Pico II) e CMC (Pico I) foram analisadas em eletroforese PAGE descontínua em condições nativas com 9% de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 8,9 (DAVIS, 1964). As bandas protéicas foram reveladas pela complexação com prata (NIELSEN; BROWN, 1984) e as bandas glicoproteicas com o reagente de Schiff -PAS (SEGREST; JACKSON, 1972).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do pH e concentração do tampão

Observou-se maior atividade de quitinases em tampões a 50 mM de íons acetato pH 5,5 (Figura 1A), fosfato pH 6,0 (Figura 1B) e glicina-NaOH pH 8,5 (Figura 1C) sobre quitina coloidal, um substrato pouco específico, sugerindo a produção de diferentes isoformas de quitinases extracelulares no quinto dia de cultivo de *B. bassiana* CG432. A força iônica resultante desta concentração dos tampões, provavelmente foi mais adequada tanto para a solubilização do substrato, tornando-o mais acessível, como para o rearranjo do sítio catalítico da enzima, uma vez que o aumento da concentração dos íons constituintes dos tampões acetato e glicina-NaOH reduziu significativamente (Figura 1A e 1C) e inativou totalmente a atividade das quitinases em tampão fosfato 200mM (Figura 1B). Segundo Cohen-Kupiec e Chet (1998), as quitinases fúngicas apresentam homologia com quitinases bacterianas e vegetais, que apresentam ácido aspártico e dois resíduos de ácido glutâmico (Glu) essenciais para a atividade catalítica. Um dos resíduos Glu, provavelmente, age como um catalisador ácido geral, por analogia com outras glicosil hidrolases, enquanto o outro resíduo Glu pode funcionar como uma base, promovendo um ataque nucleofílico pela água sobre os carbonos anoméricos dos substratos quitinosos. Desta forma, o grande número de cargas negativas dos tampões mais concentrados (Figura 1), especialmente os íons fosfato, potencialmente com maior número de cargas negativas por mol, pode ter saturado os sítios de ligação com as moléculas do substrato, promovendo a redução da interação enzima-substrato.

DESHPANDE, 2004). Um mecanismo clássico de ataque multicadeia envolvendo quebras aleatórias simples e, especialmente, uma forte ligação da quitinase com seu substrato insolúvel, sem a necessidade de difusão da enzima de molécula a molécula, foi proposto por St Leger, Cooper e Charnley (1986), e novamente observado por St Leger, Cooper e Charnley (1991).

Vale ressaltar que neste trabalho foi obtida a produção de quitinases na presença de 1% de glucose, considerada por outros autores como um nutriente inibidor da produção de quitinases (SILVA *et al.*, 2005.) e sem o enriquecimento do meio de cultivo com substratos indutores de quitinases. Estes resultados podem estar relacionados com a prévia ativação do inóculo do fungo em seu hospedeiro, a broca do café, uma vez que, Ito *et al.* (2006) cultivaram o mesmo fungo *B. bassiana* CG432 nas mesmas condições de cultivo utilizadas neste trabalho e também obtiveram produção de proteases extracelulares em menor tempo de cultivo e com elevada atividade, quando comparada com outros resultados da literatura (URTZ; RICE, 2000).

3.2 Efeito da temperatura e do tempo de reação

As quitinases apresentaram atividade máxima a 45°C e inativação total com elevação da temperatura de 50 a 60 °C nos tampões e pH ideais (Figura 2A) definidos no item 3.1. Nestas condições, a atividade das quitinases aumentou em função do tempo de reação (Figura 2B), demonstrando que foram estáveis durante os 60 minutos utilizados como tempo de reação para determinar a atividade das quitinases neste trabalho. A maioria de endo e exoquitinases envolvidas na morfogênese e na interação parasito-hospedeiro produzidas por diferentes fungos entomo e fitopatogênicos apresentaram atividade ótima em pH próximo de

5,0 com extremos de 2,5 e 8,0, temperaturas de 38 a 50°C, e diferentes graus de estabilidade possivelmente relacionados à glicosilação da molécula (SAHAI; MANOCHA,1993).

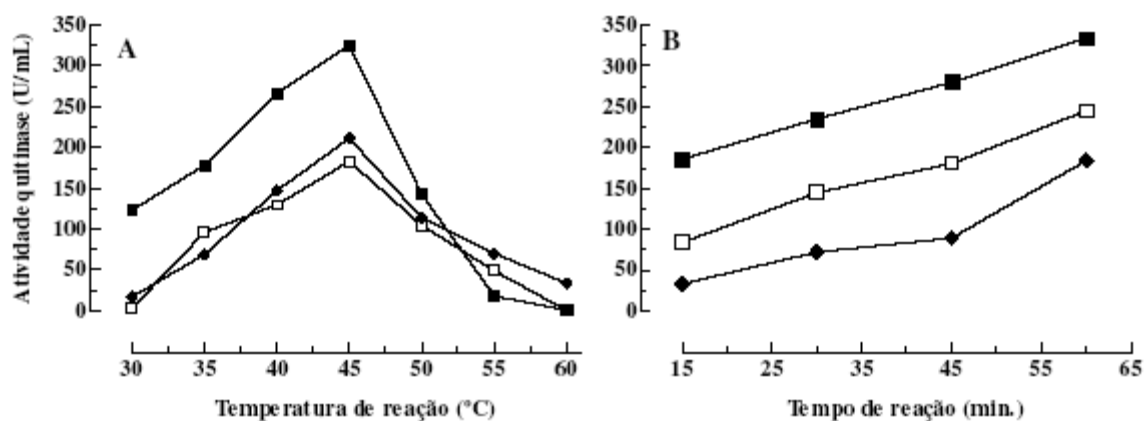


Figura 2: Efeito da temperatura (A) e do tempo de reação (B) sobre a atividade de quitinases extracelulares do extrato livre de células de *B. bassiana* CG432, nos tampões 50 mM acetato pH 5,5 (◻), fosfato pH 6,0 (◻) e glicina-NaOH pH 8,5 (◼).

3.3 Purificação de quitinases

Considerando que as quitinases apresentaram atividades inferiores em tampão fosfato pH 6,0, somente as quitinases ativas em pH 5,5 e 8,5 foram analisadas durante o isolamento.

Tabela 1: Purificação parcial de quitinases ativas em pH ácido e alcalino produzidas por *B. bassiana* CG432.

Etapas da purificação	Volume (mL)	Proteínas (mg)	Atividade de quitinase (U)				Atividade Específica (U/mg de proteínas)		Fator de purificação		CHO (mg)
			pH 5,5		pH 8,5		pH 5,5	pH 8,5	pH 5,5	pH 8,5	
			U total	U/ml	U total	U/ml					
ELC	2200	206,3	1.067.941	485	566.748	257	5.177	2.747	1,0	1,0	81
Ultrafilt.											
R100	8	-	34.614	-	3.722	-	-	-	-	-	-
R10	21	13,7	198.129	9.435	45.945	2.188	14.462	3.353	2,8	1,2	58
Sephadex	32	8,2	22.860	714	13.281	415	2.786	1.619	0,5	0,5	48,4
DEAE											
Pico I	68	2,3	16.780	247	6.778	100	7.226	2.919	1,4	1,0	9,4
Pico II	31	3,2	3.866	125	3.376	109	1.175	1.026	0,23	0,37	5,4
CMC											
Pico I	29	1,2	10.279	354	6.582	227	8.322	5.334	1,61	1,94	9,4

CHO: carboidrato

A Tabela 1 mostra que a ultrafiltração separou proteínas com pequeno percentual de atividade de quitinases na fração R100, provavelmente, devido à retenção de enzimas com massas moleculares superiores ao limite de exclusão molecular da membrana utilizada na primeira filtração do ELC, como exoquitinases de 110kDa (St LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1991) ou devido à complexação de outras quitinases, que apesar de apresentarem massas moleculares pequenas entre 30 e 80kDa (SAHAI; MANOCHA, 1993), rapidamente se complexaram com outras moléculas, especialmente carboidratos, como ocorre com uma endoquitinase de *Saccharomyces cerevisiae* que se associa com os resíduos de manana, identificados na porção carboidrato, ou com polímeros de tamanhos variados, incluindo o gel Sepharose utilizado na purificação, sendo que esta interação resultou em baixa recuperação das glicoproteínas com atividade de endoquitinases (CORREA *et al.*, 1982). Desta forma, interações semelhantes entre quitinases e o gel Sephadex utilizado neste trabalho, podem também ter sido responsáveis pela baixa recuperação das quitinases ativas em pH 5,5 e 8,5 na fração resultante da cromatografia em gelfiltração (Figura 3A e Tabela 1).

Além das interações com géis cromatográficos, as quitinases ativas em pH 5,5 e 8,5 podem ter se complexado com outros polímeros produzidos concomitantemente durante o cultivo do fungo *B. bassiana*, uma vez que todas as frações obtidas durante as etapas de purificação apresentaram teor de carboidratos (Tabela 1), possivelmente polissacarídeos, pois não foram detectados açúcares redutores (dados não mostrados). A presença de polissacarídeos nas frações pode estar relacionada com a viscosidade observada inicialmente no ELC, assim como pode ser sugerida pela elevada recuperação das quitinases ativas em pH 5,5 e 8,5 no volume de enxágüe, em torno de 73% (16.780 de 22.860) e 51% (6.778 de 13.281), respectivamente, no Pico I da DEAE-celulose, e deste total, 79% (13.270 de 16.780) e 97% (6.582 de 6.778) na CM-celulose (Figuras 3B e 3C, Tabela 1). É possível que estas quitinases não foram adsorvidas nas resinas de troca-iônica devido à maior interação

com polissacarídeos que podem mascarar a carga efetiva da porção apoproteica, quando comparada com as quitinases separadas no Pico II, cuja desorção da resina DEAE-celulose ocorreu em força iônica equivalente a cerca de 0,3M de NaCl (Figura 3B).

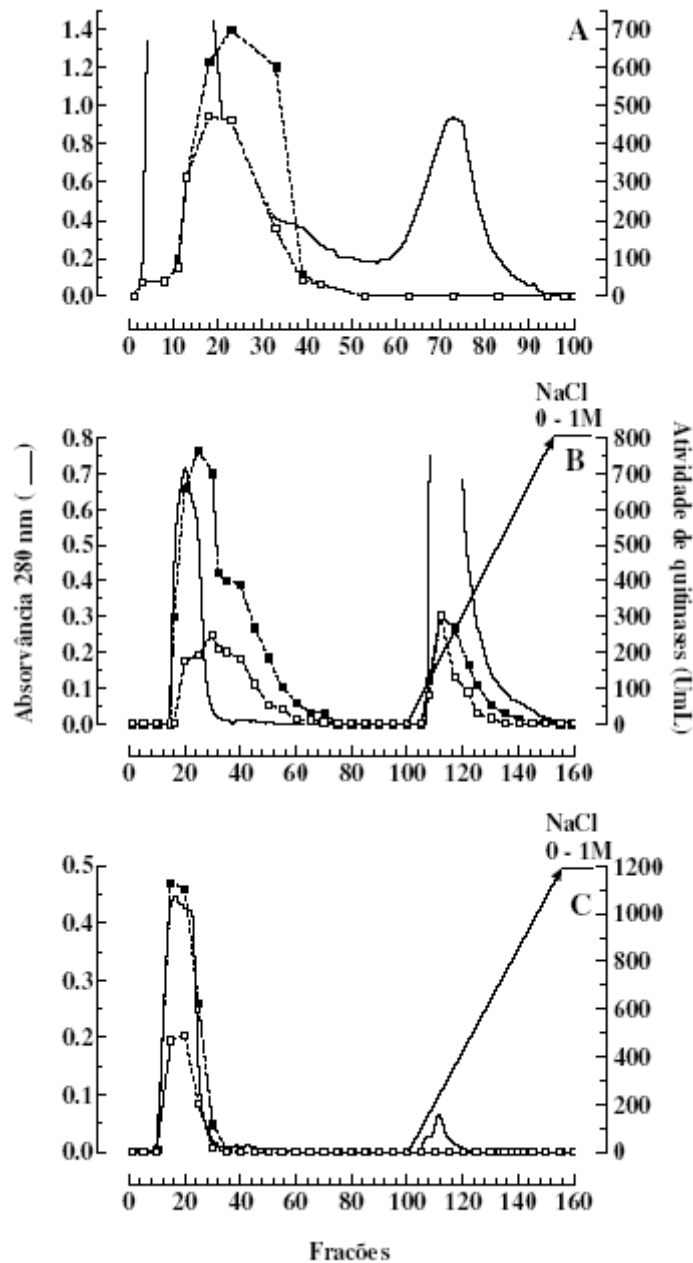


Figura 3: (A) Cromatografia Sephadex G-100 do concentrado R10 (14mg de proteínas), fluxo 18mL/hora, frações de 3mL reunidas de 10 a 35, V_0 igual a 87mL determinado pela eluição de Blue Dextran não representado no perfil cromatográfico; (B) Cromatografia DEAE-celulose do Pico I separado pelo gel Sephadex (8,2mg de proteínas), fluxo 40mL/hora, volume de gradiente linear de NaCl de 0 a 1M igual a 120mL a partir da fração número 100, frações de 2mL reunidas de 16 a 55 (Pico I), e 108 a 125 (Pico II); (C) Cromatografia CM-celulose do Pico I separado pela DEAE-Celulose (2,3mg), fluxo e gradiente iguais a B, frações de 2mL reunidas de 12 a 30 (Pico I). Quitinases extracelulares ativas em pH 5,5 (---□---) e 8,5 (---■---) produzidas por *B. bassiana* CG432 previamente ativadas em adultos vivos de broca-do-café.

