



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DANIELLE CARDOSO GIMENES

**PROTEASES DE *BEAUVERIA BASSIANA*:
INDUÇÃO E POLIMORFISMO GENÉTICO**

Londrina
2013

DANIELLE CARDOSO GIMENES

**PROTEASES DE *BEAUVERIA BASSIANA*:
INDUÇÃO E POLIMORFISMO GENÉTICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Geni da Silva Varéa.
Coorientador: Prof. Dr. André Luíz Martinez de Oliveira.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G491p Gimenes, Danielle Cardoso.
Proteases de *Beauveria bassiana* : indução e polimorfismo genético / Danielle
Cardoso Gimenes. – Londrina, 2013.
113 f. : il.

Orientador: Geni da Silva Varéa.
Coorientador: André Luiz Martinez de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia industrial – Teses. 2. Inibidores enzimáticos proteolíticos –
Teses. 3. Fungos – Controle biológico – Teses. 4. Enzimas proteolíticas – Teses.
5. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. I. Varéa, Geni da Silva. II. Oliveira,
André Luiz Martinez de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

DANIELLE CARDOSO GIMENES

**PROTEASES DE *BEAUVERIA BASSIANA*:
INDUÇÃO E POLIMORFISMO GENÉTICO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Geni da Silva Varéa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 03 de abril de 2013.

Dedico este trabalho ao meu marido Rafael Gimenes por todo amor, incentivo e compreensão depositados a mim. Aos meus pais José Cardoso e Josilda Cardoso por serem os meus melhores exemplos de perseverança e fé.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Geni da Silva Varéa e Prof. Dr. André Luíz Martinez de Oliveira pelo conhecimento transmitido, dedicação, paciência, amizade e tempo despendido.

A Universidade Estadual de Londrina – UEL pela oportunidade.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores do Mestrado em Biotecnologia pelos ensinamentos no decorrer das disciplinas.

Aos colegas de laboratório Jaqueline Bordini, Danielle Ferreira, Karita Costa, Thiago Andrade e Renata Badini pela amizade, companheirismo e ajuda.

As estagiárias Thaís Dolfini e Alana Carvalho pelo auxílio nas atividades laboratoriais e também pelos momentos divertidos e de descontração.

Ao técnico e amigo Nelson Janeiro pela atenção e disponibilidade durante a realização dos trabalhos no laboratório.