Exopolissacarídeos têm sido referidos como moléculas de suporte e proteção associadas à glicoproteínas extracelulares com atividade de lacases ligninolíticas produzidas por diferentes fungos fitopatogênicos (GIANFREDA; XU; BOLLAG, 1999; GIL-AD *et al.*, 2001) como o fungo *Botryosphaeria rhodina* (OBARA *et al.*, 2005).

A revelação de bandas por coloração com PAS com muito baixa mobilidade eletroforética nos géis de poliacrilamida confirma a presença de carboidratos nas frações com atividade de quitinases (Figura 4B). Correa *et al.* (1982) e Barreto *et al.* (2004), também obtiveram bandas com pequena mobilidade eletroforética reveladas por coloração PAS coincidente com azul de comassie e nitrato de prata, dois métodos que podem revelar tanto proteínas como carboidratos. A eletroforese mostra que as quitinases eluídas no Pico I das cromatografias de troca-iônica, possivelmente permaneceram ligadas aos polissacarídeos, apesar da diferença de potencial aplicada durante a análise eletroforética, pois não definiram bandas protéicas com diferentes mobilidades relativas, como verificado com as quitinases eluídas no Pico II da DEAE-celulose reveladas com nitrato de prata (Figura 4A). Estes resultados permitem supor que as quitinases se associaram em diferentes intensidades às moléculas dos carboidratos.

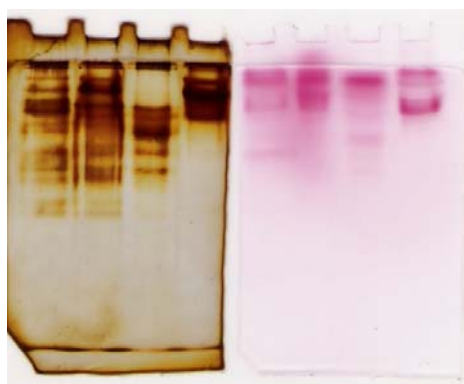


Figura 4: Eletroforese nativa descontínua em gel poliacrilamida 9% das frações com atividade de quitinases separadas pela ultrafiltração R10 (1), cromatografia Sephadex (2), Pico II da DEAEcelulose (3) e Pico I da DEAE-celulose e CM-celulose (4). A) Coloração com nitrato de prata. B) Coloração PAS.

Desta forma, a separação de carboidratos e glicoproteínas parece ser o desafio a ser vencido para o sucesso da purificação e caracterização das quitinases com atividade de quitinases ativas em pH 5,5 e 8,5 produzidas pelo fungo *B. bassiana* CG432 nas condições utilizadas neste trabalho.

4 CONCLUSÕES

B. bassiana cepa CG432 previamente ativada em adultos vivos de broca do café produziu quitinases extracelulares com atividade enzimática máxima a 45°C predominantemente em tampão acetato 50mM pH 5,5, mas foram também ativas em igual concentração de tampão fosfato pH 6 e glicina-NaOH pH 8,5. Durante o isolamento por métodos cromatográficos de gel filtração e troca-iônica, e eletroforese, estas quitinases apresentaram comportamento compatível com moléculas de carga elétrica efetiva pouco definida característica de glicoproteínas, mas o elevado teor de carboidratos das frações com atividade de quitinases permitiu supor associações com polissacarídeos, aparentemente produzidos durante o cultivo do fungo.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: a Fundação Araucária e CNPq pela concessão de Bolsa de Mestrado e recursos para realização da pesquisa; o Professor Dr Pedro M. O. J.

Neves pelo fornecimento da cepa CG432 de *B. bassiana*; os alunos de graduação Evelyn Kamogawa e Cristiane Mita, e ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163p.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BARRETO, C.C.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, MH. Distribution of chitinases in entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. **Current Microbiology**, v.48, p.102-107, 2004.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Purification and properties of na extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.7, p.1679-1684, 1987.

BIDOCHKA, M. J. AND KHACHATOURIANS, G. G. Oxalic acid hyperproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to a utilizable carbon source but not to virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p.53-57, 1993.

CHAPMAN, R.J. Integument. In:_____. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge University Press, 1998. p.415-440.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I.. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.270-277, 1998.

CORREA, J. U.; ELANGO, N.; POLACHECK, I.; CABIB, E. Endochitinase, a mannan-associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 3, p. 1392-1397, 1982.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p.404-427, Dec. 1964.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**. v. 3, p. 1-25, 1999.

GIL-AD, N. L.; BAR-NUN, N.; MAYER, A. M. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. **FEMS Microbiology Letters**. v. 199, p. 109-113, 2001.

GIRALDO-CARDOZO, E.M.G. *et al.* Actividad lopolítica y proteolítica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y su relación con la patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v.27, n.1-2, p.61-65, 2001.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITA M.; BRODWAY, R. M.; Di PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidade and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 313-318, 1993.

ITO, E. T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T.; PINOTTI, M. H. P.; NEVES, P. M. O. J. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. (aprovado para publicação em 2005).

KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.276-281, 1999.

KHACHATOURIANS, G. G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In _____: **The Mycota VI: human and animal relationships**. Howard/Miller (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.80-88, 2004.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n.1, p. 77-82, 2005.

NIELSEN, B.L., BROWN, L.R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.141, n.2, 311-315, Sep., 1984.

OBARA, F. W. H.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T.; CORRADI DA SILVA, M., L. Purification of laccases PPO-I produced by *Botryosphaeria rhodina*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 303-310, 2005

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIS, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugar. **Journal of Biological Chemistry**, v.217, n.2, p.959-966, 1955.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.317-338, 1993.

SEGREST, J.P.; JACKSON, R.L. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. **Methods in Enzymology**, v.28, p.54-63, 1972.

SILVA, M.V.; SANTI, L.; STAATS, C.C.; COSTA, A.M.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exo chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v.156, p.382-392, 2005.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, p.61-68, Sep. 1945.

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**, v.47, p.167-177, 1986.

St.LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.415-426, 1991.

St.LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D.W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.3, p.907-912, Mar. 1996.

St.LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.81-84, 1993.

STÜRMER, A. T.; ITO, E. T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T. Stability of proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **UNOPAR - Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 5/6, n. 1, p. 85-88, out. 2003/2004.

URTZ, B. E.; RICE, W. C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v.104, n.2, p.180-186, Feb. 2000.

ANEXO B

Artigo 2: “Indução de isoformas de quitinases do fungo *Beauveria bassiana* em cultivos enriquecidos com substratos derivados de insetos praga”.

Indução de isoformas de quitinases do fungo *Beauveria bassiana* em cultivos enriquecidos com substratos derivados de insetos-praga

SASSÁ, Danieli Cristina¹; VARÉA-PEREIRA, Geni³; WU, Jo Í²; SUGAHARA, Vanessa Hitomi²; MIYAGUI, Dalva Tomoe³.

¹Mestrado em Biotecnologia, ²Acadêmica do Curso de Farmácia, ³Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário, CEP 86051-990 Londrina – PR, Brasil, telefone (43) 33714270 www.uel.br/cce/bioquimica, gpvarea@uel.br

RESUMO

Um dos fatores que contribuem para o uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos-praga é sua capacidade de infectar vários insetos sem a necessidade de serem ingeridos, uma vez que a infecção ocorre via tegumentar. As quitinases extracelulares são importantes para a instalação da infecção e podem estar envolvidas no nível de virulência das diferentes cepas e espécies destes fungos. A produção das quitinases extracelulares pode ser influenciada por variações da composição do exoesqueleto dos insetos hospedeiros. A atividade e estabilidade térmica de quitinases produzidas pelo fungo *Beauveria bassiana* CG432 foram estudadas por meio do cultivo a 28°C, 150 rpm em meios de cultivo líquido contendo somente 1% de glicose como fonte de carbono ou glicose adicionado de 1% de exúvias trituradas de larvas de *Tenebrio molitor* ou adultos mortos triturados de *Zabrotes subfasciatus* como substratos indutores. Houve maior produção de quitinases ativas em pH ácido que alcalino em todos os cultivos testados. A atividade de quitinases ácidas foi maior nos cultivos induzidos sendo crescente do quarto até o 9º dia experimental. No cultivo contendo somente glicose, a produção máxima das quitinases ativas em pH ácido e alcalino ocorreu no quinto dia. Nestas condições houve gradativa redução da produção de ambas quitinases até o nono dia de cultivo. As quitinases ativas em pH ácido e alcalino produzidas nas três condições de cultivo foram estáveis por mais de 72 horas a 30 e 40°C e por até 48 horas a 50°C. A maior produção de quitinases em meios contendo substratos derivados de insetos e a alta estabilidade destas enzimas aumenta o interesse por estas moléculas em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, quitinases, indução, estabilidade.

ABSTRACT

One of the factors that contribute for the use of entomopathogenic fungi in the biological control of plague insects are its capacity to infect insects without the necessity to be ingested, because the infection occurs by tegument. Extracellular chitinases are important for infection installation and can be involved in the different virulence level of strains and fungi species. Production of extracellular chitinases can be influenced by variations of the composition of insects hosts exoskeleton. Chitinases activity and thermal stability produced by *Beauveria bassiana* CG432 was studied through the culture in liquid medium at 28°C at 150rpm containing 1% glucose as carbon source or glucose added of 1% triturated exuviae *Tenebrio molitor* larvae or triturated dead adults *Zabrotes subfasciatus* as inductive substrate. It had greater production of chitinases active in acid pH that alkaline in all the cultures tested. Chitinases activity in acid pH was higher in the induced cultures and increased from forth until ninth experimental day. In the culture containing only glucose, the maximum production of chitinases active in acid and alkaline pH occurred in the fifth day. In these conditions chitinases had gradual reduction of the production of both until the ninth day of culture. Chitinases active in acid and alkaline pH produced in the three culture conditions was stable for more than 72 hours at 30 and 40°C and up to 48 hours at 50°C. The highest production of chitinases in media containing substrate derived from insects and the high stability of these enzymes increases the interest of these molecules in biotechnological processes.

Key-words: *Beauveria bassiana*, chitinases, induction, stability.

1 INTRODUÇÃO

Mais de 700 espécies de fungos já foram identificadas como causadoras de doenças em insetos na natureza, porém somente alguns membros de hifomicetos, como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, têm sido utilizados comercialmente no controle biológico de insetos praga, exemplo no Brasil é a marca “Itaforte”, e nos EUA. as marcas “Mycotrol” e “BotaniGard”(SHAH; PELL, 2003). Estudos sobre a fisiologia do crescimento, atividade metabólica e bases genéticas da virulência visam esclarecer os mecanismos responsáveis pela penetração da forma infectante do fungo através do exoesqueleto protetor de insetos hospedeiros (KHACHATOURIANS, 1996). A patogenicidade e o grau de virulência dos fungos entomopatogênicos podem estar associados à produção e à ação sinérgica de proteases, lipases e quitinases extracelulares que hidrolisam os complexos poliméricos formadores da cutícula dos insetos (ST.LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986), organizada como uma fina camada mais externa denominada epicutícula constituída por lipídeos e proteínas, e uma grossa camada mais interna denominada procutícula formada principalmente por quitina e proteínas (CHAPMAN, 1998).