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

GIMENES, Danielle Cardoso. **Proteases de *Beauveria bassiana*: Indução e Polimorfismo Genético**. 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico muito estudado e aplicado no controle de insetos-praga. O mecanismo de infecção envolve a produção de enzimas extracelulares que degradam a cutícula do inseto. As proteínas são os principais constituintes da procutícula dos insetos, devido a isso, as proteases desempenham um importante papel na penetração cuticular. Proteases podem ser induzidas em cultivos submersos na presença de indutores de natureza proteica e poucos estudos foram realizados sobre análise de polimorfismos de genes envolvidos com proteases e outros fatores de virulência do fungo *B. bassiana*. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi induzir a produção de proteases extracelulares e avaliar a ocorrência de polimorfismos nos genes codificadores de proteases de *B. bassiana*. A cepa CG432 de *B. bassiana* foi cultivada em meio mínimo de Vogel suplementado com os indutores: cutícula de cigarras, larvas de *Aedes aegypti*, caseína, quitina, gelatina, ureia e os aminoácidos metionina, prolina, alanina e glicina e inoculado à 10^6 esporos mL^{-1} , mantidos a 28°C , 200 rpm durante 5 dias. Extratos enzimáticos obtidos pela centrifugação foram analisados quanto ao teor de proteínas, produção de biomassa e atividade de proteases. Dos substratos analisados nos meios de cultura, a cutícula de cigarras, as larvas de *Aedes aegypti* e a caseína apresentaram maior atividade de proteases e, entre os aminoácidos, a metionina foi que apresentou melhor resultado. Entre esses indutores a cutícula e as larvas foram os que induziram maior atividade específica da enzima e a caseína contribuiu para o maior crescimento da biomassa fúngica. Posteriormente três indutores foram escolhidos: larvas de *Aedes aegypti*, caseína e metionina e a influência destes, na produção de proteases, foi avaliada utilizando um delineamento de misturas composto por 7 ensaios com 2 repetições no ponto central. O micro-organismo foi cultivado em meio de Vogel suplementado com os indutores e inoculado à 10^6 esporos mL^{-1} , mantido a 28°C , 150 rpm por 5 dias. Extratos enzimáticos obtidos foram analisados quanto à atividade de proteases e sua atividade específica, ao teor de proteínas, produção de biomassa e especificidade da enzima. Entre os indutores analisados, as larvas de *A. aegypti* induziram uma maior atividade de proteases, como também a atividade específica desta enzima, a caseína influenciou no aumento da produção de biomassa fúngica e a adição dos três indutores aumentou o teor de proteínas. Em todos os ensaios contendo larvas de *Aedes aegypti* houve a produção de proteases tipo-subtilisina (Pr1). Para a análise do polimorfismo nos genes codificadores de proteases, foram utilizadas 16 cepas de *B. bassiana* isoladas de diferentes insetos e origens geográficas, foi realizada a extração do DNA, amplificação e sequenciamento. A amplificação dos genes que codificam proteases resultou em um produto de aproximadamente 400 pb para todas as cepas testadas, os fragmentos amplificados foram sequenciados e as sequências utilizadas para a montagem de um dendrograma, onde foi analisado o polimorfismo genético entre as cepas. A análise indicou a formação de dois agrupamentos diferentes, sendo que essa variabilidade genética não foi correlacionada com a atividade de protease, inseto hospedeiro e origem geográfica.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*. Proteases. Indução. *Aedes aegypti*. Polimorfismo.

GIMENES, Danielle Cardoso. ***Beauveria bassiana* proteases: Induction and Genetic Polymorphism**. 2013. 113 p. Dissertation (Master Course in Biotechnology) – Londrina State University, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungus extensively studied and applied in the control of insect pests. The mechanism of infection involves the production of extracellular enzymes that degrade the insect cuticle. The proteins are the major constituents of the procuticle insects, because of this, proteases play an important role in cuticular penetration. Proteases can be induced in cultured submerged in the presence of induced protein nature and few studies have been conducted on the analysis of polymorphisms of genes involved with proteases and other virulence factors of the fungus *B. bassiana*. Therefore, the objective of this study was to induce the production of extracellular proteases and evaluate the occurrence of polymorphisms in genes encoding proteases of *B. bassiana*. The CG432 strain of *B. bassiana* was grown on Vogel's minimal medium supplemented with the inducer: cuticle cicadas, *Aedes aegypti* larvae, casein, chitin, gelatin, urea, and amino acids methionine, proline, alanine and glycine and inoculated with 10^6 spores ml^{-1} , maintained at 28 ° C, 200 rpm for 5 days. Enzyme extract obtained by centrifugation were analyzed for protein content, biomass and protease activity. Of the substrates examined in the culture media, the cuticle of cicadas, the larvae of *Aedes aegypti* and casein had higher protease activity and, between amino acids, methionine was presented the best result. Among these inducers cuticle and larvae that were induced higher specific activity of the enzyme and casein contributed to the higher growth of fungal biomass. Subsequently three inducers were chosen: larvae of *Aedes aegypti*, casein and methionine and their influence on the production of proteases was assessed using a mixture design consists of 7 trials with two repetitions at the center point. The organism was grown in Vogel's medium supplemented with inducers and inoculated at 10^6 spores mL^{-1} , maintained at 28°C, 150 rpm for 5 days. Enzymatic extracts obtained were analyzed for protease activity and its specific activity, protein content, biomass and enzyme specificity. Among the inducers analyzed larvae of *A. aegypti* induced a higher activity of proteases, but also the specific activity of this enzyme, casein influence the increased production of fungal biomass and addition of the three inducers increased protein content. In all assays containing *Aedes aegypti* larvae was the production of subtilisin-like proteases (Pr1). For the analysis of the polymorphism in genes encoding proteases were used 16 strains of *B. bassiana* isolates from different geographical origins and insects, we performed DNA extraction, amplification and sequencing. The amplification of the genes encoding proteases resulted in a product of approximately 400 bp for all strains tested, the amplified fragments were sequenced and the sequences used for the assembly of a dendrogram, which was analyzed genetic polymorphism between strains. The analysis indicated the formation of two different groups, and this genetic variability was not correlated with the activity of protease, insect host and geographical origin.