Múltiplas isoformas de quitinases (carboidrolases) induzidas durante o crescimento de fungos entomopatogênicos hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 entre os resíduos de *N*-acetil-D-glucosamina da quitina e entre D-glucosamina (80%) e *N*-acetil-D-glucosamina (20%) da quitosana (THARANATHAN; KITTUR, 2003), e podem agir como endoquitinases e exoquitinases (SAHAI; MANOCHA, 1993). A ação conjunta destas quitinases resulta no acesso ao substrato insolúvel necessário ao desenvolvimento e adaptação do fungo a novas condições ambientais, e ao rompimento da integridade dos hospedeiros para obtenção de nutrientes e instalação do micoparasitismo (NAHAR; GHORMADE; DESHPANDE, 2004). As endoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam ligações internas da molécula

de quitina de modo aleatório, formando oligômeros solúveis de *N*-acetil-D-glucosamina de baixo peso molecular, como o dímero di-acetilquitobiose, quitotriose e quititetrose. As exoquitinases se dividem em duas subcategorias, as quitibiosidases (EC 3.2.1.29) que catalisam a liberação progressiva de di-acetilquitobiose, iniciando pela extremidade não redutora das microfibrilas de quitina, e as β -1,4-*N*-acetilglucosamidases (EC 3.2.1.30) que clivam os produtos oligoméricos das endoquitinases e quitobiosidases gerando monômeros de *N*-acetil-D-glucosamina (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

Havukkala *et al.* (1993) adicionaram 1% de quitina coloidal como única fonte de carbono em meios de cultivo de *B. bassiana* e verificaram a indução de quitinases, que foram separadas por cromatografia em um pico protéico de 45kDa com atividade de endoquitinase, pois degradou o substrato quitina-glicol (quitina solúvel modificada), e outro pico protéico com atividade bifuncional de endo e exoquitinase, pois hidrolisou ambos os substratos quitina-glicol e *p*-nitrofenol- β -D-*N*-acetil-D-glucosamina, respectivamente. Cultivos de *M. anisopliae* enriquecidos com o mesmo substrato indutor produziram uma quitinase de 60kDa com elevada atividade sobre quitina cristalina e coloidal, *p*-nitrofenol- β -D-*N*-acetil-D-glucosamina e seus oligômeros *p*-nitrofenol- β -D-*N*-quitobiose e *p*-nitrofenol- β -D-*N*-quitotriose, caracterizando-a também como uma isoforma com atividade de endo e exoquitinase (KANG; PARK; LEE, 1999).

Cultivos enriquecidos com cutícula de barata induziram a produção de uma variedade de quitinases com atividade de endoquitinases e exoquitinases (*N*-acetil- β -D-glucosaminases) pelos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, além da produção da exoquitinase β -1,4-quitobioses por *M. flavoridae* (St LEGER, *et al.*, 1996).

Segundo St.Leger, Staples e Roberts (1993), pelo menos 20 isoformas de quitinases de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Aspergillus flavus* são reguladas similarmente pelos produtos de degradação da quitina adicionada ao meio de cultivo, entretanto, os mecanismos

de indução-repressão de quitinases apresenta resultados controversos. Enquanto a análise da expressão do gene CHIT30, que codifica uma quitinase bifuncional de 30kDa de *M. anisopliae*, demonstrou a indução por 1% de quitina e 0,25% de *N*-acetilglucosamina, e repressão por 1% de *N*-acetilglucosamina e glucose (SILVA *et al.*, 2005), cultivos submersos do fungo *B. bassiana* previamente ativados em insetos vivos de broca do café, apresentaram elevada atividade de quitinases em valores de pH tanto ácidos como alcalinos no quinto dia de cultivo líquido contendo 1% de glucose (SASSÁ *et al.*, 2006).

Considerando a importância da composição da cutícula do hospedeiro sobre a indução e ação de quitinases como determinantes do curso da infecção causada por fungos entomopatogênicos (GUPTA *et al.*, 1992), o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da adição de substratos quitinosos derivados de insetos sobre o tempo de liberação, atividade e estabilidade térmica de quitinases extracelulares produzidas pelo fungo *B. bassiana* previamente ativado em adultos vivos de broca do café (*Hypothenemus hampei*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e condições de cultivo

A cepa de *B. bassiana* CG432, estocada a -20°C no Banco de Patógenos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, foi inicialmente repicada e ativada em adultos vivos de broca-do-café (*H. hampei*) conforme descrito por Neves e Hirose (2005).

Foram realizados três cultivos submersos a 28°C e 150rpm, acrescentando 1% de inóculo (10^8 conídios ativados/mL) em frascos erlemeyer de 125mL contendo 50mL de meio. Para o cultivo padrão utilizou-se meio líquido aquoso contendo 1% de glucose anidra,

0,5% de extrato de levedura, 0,158% de NaNO₃, 0,105 % de Na₂HPO₄.7H₂O, 0,1% de KCl; 0,06 % de MgSO₄.7H₂O e 0,036% de KH₂PO₄, conforme descrito por ITO *et al.* (2006). Para os cultivos teste utilizou-se a mesma composição do meio padrão, porém adicionados de 1% (m/v) dos substratos indutores triturados: exúvias de larvas de *Tenebrio molitor* (teste 1) e adultos mortos inteiros de *Zabrotes subfasciatus* (teste 2). Todos os cultivos foram realizados em duplicata e paralelamente a um controle sem adição de inóculo.

Os cultivos foram interrompidos diariamente até o nono dia através de filtração da biomassa em papel de filtro Whatman No.1, previamente pesado, para quantificação da biomassa (Gravimetria em estufa bacteriológica a 70°C). Os filtrados foram dialisados contra tampão acetato 5mM pH 5 a 4°C durante 24 horas, denominados extrato livre de células (ELC) e ensaiados quanto à atividade de quitinases.

2.2 Determinação da atividade de quitinases

A atividade de quitinases foi determinada por adaptações da técnica de Nahar, Ghormade e Deshpande (2004) utilizando o substrato quitina coloidal preparado conforme Kang, Park e Lee (1999), e padronizada a 90% de umidade. Alíquotas de 0,5mL do ELC foram incubadas a 45°C com 1mL de quitina coloidal preparada a 1% em tampão acetato 50mM pH 5,5, fosfato 50mM pH 6,0 e glicina-NaOH pH 8,5. Após 1 hora, a reação enzimática foi interrompida em banho-maria fervente por 1 (um) minuto. A quitina residual foi separada por centrifugação a 1000xg por 15 minutos e o sobrenadante usado para a determinação de *N*-acetilglucosamina produzidos pela ação enzimática empregando o método descrito por Reissig *et al.* (1955). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como microgramas de *N*-acetilglicosamina liberados por mL de ELC nas condições da reação.

2.3 Determinação do efeito do pH

Para a determinação do efeito do pH sobre a atividade de quitinases foram utilizados os ELC do 5º dia dos três cultivos realizados e do 9º dia dos cultivos teste 1 e 2. As reações foram realizadas a 45°C durante 1 hora utilizando soluções tampões 50mM, acetato pH 4,0 a 6,0, fosfato pH 6,0 a 8,0, e glicina-NaOH pH 8,0 a 10,0, com intervalos de 0,5 unidades de pH.

2.4 Determinação do efeito da temperatura

Para a determinação do efeito da temperatura sobre a atividade de quitinases foram utilizados os ELC do 5º e 9º dia dos cultivos testes 1 e 2. As reações foram realizadas em tampão acetato 50mM pH 5,5, fosfato 50mM pH 6,0 e glicina-NaOH 50mM pH 8,0 para os cultivos teste e incubadas durante 1 hora em temperaturas entre 30 e 60°C com intervalos de 5°C.

2.5 Análise da estabilidade térmica das quitinases

Para analisar a estabilidade térmica das quitinases extracelulares produzidas por *B. bassiana*, ELC do quinto dia de cultivo das três condições realizadas foram mantidos a 30, 40 e 50°C e incubados periodicamente com o substrato quitina coloidal para a determinação da atividade enzimática conforme descrito anteriormente em pH 5,5 e 6,0 para todos as amostras, e pH 8,5 para o cultivo padrão, e pH 8,0 para os cultivos teste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tempo de produção de quitinases e crescimento fúngico

A Figura 1 mostra que a partir da produção máxima de biomassa, durante a fase estacionária ou de declínio de crescimento do microrganismo, ocorreu aumento do pH do meio de cultivo de cerca de 4 (terceiro dia) até aproximadamente 8 no último dia experimental. Nestas condições, o fungo *B. bassiana* CG432, produziu quitinases com maior atividade em tampão acetato pH 5,5 e fosfato pH 6,0 que em tampão glicina-NaOH pH 8,5, do quarto ao último dia experimental, tanto no cultivo padrão contendo 1% de glucose (Figura 1A) quanto nos cultivos testes adicionados de substratos indutores derivados de insetos (Figura 1B e 1C). A indução de quitinases em meios de cultivo contendo glucose e substratos indutores pode ser uma característica de alguns fungos, pois, assim como verificado neste trabalho, Shubakov e Kucheryavykh (2004) observaram que dentre nove fungos filamentosos que produziram quitinases ativas em tampão acetato 50 mM pH 5,0 cultivados inicialmente em meio contendo 1% de quitina, somente as espécies *B. bassiana* e *Sporotrichum olivaceum* apresentaram aumento de 58% da atividade de quitinases (de 2,4 para 3,8U/mg de proteínas) durante a fase estacionária em meio de cultivo contendo 1% de quitina e 1% de glucose. Segundo os autores, a glucose representou uma fonte de energia de fácil utilização, e a quitina atuou como indutor da síntese enzimática.

A adição de substratos derivados de insetos elevou a produção de quitinases ativas em pH ácido entre 30 e 45%, no sétimo dia de ambos os cultivos teste (Figuras 1B e 1C) se comparado com os resultados obtidos no cultivo padrão (Figura 1A). Cultivos dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* pré-inoculados em meio de Sabouraud durante 48 horas e transferidos para meio de cultivo suplementado com quitina coloidal produziram isoformas de quitinases predominantemente ativas em pH ácido no mesmo tempo de cultivo obtido neste

trabalho, ou seja, a partir de 4 dias (St LEGER *et al.*, 1996) com atividade máxima em 168 horas (ou 7 dias) de crescimento (FANG *et al.*, 2005).

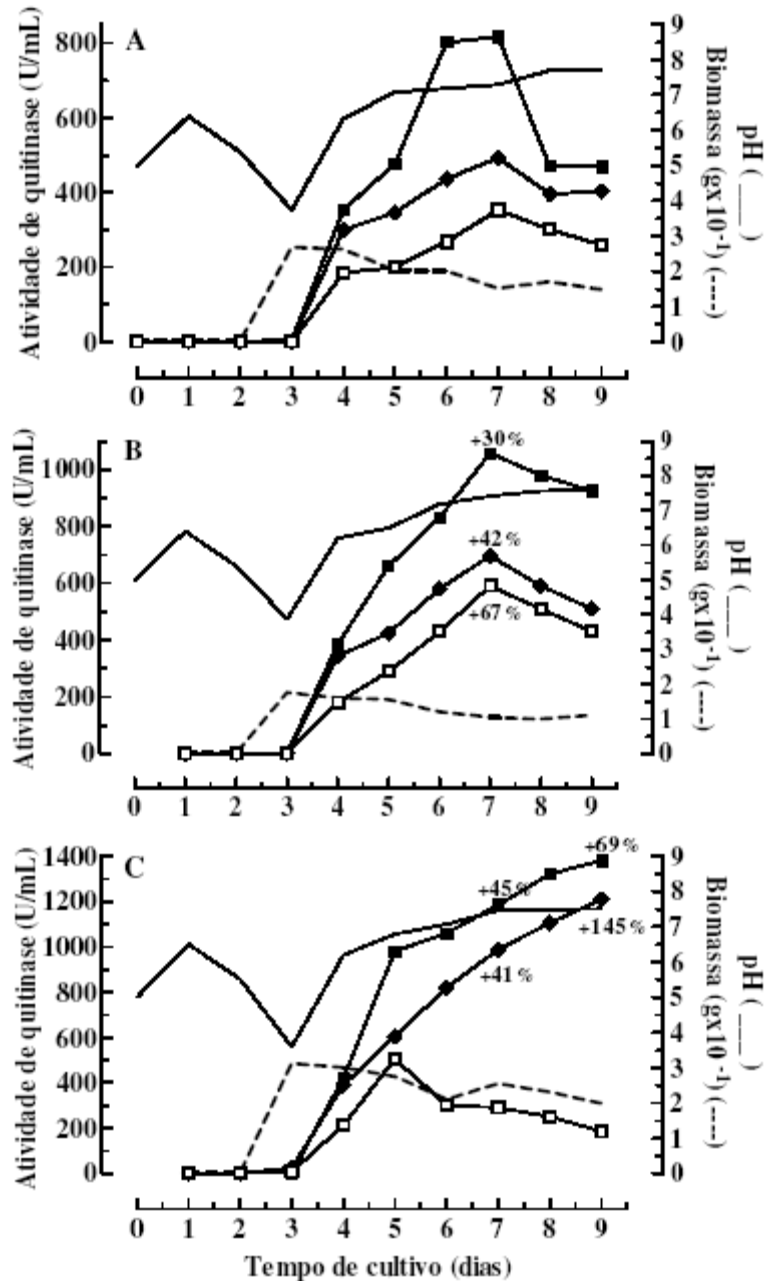


Figura 1: Influência do tempo na produção de quitinases extracelulares de *B. bassiana* CG432 em tampões 50mM acetato pH 5,5 (□), fosfato pH 6,0 (□) e glicina-NaOH pH 8,5 (□), variação de pH e produção de biomassa durante cultivo submerso a 28°C e 150rpm em meio líquido padrão contendo 1% de glucose (A); e meios líquidos contendo 1% de glucose adicionado de exúvias trituradas de larvas de *T. molitor* 1% (B) e adultos mortos triturados de *Z. subfasciatus* 1% (C). As induções nas figuras 1B e 1C foram calculadas em relação ao cultivo padrão

A indução das quitinases ativas em pH 5,5 e 6,0 ocorreu no sétimo dia do cultivo contendo exúvias de *T. molitor*. No cultivo adicionado de insetos inteiros de *Z. subfasciatus*, a indução das quitinases ativas em pHs ácidos foi maior no quinto dia e superior às demais condições, sendo crescente até o último dia experimental (Figura 1C). Além disso, observou-se que a adição de insetos inteiros não induziu quitinases ativas em pH 8,5, como ocorreu no sétimo dia do cultivo contendo cutícula de *T. molitor* (Figura 1B). Tais resultados podem estar relacionados com a maior complexidade de moléculas constituintes do inseto inteiro adicionado ao meio de cultivo, quando comparada com o outro substrato indutor (exúvias de *T. molitor*). Fungos patógenos facultativos, com baixa especificidade de ação sobre hospedeiros e com pequena exigência nutricional, como *B. bassiana*, podem aumentar a produção de enzimas e outros fatores de virulência na presença de substratos indutores (KHACHATOURIANS, 1996). A análise da expressão de enzimas quitinolíticas durante o crescimento de *B. bassiana* em meio contendo 0,5% de cutícula de dois insetos, traça da cera de abelha, *Galleria mellonella*, ou lagarta-mede-palmo, *Trichoplusia ni*, mostrou que diferentes cepas de *B. bassiana* produziram várias enzimas com diferentes níveis de atividade que possivelmente estariam envolvidas com a virulência, o que também sugere que a produção enzimática pode estar relacionada com o hospedeiro (GUPTA *et al.*, 1992).

3.2 Efeito do pH sobre atividade de quitinases

A análise dos extratos obtidos no quinto dia de cultivo padrão demonstrou produção de quitinases com atividade ótima em pH ácido 5,5 e alcalino 8,5 (Figura 2A). Por outro lado, os extratos obtidos no quinto e nono dias dos cultivos teste adicionados de substratos derivados de insetos, demonstraram produção de quitinases predominantemente ativas em valores de pH entre 5,0 e 6,0 (Figura 2B e C), 40% de quitinases ativas em pH 8,0 e somente 20% e 10% de quitinases ativas em pH 8,5. Os resultados mostram que tanto a

adição de substratos indutores como o tempo de cultivo favoreceram a produção de quitinases com maior atividade em valores de pH mais ampliados e mais ácidos.

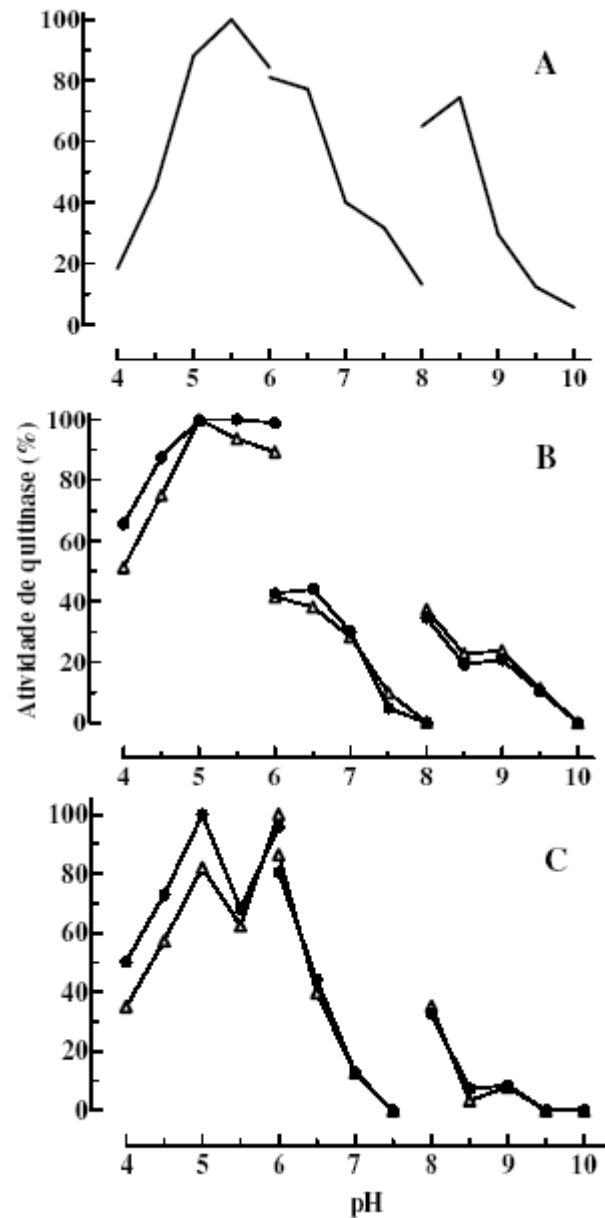


Figura 2. Efeito do pH sobre a atividade de quitinases extracelulares de *B. bassiana* CG432 obtidas do cultivo submerso a 28°C e 150rpm. A) Extrato obtido no quinto dia de cultivo líquido padrão contendo 1% de glucose. B) Extrato obtido no quinto dia em meios de cultivo líquidos teste adicionados de 1% de adultos mortos triturados de *Z. subfasciatus* (◻) e exúvias trituradas de *T. molitor* (Δ). C) Extrato obtido no nono dia em meios de cultivo líquidos teste. Análises realizadas a 45°C em tampões 50mM acetato pH 4 a 6, fosfato pH 6 a 7,5 e glicina-NaOH pH 8,0 a 10,0.

A produção de quitinases ativas em pH 8,5 no quinto dia de cultivo obtido neste trabalho, coincide com o tempo de liberação de proteases, também alcalinas (pH ótimo 9,5) produzidas por *B. bassiana* cultivada em meio líquido (STÜRMER *et al.*, 2004) e em meios contendo gelatina como substrato indutor (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1987). A liberação de proteases e quitinases em tempos de cultivo semelhantes reforçam a hipótese de ação concomitante e sinérgica destes fatores enzimáticos de virulência sobre a cutícula dos insetos, uma vez que podem liberar polímeros parcialmente degradados capazes de induzir a produção de múltiplas quitinases (ST.LEGER *et al.*, 1996). Além disso, a ação inicial das proteases pode tornar as fibrilas de quitina mais acessíveis à hidrólise por quitinases ativas em pH ácido em estágios mais tardios do crescimento do fungo. Dentre outras evidências da ação concomitante de proteases e quitinases há relatos na literatura da liberação 3,5 vezes superior de aminoaçúcares por quitinases sobre cutícula de gafanhoto pré-tratada com proteases (ST.LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986), e a demonstração de maiores níveis de quitinases acumuladas em regiões de degradação proteolítica durante o período de invasão da cutícula do inseto hospedeiro pelos fungos *M. anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *B. bassiana* através de anticorpos anti-quitinases marcados e imagens ultraestruturais (ST.LEGER *et al.*, 1996).

3.3 Efeito da temperatura sobre atividade de quitinases

As quitinases produzidas por *B. bassiana* no 5º dia dos cultivos teste apresentaram atividade ótima a 45°C tanto em pH ácido quanto em pH alcalino, similarmente às quitinases produzidas no 5º dia de cultivo sem indução (SASSA *et al.*, 2006), e um perfil de temperatura ótima mais amplo, podendo manter pelo menos 60% da sua atividade entre 40 e 50°C (Figura 3A e B). No 9º dia dos cultivos induzidos as quitinases ativas em pH ácido também apresentaram atividade ótima a 45°C, enquanto as quitinases ativas em pH alcalino demonstraram maior atividade a 50°C. Entretanto, todas as quitinases produzidas no 9º dia de cultivo mostraram-se mais sensíveis ao aumento da temperatura, perdendo mais de 50% de atividade quando a temperatura foi elevada em 5°C (Figura 3C, D).

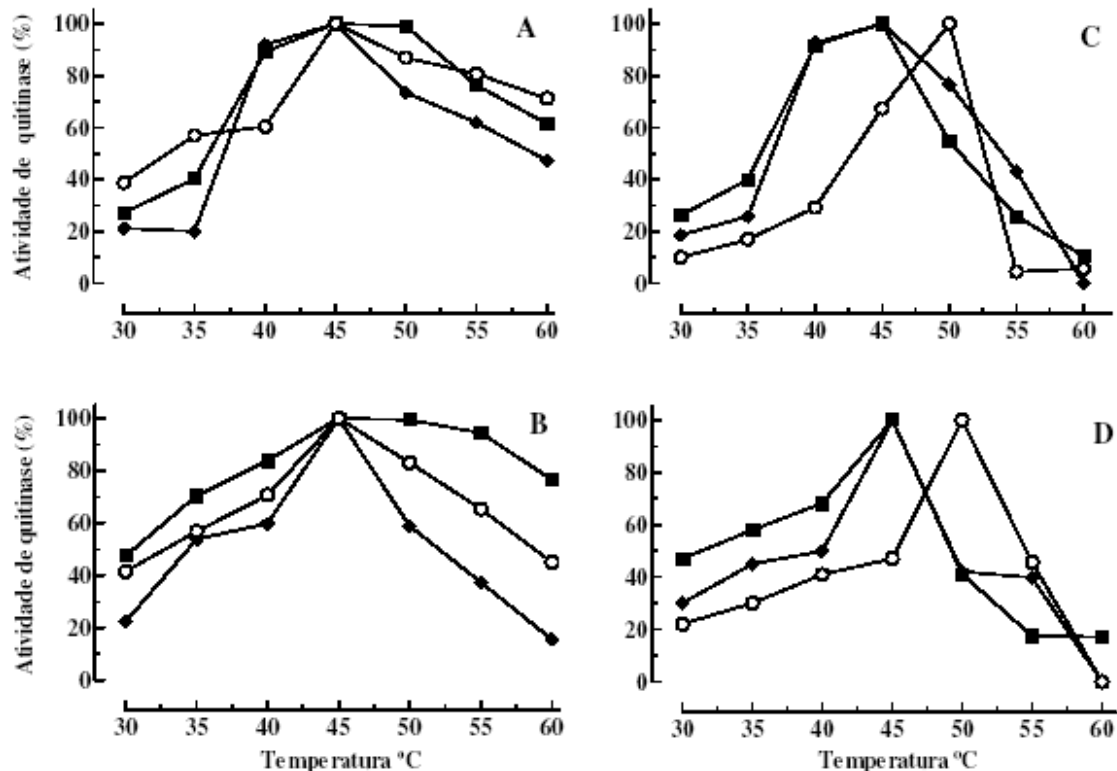


Figura 3: Efeito da temperatura sobre a atividade de quitinases extracelulares de *B. bassiana* CG432 obtidas do 5º dia (A, B) e 9º dia (C, D) de cultivo a 28°C e 150rpm. A e C) Extratos dos meios de cultivo testes contendo 1% de glucose adicionados de 1% de exúvias trituradas de larvas de *T. molitor*; B e D) Extratos dos meios de cultivo testes contendo 1% de adultos mortos triturados de *Z. subfasciatus*. Análises realizadas em tampões acetato 50mM (■) pH 5,5, fosfato 50mM (□) pH 6,0 e glicina-NaOH 50mM (○) pH 8,0.