Key words: *Beauveria bassiana*. proteases. induction. *Aedes aegypti*. polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 1** - Delineamento experimental simplex-centróide para 3 componentes36

ANEXO A. Artigo 1.

- Figura 1** - Atividade de proteases dos extratos enzimáticos produzidos por *Beauveria bassina* CG432 em cultivo submerso em meio de Vogel suplementado com diferentes indutores56
- Figura 2** - Atividade específica de proteases e biomassa dos extratos enzimáticos produzidos por *Beauveria bassina* CG432 em cultivo submerso em meio de Vogel suplementado com diferentes indutores.....58

ANEXO B. Artigo 2.

- Figura 1** - Delineamento experimental simplex-centróide para 3 componentes86
- Figura 2** - Região de combinação entre as três variáveis x_1 , x_2 e x_3 obtida para a resposta (y_1) proteases (UP mL⁻¹)86
- Figura 3** - Gráfico das condições ótimas de produção de proteases (UP mL⁻¹) para as variáveis estudadas87
- Figura 4** - Gráfico das condições ótimas de produção de proteases (UP mL⁻¹) para as variáveis estudadas no modelo linear.....87
- Figura 5** - Região de combinação entre as três variáveis x_1 , x_2 e x_3 para a resposta atividade específica da enzima (UP/ mg de proteína).....88
- Figura 6** - Gráfico das condições ótimas de atividade específica da enzima (UP/mg de proteína) para as variáveis estudadas.....88
- Figura 7** - Gráfico das condições ótimas para se obter maior produção de proteases (UP mL⁻¹) e maior atividade específica da enzima (UP/mg de prot.)89

Figura 8 -	Região de combinação entre as três variáveis x1, x2 e x3 para a resposta biomassa (mg)	89
Figura 9 -	Gráfico das condições ótimas de crescimento da biomassa (mg) para as variáveis estudadas	90
Figura 10 -	Região de combinação entre as três variáveis para a resposta teor de proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	90
Figura 11 -	Gráfico das condições ótimas do teor de proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para as variáveis estudadas	91

ANEXO C. Artigo 3.

Figura 1 -	Atividade de protease (UP mL^{-1}) de isolados de <i>B. bassiana</i>	104
Figura 2 -	Dendrograma obtido das sequências de DNA dos genes codificadores de proteases de isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	106

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

- Tabela 1** - Condições experimentais utilizadas no delineamento experimental de misturas simplex-centróide37
- Tabela 2** - Hospedeiro e origem das cepas de *Beauveria bassiana* utilizadas para a análise de polimorfismo no gene da protease38

ANEXO B. Artigo 2.

- Tabela 1** - Condições experimentais utilizadas no delineamento experimental de mistura simplex-centróide e resultados do cultivo do fungo *Beauveria bassiana* CG43285

ANEXO C. Artigo 3.