A degradação enzimática dos substratos, incluindo a quitina, ocorrida ao longo do cultivo pode interferir no perfil cinético das quitinases, pois geram oligômeros que atuam como indutores para a síntese de outras quitinases (St.LEGER; STAPLES; ROBERTS, 1993). Outros polímeros como exopolissacarídeos formados durante o crescimento do microrganismo (SASSÁ *et al.*, 2006), podem interagir com as quitinases que são glicoproteínas com atividade ótima em pH próximo de 5,0 e as temperaturas que variam de 38 a 50°C (SAHAI; MANOCHA, 1993).

3.4 Estabilidade térmica de quitinases extracelulares

As quitinases produzidas por *B. bassiana* quando cultivadas em meio contendo somente glucose ou adicionada de substratos indutores derivados de insetos demonstraram elevada estabilidade térmica. As quitinases ativas em pH ácido produzidas no meio de cultivo padrão permaneceram com pelo menos 50% da atividade inicial até 72 horas quando mantidas em banho-maria a 30 e 40°C (Figura 4A). Resultados semelhantes foram observados com as quitinases produzidas no meio enriquecido com *Z. subfasciatus*, quando mantidas a 30°C, pois manteve cerca de 50% da atividade até 72 (Figura 4C). As quitinases ácidas liberadas no meio contendo *T. molitor* foram as que se mostraram mais estáveis a 30°C mantendo 50% da atividade até 96 horas (Figura 4B). A 40°C as enzimas produzidas em ambos meios enriquecidos perderam 50% da atividade em 48 horas (Figura 4B e C).

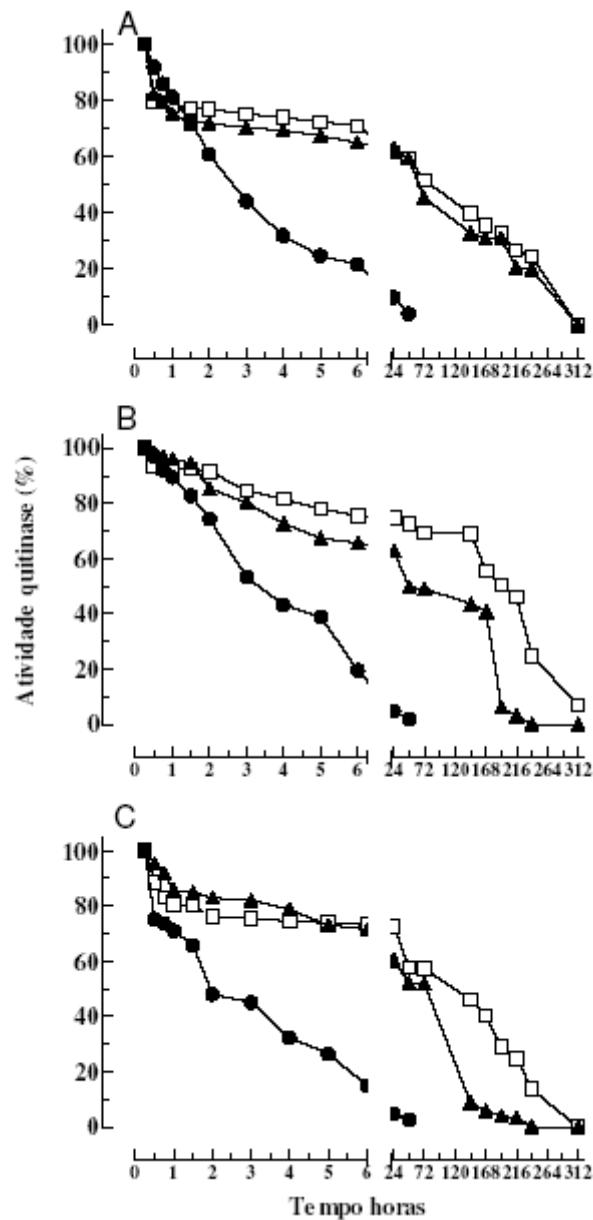


Figura 4: Estabilidade térmica em temperaturas de 30°C (□), 40°C (◻) e 50°C (◼) de quitinases extracelulares ácidas de *B. bassiana* CG432 obtidas do 5º dia de cultivo submerso a 28°C e 150rpm. A) Extrato do meio de cultivo padrão contendo 1% de glicose; B e C) Extratos dos meios de cultivos teste contendo 1% de glicose adicionado de 1% de exúvias trituradas das larvas de *T. molitor* (B) e 1% de adultos mortos de *Z. subfasciatus* (C). Análises realizadas a 45°C em tampão acetato 50mM pH 5,5 para o cultivo padrão e pH 5,0 para os cultivos teste.

As quitinases ativas em pH alcalino demonstraram menor estabilidade que as ativas em pH ácido, visto que perderam aproximadamente 50% de atividade após 72 horas a 30°C nas três condições de cultivo (Figura 5). A 40°C, as quitinases ativas em pH alcalino produzidas no meio contendo somente glicose apresentaram 43% de atividade após 48 horas,

enquanto as quitinases produzidas em meios contendo substratos indutores mantiveram mais de 50% de atividade após 72 horas, porém, nas três condições toda a atividade foi perdida em 168 horas. Por outro lado, quando mantidas a 50°C a estabilidade das quitinases foi consideravelmente menor, mantendo 50% da atividade inicial de quitinases ativas em pH ácido por no máximo 3 horas, e as quitinases ativas em pH alcalino perderam mais de 90% da atividade em 24 horas (Figura 4 e 5).

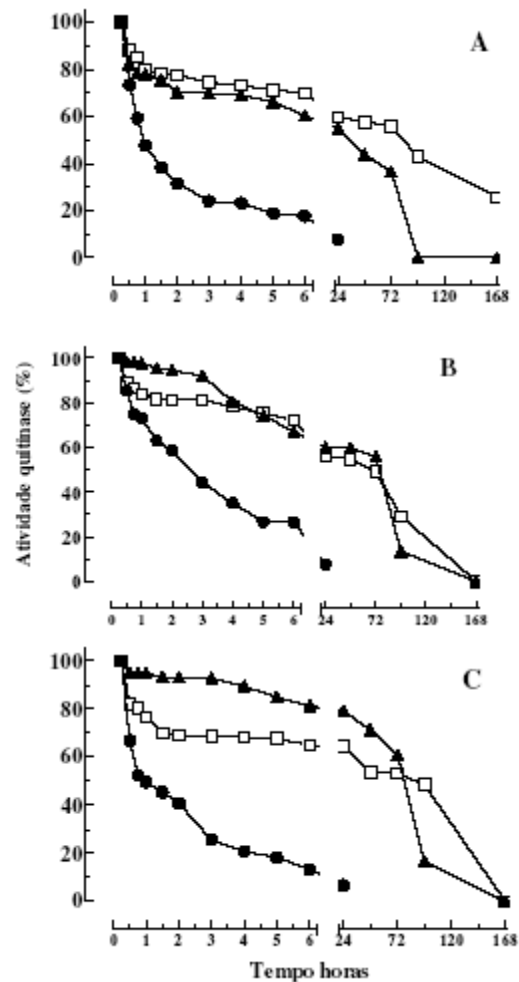


Figura 5: Estabilidade térmica a 30°C (□), 40°C (◻) e 50°C (◼) de quitinases extracelulares alcalinas de *B. bassiana* CG432 obtidas do 5º dia de cultivo submerso a 28°C e 150rpm. A) Extrato do meio de cultivo padrão contendo 1% de glucose; B e C) Extratos de meios de cultivos teste contendo 1% de glucose adicionados de 1% de exúvias trituradas de larvas de *T. molitor* (B) e 1% de adultos mortos triturados de *Z. subfasciatus* (C). Análises realizadas a 45°C em tampão glicina-NaOH 50mM pH 8,5 para o cultivo padrão e pH 8,0 para os cultivos teste.

Os resultados obtidos demonstraram que as quitinases produzidas por *B. bassiana* nas condições de cultivo utilizadas neste trabalho apresentaram estabilidade muito superior a outras quitinases relatadas na literatura. Quitinases produzidas por *Trichoderma harzianum* em meios contendo quitina coloidal mostraram que o extrato bruto, ativo em pH 4,0 a 6,0, manteve cerca de 48% da atividade depois de 40 minutos de incubação a 40°C (SANDHYA *et al.*, 2005). Uma endoquitinase purificada de *Streptomyces* demonstrou ser estável durante pelo menos uma hora em temperaturas de 30 a 70°C e na faixa de pH entre 4,0 e 9,0 (GOMES *et al.*, 2001). A análise da estabilidade térmica de uma endoquitinase de *Colletotrichum gloeosporioides* demonstrou que a enzima permaneceu estável por pelo menos trinta minutos em temperaturas entre 30 e 50°C, perdendo toda a atividade em 60°C (SOUZA *et al.*, 2003).

4 CONCLUSÕES

A cepa CG432 de *B. bassiana* produziu quitinases durante a fase estacionária do crescimento microbiano. Os meios de cultivo contendo glucose e enriquecidos com substratos quitinosos derivados de insetos praga induziram pelo menos 50% da atividade e aumentaram o tempo de produção das quitinases, especialmente daquelas quitinases ativas em pH ácido. As quitinases apresentaram atividade ótima a 45°C e em valores de pH ácidos 5,5 e 6,0 e alcalino 8,5 em todas as condições de cultivo testadas. Além disso, apresentaram, caracteristicamente, estabilidade térmica superior a outras quitinases fúngicas.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: a Fundação Araucária e CNPq pela concessão de Bolsa de Mestrado e recursos para realização da pesquisa; o Professor Dr Pedro M. O. J. Neves pelo fornecimento da cepa CG432 de *B. bassiana*; os alunos de graduação Evelyn Kamogawa e Carla Hisatsugo, e ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIDOCHKA, M.J.; KACHATOURIANS, G. G. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.7, p.1679-1684, July. 1987.
- CHAPMAN, R. J. Integument. In:_____. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge University Press, 1998. p.415-440.
- COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.270-277, 1998.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y. ; FENG, J. ; YANG, X. ; ZHANG, Y. ; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. **Applied end Environmental Microbiology**, v.71, n.1, p.363-370, Jan. 2005.
- GOMES, R. C.; SEMEDO, L. T. A. S.; SOARES, R. M A.; LINHARES, L. F.; ULHOA, C. J.; ALVIANO,C. S.; COELHO, R. R. R. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.653-661, 2001.
- GUPTA, S. C.; LEATHERS, T. D.; EL-SAYED, G. N.; IGNOFFO, C. M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v.16, p.132-137, 1992.
- HAVUKKALA, I.; MITAMURA, C.; HARA, S.; HIRAYAE,K.; NISHIZAWA, Y.; HIBI, T. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.97-102, 1993.

ITO, E. T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T.; PINOTTI, M. H. P.; NEVES, P. M. O. J. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Journal of Biology and Biotechnology**. no prelo.

KANG, S C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.276-281, 1999.

KHACHATOURIANS, G. G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In _____: **The Mycota VI: human and animal relationships**. Howard/Miller (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.80-88, 2004.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.77-82, 2005.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIS, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugar. **Journal of Biological Chemistry**, v.217, n.2, p.959-966, 1955.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.317-338, 1993.

SANDHYA, C.; BINOD, P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Microbial synthesis of chitinase in solid cultures and its potential as a biocontrol agent against phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Biochem. Biotechnology**, v.127, n.1, p.1-15, 2005.

SASSÁ, D. C.; VARÉA-PEREIRA, G.; WU, J. I.; SUGAHARA, V. H.; NEVES, P. M. O. J. MIYAGUI, D. T. Efeito das condições de reação sobre a atividade de quitinases ativas em pH ácido e alcalino produzidas por *Beauveria bassiana*. EM PREPARAÇÃO.

SHAH, P.A.; PELL, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Environmental Biotechnology**, v.61, p.413-423, 2003.

SHUBAKOV, A. A.; KUCHERYAVYKH, P. S. Chitinolytic activity of filamentous fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.5, p.445-447, 2004.

SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v.156, p.382-392, 2005.

SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; COELHO, R. R. R.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. Purification and characterization of an endochitinase produced *Colletotrichum gloeosporioides*. **FEMS Microbiology Letters**, v.222, p.45-50, 2003.

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**, v.47, p.167-177, 1986.

ST.LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.3, p.907-912, Mar. 1996.

ST.LEGER, R. J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D. W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.81-84, 1993

STÜRMER, A. T.; ITO, E. T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T. Stability of proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **UNOPAR - Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 5/6, n. 1, p. 85-88, out. 2003/2004.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.64-87, 2003.

ANEXO C

Artigo 3: “Análise do gene da quitinase de *Beauveria bassiana* relacionado com a mortalidade sobre a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, e a atividade enzimática”.

Análise do gene da quitinase de *Beauveria bassiana* relacionado com a mortalidade sobre a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, e a atividade enzimática

Danieli Cristina Sassá¹, Geni Varéa-Pereira², Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves³, José Eduardo Garcia²

¹Mestrado em Biotecnologia, ²Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, ³Departamento de Agronomia. Universidade Estadual de Londrina Campus Universitário, CEP 86051-990 Londrina – PR, Brasil, telefone (43) 33714270 www.uel.br/cce/bioquimica, gpvarea@uel.br

RESUMO

Assim como outros fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* produz enzimas que degradam a cutícula para penetração no hospedeiro no momento da infecção. Quitinases são consideradas enzimas importantes neste processo por hidrolisarem a quitina, um dos maiores componentes do exoesqueleto do inseto. Neste trabalho o polimorfismo no gene da quitinase de *B. bassiana* foi analisado por meio da técnica de PCR-RFLP e comparado com a atividade enzimática e mortalidade causada sobre indivíduos adultos da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Foram utilizadas 30 cepas de *B. bassiana* isoladas de diferentes espécies de insetos e origens geográficas. A atividade de quitinases não foi diretamente relacionada com a mortalidade das cepas, reforçando a hipótese de que a virulência seja multifatorial. A amplificação do gene da quitinase resultou em um produto de aproximadamente 1050pb para todas as cepas testadas e a análise do polimorfismo mostrou baixa variabilidade entre elas, uma vez que somente 5 cepas apresentaram polimorfismo. Por possuírem diferentes níveis de mortalidade e atividade enzimática, não foi possível correlacionar o polimorfismo com virulência e atividade quitinolítica, o que sugere que a virulência diferencial entre as cepas talvez não esteja ligada diretamente com a estrutura ou a expressão da quitinase e sim, a outros fatores enzimáticos ou toxigênicos dos fungos. Além disso, não foi possível correlacionar os polimorfismos observados com a origem e a região geográfica, uma vez que as cepas que apresentaram o mesmo padrão polimórfico foram isoladas de espécies e de regiões diferentes.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, quitinase, polimorfismo, PCR-RFLP, virulência

ABSTRACT

As well as other entomopathogenics, *Beauveria bassiana* produces enzymes that degrade cuticle for penetration in the host at the moment of the infection. Chitinases are considered important enzymes for chitin hydrolysis, one of the greater insect exoskeleton components. In this study polymorphism in chitinase gene of *B. bassiana* was analyzed by PCR-RFLP and compared with the enzymatic activity and mortality caused on adults of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). Thirty *B. bassiana* strains isolated from different species of insects and geographic origins were used. The activity of chitinases was not directly related with the mortality caused by each strain, emphasizing the hypothesis that the virulence is multifactorial. The amplification of chitinase gene resulted in a product of 1050bp approximately, for all strains tested, and the analysis of the polymorphism showed low variability between them, as only five strains had presented polymorphism. Therefore possessing different mortality levels and enzymatic activity, it was impossible to correlate the polymorphism with virulence and chitinolytic activity. It suggests perhaps that the virulence difference between strains is not related directly with the structure or expression of chitinase but with other enzymatic or toxigenic factors. Moreover, it was not possible to correlate the polymorphism observed with the origin and geographic region, considering that strains presented the same polymorphic standard had been isolated of different species and regions.

Key-words: *Beauveria bassiana*, chitinase, polymorphism, PCR-RFLP, virulence.

1 INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana é um fungo Deuteromiceto pertencente à classe Hifomiceto de ocorrência cosmopolita (ALVES, 1998) que tem sido amplamente estudado devido ao seu amplo potencial entomopatogênico, já sendo empregado em algumas partes do mundo no manejo integrado de pragas para o controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (GAITAN *et al.*, 2002). A infecção no inseto ocorre principalmente por via tegumentar sendo o exoesqueleto a primeira barreira de proteção do hospedeiro (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). Como o exoesqueleto do inseto é composto principalmente por proteínas e quitina, as proteases e quitinases são consideradas as principais enzimas envolvidas na instalação da infecção (KANG; PARK; LEE, 1998; NAHAR; GHORMADE; DESHPANDE, 2004; ST.LEGER *et al.*, 1996). As proteases quebram as ligações peptídicas das moléculas protéicas, enquanto as quitinases (carboidrolases) hidrolisam as ligações glicosídicas β ,1-4 entre resíduos de *N*-acetilglucosamina da quitina (THARANATHAN; KITTUR, 2003).

Embora já tenha sido demonstrado que as proteases iniciem a degradação, permitindo que a quitinase penetre a cutícula (ST. LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986), há evidências *in vitro* de que proteases e quitinases atuam sinergicamente na solubilização da cutícula (ST.LEGER *et al.*, 1996). A protease, mesmo sendo um importante fator de virulência, não pode ser designada como um fator essencial para a patogenicidade visto que a não-expressão do gene da protease somente reduziu a capacidade de infecção (ST.LEGER; JOSHI, 1997).

A atividade das quitinases produzidas durante o processo infeccioso parece ser de extrema importância, uma vez que o exoesqueleto do inseto contém cerca de 20-50% do peso seco da sua estrutura como quitina (CHAPMAN, 1998). Já foi observado que *M.*

anisopliae, *B. bassiana* e *Aspergillus flavus* produzem um complexo quitinolítico quando cultivados em meios contendo quitina e que estas isoenzimas podem ser resultantes de alterações pós-traducionais, sendo que esta heterogeneidade poderia ter papel importante na capacidade dos fungos em se adaptarem a diferentes hospedeiros (ST.LEGER; STAPLES; ROBERTS, 1993). Além disso, os diferentes níveis de virulência encontrados para cada cepa podem estar relacionados com a variabilidade na produção destas enzimas, seja na quantidade ou qualidade da enzima produzida (ALVES, 1998; TANADA, 1993).

Como a quantidade das enzimas e toxinas produzidas por *B. bassiana* envolvidas na degradação da cutícula e desenvolvimento da doença pode depender do hospedeiro e do ambiente que habitam (GUPTA *et al.*, 1992), vários grupos de pesquisa têm se empenhado em encontrar alguma correlação entre cepas de fungos entomopatogênicos, região geográfica de origem e inseto hospedeiro por meio da detecção de polimorfismos genéticos (COATES; HELLMICH; LEWIS, 2002; GAITAN *et al.*, 2002; KOSIR, MACPHERSON E KHACHATOURIANS, 1991; LUZ *et al.*, 1998; MAURER *et al.*, 1997; MURO; MEHTA; MOORE, 2003; URIBE; KHACHATOURIANS, 2004; WANG *et al.*, 2003).

Até o momento, poucos estudos foram realizados sobre variabilidade de genes envolvidos com fatores de virulência de fungos entomopatogênicos, em um deles Wang *et al.* (2003) analisaram o polimorfismo do gene da protease pr1 de *B. bassiana* e observaram grande variabilidade neste gene utilizando a técnica de PCR-RFLP.

Considerando que a variabilidade em loci associados à virulência parece ocorrer com mais frequência que em outros loci como a região ITS (MURO; MEHTA; MOORE, 2003), o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de polimorfismo no gene da quitinase de *B. bassiana* por meio da técnica de PCR-RFLP e comparar com a atividade enzimática e a virulência em indivíduos adultos da broca-do-café (*H. hampei*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Foram utilizadas 30 cepas de *B. bassiana* (Quadro 1) proveniente do Banco de Patógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Pragas do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Isolados	Hospedeiro	Família	Origem
CB102	solo		SP-Brasil
CB66	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	SP-Brasil
CB97	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	Desconhecida
CG82	<i>Diabrotica speciosa</i>	Coleoptera: Crysomelidae	TU-Argentina
CG425	<i>Rhammatocerus schistocercoides</i>	Orthoptera: Acrididae	MT-Brasil
447-ESALQ	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	MT-Brasil
CG481	<i>Diabrotica speciosa</i>	Coleoptera: Crysomelidae	BA-Brasil
CG26	Não identificado	Coleoptera	DF-Brasil
CG432	Não identificado	Hemíptera: Membracidae	RN-Brasil
CG458	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Curculionidae	PR-Brasil
CG138	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	PE-Brasil
CG368	solo		PE-Brasil
CB64	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	RO-Brasil
UEL54	<i>Diabrotica sp.</i>	Coleoptera: Crysomelidae	PR-Brasil
UEL08	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
UEL04	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
CG375	<i>Colaspis sp.</i>	Coleoptera: Crysomelidae	DF-Brasil
CB95	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	MT-Brasil
UEL55	Não identificado	Hemíptera	PR-Brasil
UEL07	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
CB74	<i>Lyssorhoptus oryzophilus</i>	Coleoptera: Curculionidae	Japão
CB82	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	Desconhecida
CG166	Não identificado		PR-Brasil
CG71	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lepidóptera: Pyralidae	PE-Brasil
CG25	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lepidóptera: Noctuidae	DF-Brasil
CG245	Não identificado	Hymenoptera: Megachilidae	GO-Brasil
CB35	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	BA-Brasil
CB47	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Crysomelidae	SP-Brasil
UNI4	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Coleoptera: Tenebrionidae	PR -Brasil
CB17	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Curculionidae	SP -Brasil

Quadro 1: Hospedeiro e origem das cepas de *Beauveria bassiana* utilizadas para a verificação da atividade enzimática e polimorfismo no gene da quitinase.

2.2 Cultivo do microrganismo

As cepas de *B. bassiana* utilizadas foram previamente testadas quanto à virulência contra a broca-do-café (*H. hampei*) (HIROSE, 2000). As cepas foram ativadas em insetos vivos da broca-do-café conforme descrito por Neves e Hirose (2005) e posteriormente inoculadas em meio de cultivo líquido (glucose anidra 1%, extrato de levedura 0,5%, NaNO₃ 0,158%, Na₂HPO₄.7H₂O 0,105 %, KCl 0,1%; MgSO₄.7H₂O 0,06% e KH₂PO₄ 0,036%) conforme descrito por ITO *et al.* (2006). Após 5 dias de crescimento, os cultivos foram interrompidos por filtração em papel filtro sob pressão negativa. O filtrado, denominado extrato livre de células (ELC), foi submetido à diálise em tubos de 12kDa de exclusão contra tampão acetato 5mM pH 5,0 a 4°C durante 24 horas.