- Tabela 1** - Hospedeiro e origem dos isolados de *Beauveria bassiana* utilizados para a análise de polimorfismo em genes codificadores de proteases99
- Tabela 2** - Iniciadores de PCR utilizados neste estudo e respectivas regiões-alvo100
- Tabela 3** - Sequências de proteases utilizadas neste estudo100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASB	Albumina de Soro Bovino
cDNA-AFLP	cDNA-amplified fragment length polymorphis
ELC	Extrato Livre de Células
EST	Expressão de seqüências tag
ITS	Internal transcribed spacer
ITS-RFLP	analysis of the internal-transcribed-spacer ribosomal region restriction fragment length polymorphism
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MSR	Metodologia de superfície de resposta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
UP	Unidade de Proteases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	15
3.2	FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO BEAVERIA BASSIANA.....	16
3.3	CONTROLE BIOLÓGICO DO AEDES AEGYPTI.....	18
3.4	MECANISMO DE AÇÃO ENTOMOPATOGÊNICA	19
3.5	PROTEASES	20
3.6	CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO BEAVERIA BASSIANA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES	21
3.7	INDUÇÃO DE PROTEASES POR COMPONENTE DA CUTÍCULA DE INSETO	23
3.8	METODOLOGIA ESTATÍSTICA	25
3.9	DIVERSIDADE GENÉTICA DE BEAVERIA BASSIANA.....	28
3.9.1	Genes que Codificam Proteases em B. bassiana.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MICRO-ORGANISMO	32
4.2	ATIVAÇÃO DOS ESPOROS DA CEPA CG432 DE BEAVERIA BASSIANA	32
4.3	PREPARO DO INÓCULO.....	32
4.4	CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO COM AGENTES INDUTORES DE PROTEASES	32
4.5	INTERRUPÇÃO DO CULTIVO	33
4.6	DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA.....	33
4.7	DIÁLISE	34
4.8	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	34
4.8.1	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS	34

4.8.2	Determinação da Atividade de Proteases	34
4.9	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE MISTURAS.....	35
4.9.1	Condições de cultivo do fungo Beauveria bassiana CG 432	35
4.9.2	Especificidade das proteases	35
4.9.3	Descrição do delineamento de misturas e análise estatística.....	36
4.10	EXTRAÇÃO DE DNA.....	37
4.11	QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	39
4.12	AMPLIFICAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEASES	39
4.13	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO EM GENES QUE CODIFICAM PROTEASES	40
4.13.1	Quantificação dos produtos de amplificação e Reação de PCR para Sequenciamento	41
4.13.2	Precipitação das reações de Sequenciamento.....	41
4.13.3	Sequenciamento	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6	CONCLUSÕES.....	43
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXOS	51
ANEXO A -	Artigo 1 Indução de proteases extracelulares de Beauveria bassiana CG432	52
ANEXO B -	Artigo 2 Produção de proteases por Beauveria bassiana CG432 em cultivo submerso otimizado por diferentes agentes indutores através de um planejamento experimental de misturas	62
ANEXO C -	Artigo 3 Análise de Polimorfismo em gene codificadores de proteases em Beauveria bassiana.....	92

1 INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana é conhecido como um fungo entomopatogênico com distribuição em todo o mundo e em diversos ambientes ecológicos. Pertence à classe Ascomycetes e família Cordycipitaceae, é muito estudado e aplicado no controle microbiano de pragas (OWNLEY et al., 2008). O controle microbiano de pragas é um segmento do controle biológico que trata da utilização racional dos entomopatógenos, visando à manutenção das populações de pragas em níveis de dano não econômicas, segundo os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

As principais vantagens do uso de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas é a especificidade desses agentes de controle, facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais e, ao contrário dos pesticidas químicos, ausência de poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não alvos (MOINO-Jr, 2006).

Vários trabalhos na literatura relatam sobre o potencial do fungo *B. bassiana* no combate a populações de insetos sugadores que causam sérios prejuízos à produção de alimentos vegetais, alimentos de origem animal e, mais atualmente, doenças em humanos como é o caso do mosquito transmissor da dengue (ITO et al., 2007; DONATTI et al., 2008, DONG et al., 2012).

No processo infeccioso o fungo penetra na cutícula do inseto hospedeiro principalmente por ação de enzimas extracelulares produzidas em resposta a constituição da cutícula do inseto (GUPTA et al., 1992). Um dos principais constituintes da cutícula são as proteínas e, sabe-se que, entre as enzimas extracelulares produzidas pelo fungo *B. bassiana*, as proteases são fatores de virulência que desempenham um importante papel na penetração cuticular (URTZ; RICE, 2000).