2.3 Determinação da atividade de quitinase

Para a determinação da atividade de quitinases o substrato, quitina coloidal, foi preparado a partir de quitina em flocos (Practical Grade, Sigma) conforme descrito por Kang, Park e Lee (1999). A atividade de quitinase foi determinada por adaptações da técnica de Nahar, Ghormade e Deshpande (2004). Para a reação, 1mL de quitina coloidal 1% preparada em tampão acetato 50mM pH 5,5, e 0,5mL do ELC dialisado foram incubados a 45°C durante 1 hora. Reações branco e controle foram realizados. A reação foi interrompida a 100°C por 1 minuto. A quitina residual foi separada por centrifugação a 1000xg por 15 minutos e o sobrenadante usado para a determinação de *N*-acetilglucosamina produzidos pela ação enzimática empregando o método descrito por Reissig *et al.* (1955). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como microgramas de *N*-acetilglucosamina liberados por mL de ELC nas condições da reação.

2.4 Extração do DNA

Os ácidos nucleicos foram extraídos segundo Bogo *et al.* (1996), com modificações. O micélio obtido pela filtração do meio de cultivo foi reduzido a pó em gral na presença de nitrogênio líquido. O pó obtido foi distribuído em tubos de microcentrífuga de 2mL, adicionados 800µL de tampão de extração (TRIS-HCl 200mM pH 8,0; EDTA 25mM pH 8,0; SDS 1% p/v; NaCl 250mM), homogeneizado e incubado a 65°C durante 1 hora.

À mistura de extração foram adicionados 800µL de fenol, seguida de centrifugação a 15.000xg por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e adicionado volume equivalente de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico (25:24:1). A solução foi levemente agitada e submetida à centrifugação a 15000xg por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e tratada com volume igual de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação a 15.000xg por 15 minutos, 800µL da fase aquosa foi dividida em dois tubos. O DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de cloreto de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi mantida a -20°C por cerca de 1 hora e o DNA recuperado por centrifugação a 15.000xg por 5 minutos a temperatura ambiente, lavado com etanol 70% e seco. Após seco, o pellet foi ressuspensão em 60µL de água ultrapura.

A quantificação do DNA foi realizada por comparação da intensidade das bandas do DNA extraído com bandas de DNA de concentração conhecida em eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, visualizada em transiluminador sob luz ultravioleta.

A corrida eletroforética foi realizada com tampão Tris-borato pH 8,0 e EDTA. Após a quantificação, as amostras de DNA foram padronizadas, por diluição, em soluções contendo aproximadamente 5ng/µL e conservadas a -20°C.

2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene da quitinase

A seqüência do gene da quitinase (*chit1*) de *B. bassiana* contendo 1047 pares de bases foi obtida da base de dados *on line* National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nih.gov), número de acesso GenBank AY145440 (FANG *et al.*, 2005). A partir da seqüência foram desenhados os “primers” (Chit1forward: 5'-GCTCGCAACATACCAATC-3' e Chit1reverse: 5'-GTCGCCAAATGTCCAATTC-3') pelo programa Gene Runner (Hastings Software, Hasting on Hudson, NY) e utilizados para amplificação do gene quitinase de *B. bassiana* via reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987). O processo de amplificação foi realizado com um volume final de 10 μ L, contendo 1,0 μ L de tampão (Invitrogen – 200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl, 10x concentrado), 1,0 μ L de dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados, Eppendorf 2,5mM) contendo 200 μ M de cada nucleotídeo, 10pmol de cada “primer”, 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen – 50mM), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen – 5 U/ μ L), 1,0 μ L de amostra de DNA (5ng/ μ L) e água ultrapura suficiente para 10 μ L. Reações controle negativas foram realizadas. Para amplificação do DNA foi utilizado um termociclador Biometra nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguido por mais 5 minutos a 72°C e 5°C por 5 minutos. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em transiluminador sob luz ultravioleta e o tamanho do produto obtido foi calculado com auxílio do software DNAfrag (ROOD; GAWTHORNE, 1984).

2.6 Análise de restrição dos produtos amplificados

Os produtos de amplificação foram analisados quanto à existência de polimorfismos por meio da digestão do produto de PCR por endonucleases. As enzimas utilizadas foram selecionadas com o auxílio do programa AcaClone pDRAW32

(<http://www.acaclone.com>) baseando-se na mesma seqüência utilizada para desenho dos “primers”. Nove enzimas foram selecionadas (Tabela 2).

Enzima de restrição	Sítio de restrição	Unidades	Temp. (°C)	Fragmento (pares de bases)
<i>DrdI</i>	5' - GAC(N) ₄ ↓(N) ₂ GTC - 3'	2,5	37	593 - 319 - 123
<i>HgaI</i>	5' - GACGC(N) ₅ ↓ - 3'	1	37	726 - 216 - 93
<i>FokI</i>	5' - GGATG(N) ₉ ↓ - 3'	2	37	776 - 199 - 60
<i>AflIII</i>	5' - A↓CPuPyGT - 3'	2,5	37	579 - 344 - 112
<i>BtgI</i>	5' - C↓CPuPyGG - 3'	5	37	546 - 418 - 71
<i>BglI</i>	5' - GCCNNNN↓NGGC - 3'	5	37	518-517
<i>BseYI</i>	5' - C↓CCAGC - 3'	2,5	37	899-136
<i>BstF5I</i>	5' - GGATGNN↓ - 3'	5	65	763 - 212 - 60
<i>KasI</i>	5' - G↓GCGCC - 3'	4	37	528 - 414 - 93

Quadro 2: Enzimas de restrição selecionadas com o auxílio do programa pDRAW32 e utilizadas na verificação de polimorfismo no gene da quitinase de *B. bassiana*, seus respectivos sítios de restrição, unidades de enzimas empregadas na reação, temperatura de reação e tamanho esperado dos fragmentos.

As reações de digestão foram realizadas em tubos individuais contendo 10µL do produto de PCR, 1,5µL de tampão 10X e 1,5µL de soro albumina bovina 100µg/mL ambos de acordo com as recomendações do fabricante, unidades enzimáticas conforme descrito na Tabela 2 e completados para um volume final de 15µL com água ultrapura. As reações foram incubadas durante 4 horas observando-se as condições descritas pelo fabricante. Os resultados da digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade enzimática

A maior atividade de quitinase *in vitro* não coincidiu com a maior mortalidade causada em *H. hampei* estudada anteriormente por Hirose (2000) (Tabela 3). A maior atividade de quitinases, 1510,83U/mL, foi detectada na cepa CB95 que apresentou apenas 36,67% de mortalidade, e a cepa com maior mortalidade, CB102, 83,33%, apresentou atividade de quitinases de 46,36U/mL.

As quitinases são importantes para a degradação do exoesqueleto do inseto, porém a sua ação ocorre após a ação das proteases (ST.LEGER *et al.*, 1996), uma vez que a quitina ocorre entre as camadas de proteínas (CHAPMAN, 1998). As diferentes atividades detectadas entre as cepas pode ser devido a diferenças individuais de cada uma delas, seja na tradução das proteínas ou em eventos pós-traducionais (ST.LEGER; STAPLES; ROBERTS, 1993). Além disso, Gupta *et al.* (1992) observaram a produção de várias quitinases com diferentes níveis de atividade quando *B. bassiana* foi cultivada em meio contendo cutícula de insetos, e sugeriram que esta variedade de enzimas poderia estar relacionada com a constituição da cutícula do hospedeiro e, provavelmente, com a virulência de cada cepa.

Kosir, MacPherson e Khachatourians (1991) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho ao estudarem duas cepas de *B. bassiana* comparando-as quanto à produção de enzimas extracelulares e virulência contra o gafanhoto *Melanoplus sanguinipes*. A cepa mutante, GK2051, obtida por exposição da cepa selvagem, GK2016, à luz UV, foi menos virulenta. Entretanto, a cepa selvagem produziu duas vezes mais esterase, esterase-lipase, e β -galactosidase, enquanto a mutante produziu duas vezes mais quitinase e protease, enzimas estas que parecem ser essenciais para a capacidade de invadir e infectar insetos. A diferença na virulência e na produção de enzimas corrobora a idéia de que

a virulência seja multifatorial e que talvez alguns fatores determinantes sejam menos eficientes nas cepas menos virulentas.

Tabela 3: Porcentagem de mortalidade confirmada sobre indivíduos adultos da broca-do-café (*H. hampei*) (HIROSE, 2000) e atividade de quitinases de cepas de *B. bassiana* determinada em tampão acetato 50mM pH 5,5 a 45°C durante 1 hora.

Isolados	% Mortalidade confirmada	Atividade quitinase U/mL
CB102	83,33	46,363
CB66	80,56	380,220
CB97	77,78	31,126
CG82	76,67	9,255
CG425	73,33	34,465
447-ESALQ	73,33	26,391
CG481	69,44	422,995
CG26	66,67	98,485
CG432	63,33	25,510
CG458	56,67	140,890
CG138	50,00	444,960
CG368	50,00	136,435
CB64	50,00	0
UEL54	47,22	28,175
UEL08	46,67	599,380
UEL04	44,44	200,095
CG375	40,00	415,500
CB95	36,67	1510,835
UEL55	36,67	27,170
UEL07	30,00	179,910
CB74	23,33	303,500
CB82	20,00	23,786
CG166	16,67	676,290
CG71	16,67	22,760
CG25	13,33	0
CG245	8,00	405,685
CB35	5,56	11,695
CB47	3,33	77,685
UNI4	NA	26,865
CB17	NA	112,620

NA: não avaliada.

3.2 PCR-RFLP

A amplificação do gene da quitinase por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) resultou em somente um produto de aproximadamente 1050 pares de bases em todas as cepas estudadas e a análise dos fragmentos gerados por enzimas de restrição mostrou pouca variabilidade entre eles. Apenas três enzimas detectaram polimorfismo, a enzima *DrdI* na cepa CG245 (Figura 1A), a enzima *FokI*, nas cepas UEL04, UEL08 e CB47 (Figura 1B) e a enzima *KasI* na cepa CG138 (Figura 2).

O gene da quitinase possui dois sítios de restrição para a enzima *DrdI* o que geraria três fragmentos de aproximadamente 593, 319 e 123 pares de bases. Na cepa CG245 somente dois fragmentos de cerca de 750 e 300 pares de bases são resultantes da digestão pela enzima. Isto sugere que o gene da quitinase nesta cepa perdeu um sítio de restrição, onde pode ter ocorrido uma mutação, inserção ou deleção.

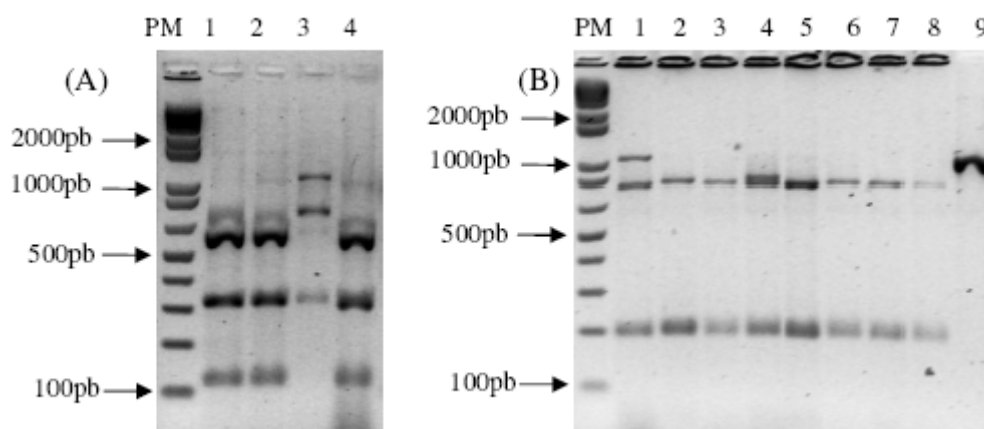


Figura 1: PCR-RFLP do gene da quitinase de *B. bassiana* demonstrando polimorfismo da cepa CG245 quando digerida pela endonuclease *DrdI* (A, linha 3) e das cepas UEL04, UEL08 e CB47 quando digeridas pela endonuclease *FokI* (B, linhas 1, 4 e 5, respectivamente). A primeira banda das linhas 3A e 1B, de aproximadamente 1000pb, são artefatos de produto de amplificação não digerido. PM: padrão de peso molecular 1kb Plus. Linha 9B: produto de PCR (gene da quitinase).