O fungo *B. bassiana* pode diversificar a produção de fatores de virulência em resposta à cutícula de diferentes insetos. Vários substratos indutores já foram estudados a fim de aumentar o teor de proteínas e, conseqüentemente, a produção de proteases extracelulares para facilitar o estudo sobre estrutura e cinética dessas enzimas e correlacionar com os níveis de virulência da cepa fúngica nos bioensaios em insetos (MOINO; ALVES; PEREIRA, 1998).

A produção de proteases extracelulares por *B. bassiana* é fortemente influenciada por componentes do meio de cultivo, especialmente fontes de carbono

e nitrogênio, fatores físicos e químicos como pH e temperatura, densidade de inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação (RAO et al., 2006; GUPTA et al., 2002; DHAR; KAUR, 2010). Devido a esses vários fatores que influenciam o crescimento do fungo e a sua produção de enzimas, é necessária a aplicação de metodologias estatísticas, tais como o delineamento fatorial, de misturas e metodologia de superfície de resposta, que permite verificar a importância de vários fatores relacionados às condições de produção (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000).

Como a quantidade das enzimas produzidas por *B. bassiana* envolvidas na degradação da cutícula e desenvolvimento da doença no inseto 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; MURO; MEHTA; MOORE, 2003; WANG et al., 2003; WANG et al., 2004; URIBE; KHACHATOURIANS, 2004; MITINA et al., 2011; XIAO et al., 2012). Até o momento, poucos estudos foram realizados sobre análise de polimorfismos de genes envolvidos com fatores de virulência de diferentes isolados do fungo *B. bassiana*. Em um desses estudos, 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.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo induzir a produção de proteases extracelulares e avaliar a ocorrência de polimorfismos no gene da protease de *B. bassiana*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Induzir a produção de proteases extracelulares e avaliar a ocorrência de polimorfismos nos genes codificadores de proteases de *Beauveria bassiana*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Induzir a produção de proteases por *B. bassiana* CG432 em meio mínimo de nutrientes suplementado com larvas de *Aedes aegypti* e outros substratos protéicos.

Analisar a influência desses indutores, adicionados ao meio de cultura, sobre o aumento na produção de proteases, visualizado pelo aumento de sua atividade enzimática, utilizando como ferramenta um delineamento de misturas.

Caracterizar as proteases quanto ao grupo ao qual pertencem: tipo-tripsina (Pr2) ou tipo-subtilisina (Pr1)

Amplificar os genes codificadores de proteases de 16 cepas de *B. bassiana* de regiões geográficas e inseto hospedeiro diferentes e verificar a ocorrência de polimorfismos através do sequenciamento desse gene alvo.

Analisar possíveis correlações de polimorfismos no gene da protease de *B. bassiana* com a atividade de proteases, inseto hospedeiro e região geográfica de origem.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

O controle microbiano de pragas é um segmento do controle biológico que trata da utilização racional dos entomopatógenos, visando à manutenção das populações de pragas em níveis de dano não-econômicas, conforme os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Segundo Moino-Jr (2006), os principais agentes entomopatogênicos relacionados ao controle microbiano são fungos, bactérias, vírus e nematóides, além de outros micro-organismos, como protozoários, rickétsias, espiroplasmas e fitoplasmas, menos conhecidos e estudados, mas também com potencial de investigação com relação à patogenia e aplicação.

A aplicação de pesticidas químicos é o método mais utilizado no controle de pragas na agricultura. Entretanto, não pode acabar com todas as pragas, como os pulgões, sendo que desenvolvem resistência a agentes químicos e multiplicam-se rapidamente. Além disso, o uso excessivo de agrotóxicos resulta em poluição ambiental, bem como efeitos adversos sobre a saúde dos seres humanos e outros organismos. Com o aumento da produção mundial de vegetais é necessário um controle de pragas que não ofereça risco ao meio ambiente. O uso de agentes de controle biológico são alternativas muito atraentes em relação aos convencionais produtos químicos. Fungos entomopatogênicos que parasitam insetos são armas importantes no biocontrole de pragas na lavoura. Atualmente, várias cepas de fungos entomopatogênicos como *Lecanicillium sp.*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces*, *Nomuraea rileyi* são usadas para controlar os pulgões e outras pragas (VU; HONG; KIM, 2007; ANDALÓ, 2004).

As principais vantagens do uso de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas são a especificidade, a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais e a ausência de poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não alvos. Dessa forma, percebe-se que o controle microbiano de insetos, como parte do controle biológico, é base de sustentação do equilíbrio natural das espécies de insetos potencialmente considerados como pragas (MOINO-Jr, 2006).

Vários inseticidas biológicos a base de fungos (micoinseticidas) estão sendo comercializados em vários países. No Brasil, a produção massal de fungos

entomopatogênicos é tradicionalmente realizada com o ingrediente ativo dos micoinseticidas, os esporos do fungo. Os produtos comerciais à base de fungos entomopatogênicos no Brasil são, na sua maioria, formulados como pó molhável, com cerca de 5% de fungo e 95% de inertes, como arroz moído (FARIA, MAGALHÃES, 2001; MOINO-Jr, 2006).

Já existe no mercado, principalmente internacional, vários produtos microbianos à disposição do consumidor, com perspectivas de utilização em decorrência do processo de conscientização da sociedade na direção do consumo de produtos agrícolas sanitária e ambientalmente seguros, os quais, inclusive, podem ter maior valor de mercado em função das características citadas (MOINO-Jr, 2006).

O fungo *Beauveria bassiana* é empregado em escala comercial nos Estados Unidos e México e também já foi comercializado no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

3.2 FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *BEAUVERIA BASSIANA*

O fungo *Beauveria bassiana* pertencente à classe Ascomycetes e família Cordycipitaceae é o mais comumente isolado de insetos praga na natureza. Esse fungo mostra grande potencial para o controle do desenvolvimento de populações de insetos sugadores que causam sérios prejuízos à produção de alimentos de origem vegetal e animal, doenças em humanos como o mosquito transmissor da dengue (OWNLEY et al., 2008; ITO et al., 2007; DONATTI et al., 2008; DONG et al., 2012).

O fungo *B. bassiana* é conhecido como um fungo entomopatogênico com distribuição em todo o mundo e em diversos ambientes ecológicos (OWNLEY et al., 2008). Vários relatos na literatura indicam o potencial entomopatogênico desse fungo sobre diferentes insetos praga (DONATTI et al., 2008; MONZÓN; GUHARAY; KLINGEN, 2008; AMÓRA et al., 2009; DEMBILIO et al., 2010; BUKHARI; TAKKEN; KOENRAADT, 2011).

Na região central do Brasil, o gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* é uma praga que causa sérios danos à culturas e pastagens. O fungo *B. bassiana* tem sido descrito como uma espécie promissora para o controle biológico de gafanhotos. Donatti et al. (2008) induziram a produção de proteases,

um importante fator de virulência do fungo, em meio de cultura suplementado com cutícula de gafanhotos *R. schistocercoides*. Obtiveram maior produção dessas enzimas em relação aos meios contendo outros indutores, sugerindo o potencial desse fungo no combate dos gafanhotos.

A broca do café (*Hypothenemus hampei*) é a praga desta cultura mais conhecida em todo o mundo e em vários países da América Latina o fungo *B. bassiana* tem sido usado para o controle dessa praga. A ocorrência natural de infecção de *H. hampei* por *B. bassiana* foi observada em um estudo realizado em três fazendas de café em dois anos consecutivos. Os níveis de infecção variaram neste período, atingindo um pico de 13,5% na fazenda três em 2004 e de 44% na fazenda um em 2005. Esses resultados mostram o potencial desse fungo entomopatogênico no controle natural da praga do café (MONZÓN; GUHARAY; KLINGEN, 2008).

Em estudos laboratoriais e de campo foi demonstrada a capacidade infectante de *B. bassiana* na praga de palmeiras *Rhynchophorus ferrugineus*, também conhecida popularmente como escaravelho da palmeira. Foi demonstrado que o fungo infectou ovos, larvas e adultos de *R. ferrugineus*, com redução de 78% no desenvolvimento das larvas e de 32,8% na eclosão dos ovos. Ensaio de campo indicaram eficácia de 85,7% no combate a *R. ferrugineus* (DEMBILIO et al., 2010).