A enzima *FokI* também cliva o gene da quitinase em dois sítios de restrição, gerando fragmentos de aproximadamente 776, 199 e 60 pares de bases. Na cepa UEL04 o maior fragmento observado apresenta-se menor (cerca de 690pb) que nas outras cepas. Considerando a seqüência original do gene da quitinase e o sítio de restrição da enzima, pode ter ocorrido uma transição C/T no nucleotídeo 379 do produto amplificado que criaria um novo sítio de restrição, e conseqüentemente, um novo fragmento de cerca de 80 pares de bases. Este fragmento, por ser pequeno, não pôde ser visualizado separadamente do outro fragmento de cerca de 60 pares de bases no gel de agarose.

O padrão polimórfico da cepa UEL04 foi semelhante ao da cepa CB47, mas diferente da cepa UEL08. A mortalidade causada pelas cepas UEL04 e UEL08 foram cerca de 40% enquanto a da cepa CB47 foi de apenas 3%, não havendo correlação, portanto, com o polimorfismo. A atividade enzimática também não mostrou esta correlação, uma vez que os níveis detectados de atividade foram diferentes entre elas, sendo a atividade detectada para UEL08 de 599,380U/mL, para UEL04 igual a 200,095U/mL e para CB47, 77,685U/mL.

Os fragmentos gerados pela enzima *KasI* possuem tamanho estimado de 528, 414 e 93 pares de bases. Na cepa CG138 foram observados 5 fragmentos sendo apenas um deles de tamanho semelhante ao esperado (93 pb). Dois fragmentos apresentaram tamanho de cerca de 277 e 255 pares de bases. A soma destes dois fragmentos é aproximadamente o tamanho do maior fragmento esperado o que sugere o aparecimento de um novo sítio de restrição no gene da quitinase nesta cepa. O maior fragmento tem tamanho aproximado de 654 pares de bases, o segundo fragmento possui cerca de 407 pares de bases. O tamanho diferente destes fragmentos sugere que o gene possui quantidade de nucleotídeos diferente das outras cepas, mas que mantém aqueles dois sítios originais de restrição, além do novo sítio discutido anteriormente.

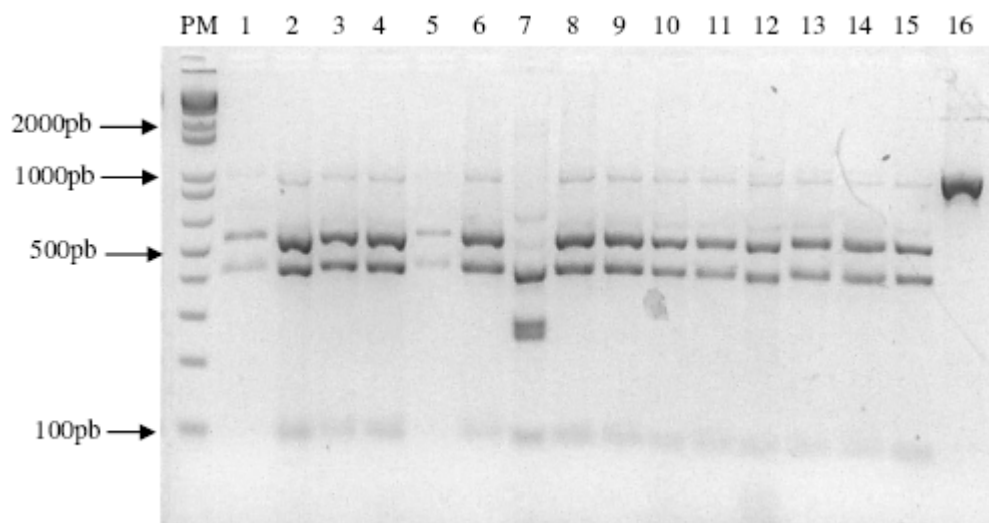


Figura 2: PCR-RFLP do gene da quitinase de *B. bassiana* demonstrando polimorfismo da cepa CG138 quando digerida pela endonuclease *KasI* (linha 7). PM: padrão peso molecular 1kb Plus; 16: produto de PCR (gene da quitinase).

Apesar de Kosir, MacPherson e Khachatourians (1991) terem encontrado polimorfismo entre uma cepa mais e outra menos virulenta de *B. bassiana* contra um tipo de gafanhoto, *M. sanguinipes*, por RFLP, os polimorfismos encontrados no gene da quitinase neste estudo não possibilitou uma correlação entre o gene da quitinase e os diferentes níveis de mortalidade contra a broca-do-café.

Uma outra abordagem tentando estabelecer uma correlação entre virulência e polimorfismo também foi feita por Luz *et al.* (1998) que observaram grande similaridade entre 10 isolados de *B. bassiana* por RAPD, apesar dos diferentes níveis de virulência contra *Triatoma infestans*.

A variabilidade observada também não possibilitou agrupar as cepas de acordo com o hospedeiro ou a região geográfica de origem. As cepas UEL04 e UEL08 foram isoladas da mesma espécie, *H. hampei*, ordem Coleoptera, e região geográfica (Paraná), porém o padrão polimórfico foi diferente, enquanto a cepa CB47, isolada no Estado de São Paulo do inseto *Anthonomus grandis*, ordem Coleoptera, apresentou padrão polimórfico semelhante à cepa UEL04.

A cepa CG138, que apresentou polimorfismo quando digerida com a enzimas *KasI*, foi isolada do inseto *Cosmopolites sordidus*, ordem Coleoptera, e apresentou taxa de mortalidade de 50% sobre adultos da broca-do-café e atividade enzimática igual a 444,960U/mL. Entre as demais 29 cepas estudadas, duas foram isoladas da mesma espécie (CB97 e CB35), porém de regiões geográficas distantes. Além disso, não apresentaram polimorfismo e a atividade enzimática (31,126 e 11,695U/mL, respectivamente) e mortalidade (77,78 e 5,56%, respectivamente) foram bastante distintas.

Alguns pesquisadores, utilizando outras técnicas para a análise de polimorfismos, também não puderam relacionar populações de *B. bassiana* com a região geográfica ou o inseto hospedeiro. A análise da região ITS por RFLP (GAITAN *et al.*, 2002; COATES; HELLMICH; LEWIS, 2002; MURO; METHA; MOORE, 2003) não se mostrou um bom marcador molecular uma vez que mutações nesta região do genoma não é frequente (MURO; MEHTA; MOORE, 2003). Gaitan *et al.*, (2002) também não encontraram esta relação ao observarem baixa variabilidade entre 95 cepas de *B. bassiana* (68 isolados de *H. hampei* e outros hospedeiros na Colômbia, e 27 isolados de outras regiões do mundo) por meio da técnica de RAPD. E, apesar da alta variabilidade intraespecífica do mtDNA de 21 cepas de diversas origens de *B. bassiana* encontrada por Uribe e Khachatourians (2004) por digestão do DNA total com enzimas de restrição e sondas de mtDNA total, também não foi possível uma correlação entre um dado mitotipo e a origem geográfica ou o hospedeiro.

O isolado CG245 foi obtido de um inseto da ordem Hymenoptera, família Megachilidae no Estado de Goiás. Como nenhuma das outras cepas estudadas foi isolada de inseto da mesma família ou da mesma região que esta cepa, alguma pressão seletiva pode estar ocorrendo naquele ecossistema. A distância geográfica entre populações de fungos parece ser uma barreira para a troca de material genético, apesar da facilidade de dispersão dos esporos por forças da natureza como vento e vetores (BRUCK; LEWIS, 2002). Wang *et*

al. (2003) observaram correlação do polimorfismo do gene da protease e marcadores microsatélite de *B. bassiana* com a região geográfica. Por outro lado, Maurer *et al.* (1997) sugerem que o hospedeiro exerce uma pressão seletiva favorecendo um ou alguns genótipos. Deste modo um estudo populacional com cepas isoladas da mesma região ou de habitat semelhantes ou isoladas do mesmo hospedeiro poderia esclarecer melhor o polimorfismo observado nesta cepa.

Um padrão polimórfico bastante variado ou pelo menos diferenciado entre as cepas mais e menos virulentas seria esperado para o gene da quitinase, uma vez que é considerada uma enzima importante para a instalação da infecção. Entretanto, a patogenicidade do fungo não está relacionada somente com um ou outro gene, mas com vários genes que trabalham em conjunto na infecção e morte do hospedeiro. Talvez a virulência não esteja diretamente ligada a alterações na seqüência do gene da quitinase e sim a seu promotor ou genes reguladores sendo interessante a continuidade deste trabalho com metodologias que verifiquem os níveis de expressão diferencial entre as cepas (microarray, SAGE, etc) visando compreender melhor o processo de infecção e conseqüentemente a virulência deste fungo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed.Piracicaba:FEALQ, 1998, 1163p.

BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; GIMÉNEZ, D.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isomeric viral particles isolated from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anizopliae*. **Mycological Research**, v. 100, p.1468-1472, 1996.

BRUCK, D.; LEWIS, L.C. *Carpophilus freemani* (Coleoptera: Nitidulidae) as a vector of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.80, p.188-190, 2002.

CHAPMAN, R.J. Integument. In: _____. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge University Press, 1998. p.415-440.

CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v.4, n.5, p.197-203, May, 1996.

COATES, B.S.; HELLMICH, R.L.; LEWIS, L.C. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. **Mycological Research**, v.160, n.1, p.40-50, Jan. 2002.

FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y. ; FENG, J. ; YANG, X. ; ZHANG, Y. ; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.1, p.363-370, Jan. 2005.

GAITAN, A.; VALDERRAMA, A.M.; SILDARRIAGA, G.; VELEZ, P.; BUSTILLO, A. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. **Mycological Research**, v.106, n.11, p.1307-1314, Nov. 2002.

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v.16, p.132-137, 1992.

HIROSE, E. **Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: hyphomycetes) virulentos à broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)**. 2000. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 66p.

ITO, E.T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T.; PINOTTI, M.H.P.; NEVES, P.M.O.J. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Journal of Biology and Biotechnology**. (aceito para publicação em 2005).

KANG, S.C.; PARK, S.; LEE, D.G. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, p.267-271, 1998.

_____. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.276-281, 1999.

KOSIR, J.M.; McPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, n.7, p.534-541, Jul. 1991.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M. Selection of *B. bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.93, n.6, p.839-846, nov/dez. 1998.

MAURER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P.A.; BRIDGE, P.D.; RIBA, G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**, v.101, n.2, p.159-164, 1997.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.

MURO, M.A.; MEHTA, S.; MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenia and other countries, and their correlation with host and geographical origin. **FEMS Microbiology Letters**, v.229, p.249-257, 2003.

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.80-88, 2004.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.77-82, 2005.

REISSIG, J.L.; STROMINGER, J.L.; LELOIS, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugar. **Journal of Biological Chemistry**, v.217, n.2, p.959-966, 1955.

ROOD, J.I.; GAWTHORNE, J.M. Apple software for analysis of the size of restriction fragments. **Nucleic Acids Research**, v.12, n.1, p.689-697. Jan. 1984.

ST.LEGER, R.J.; JOSHI, L. The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. In _____: **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Lacey, L. (Ed.). Academic Press, New York, 1997.

ST.LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; RIZZO, N.W.; ROBERTS, D.W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.3, p.907-912, Mar. 1996.

ST.LEGER, R.J.; CHARLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.85-95, 1986.

ST.LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.81-84, 1993.

TANADA, Y. Fungal infections. In: _____. **Insect Pathology**. Academic Press, 1993. p.318-387.

THARANATHAN, R.N.; KITTUR, F.S. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.64-87, 2003.

URIBE, D.; KHACHATOURIANS, G.G. Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveals high intraspecific variation. **Mycological Research**, v.108, n.9, p.1070-1078, Sep. 2004.

WANG, C.; SHAH, F.A.; PATEL, N.; LI, Z.; BUTT, T.M. Molecular investigation on strains relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, v.5, n.10, p.908-915, 2003.