O mosquito flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da Leishmaniose no Brasil, pode ser combatido por biocontrole com *B. bassiana*. O fungo nas concentrações de 10^4 a 10^8 conídios/mL reduziu em 59% o número de ovos que eclodiram. A longevidade dos mosquitos adultos foi de cinco dias, valor menor comparado ao controle negativo, com 7 dias. Portanto, foi observado nesse estudo que o fungo apresenta potencial patogênico contra esse mosquito vetor (AMÓRA et al., 2009).

Estudos experimentais têm demonstrado o potencial de fungos entomopatogênicos no controle dos mosquitos vetores da malária. Em laboratório, a formulação de esporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleo mineral reduziu de 39 – 50% a população de larvas de anofelinos. No entanto, são necessários estudos de campo, bem como o desenvolvimento de meios eficazes de aplicação que garanta uma maior eficiência dos esporos dos fungos nas condições ambientais (BUKHARI; TAKKEN; KOENRAADT, 2011).

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO DO *Aedes aegypti*

Há uma preocupação mundial com relação ao mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) como vetor de epidemias urbanas como a dengue, dengue hemorrágica e febre amarela. O controle desse vetor é baseado na destruição de criadouros combinada com a aplicação de inseticidas sintéticos, principalmente piretróides e organofosforados. Dessa forma, contribuem para aumentar a resistência dos mosquitos e causam impacto nocivo ao meio ambiente e à saúde humana. Devido a esses fatores é necessária a aplicação de métodos sustentáveis de controle destes vetores (SANTOS et al., 2009).

Insetos de todas as ordens, como os dípteros, são suscetíveis a doenças causadas por fungos. Patógenos fúngicos, tais como *Lagenidium*, *Coelomomyces* e *Culicinomyces*, são conhecidos por afetar populações de mosquitos. Há, no entanto, muitos outros fungos que infectam e matam mosquitos na fase larval e adultos. Com a descoberta, em 1917, da seletividade da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* houve redução na pesquisa de outros agentes de controle biológico. Entretanto, nos últimos anos a busca por outros agentes tem aumentado devido aos níveis contínuos e crescentes de resistência aos inseticidas e aumento do risco global de doenças transmitidas por mosquitos (SCHOLTE et al., 2004).

Em testes laboratoriais, conídios de *B. bassiana* mataram 100% de mosquitos adultos de *A. aegypti* após 5 dias de contato, em uma concentração de 2 mg de conídios, a 20°C e umidade relativa do ar de 70%-90% (CLARK et al., 1968).

Miranpuri e Khachatourians (1990) fizeram bioensaios laboratoriais utilizando o fungo *B. bassiana*, em dois estágios de desenvolvimento: blastosporos e conidiosporos, contra larvas de *Aedes aegypti*, a 27°C. Após 24 horas de exposição das larvas do mosquito aos blastosporos e conidiosporos do fungo, foi observado diferenças significativas ($p < 0,0001$) nas respostas larvicidas em relação ao experimento controle. A maior mortalidade das larvas do mosquito foi observada entre 24 e 96 horas após exposição aos blastosporos e conidiosporos do fungo em concentrações de 10^4 e 10^6 esporos/ mL⁻¹.

Scholte, Takken e Knols (2007) observaram que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* aplicado em mosquitos *Aedes aegypti* e

A. Albopictus foi eficaz na infecção dos mosquitos na concentração de $1,6 \times 10^{10}$ conídios/m² de recipiente de descanso dos mosquitos.

No trabalho realizado por Santos et al. (2009) foi observado que o *M. anisopliae* apresentou atividade ovicida aos ovos de *Aedes aegypti* em umidade relativa superior a 98% e 75%, em 5 e 25 dias de incubação, com concentração de 2,8 e 9,8 conídios/cm².

3.4 MECANISMO DE AÇÃO ENTOMOPATOGÊNICA

Uma das peculiaridades dos fungos entomopatogênicos é que eles causam a morte do inseto por infecção através da cutícula, não precisando ser ingeridos.

A cutícula dos insetos é formada por várias camadas de polímeros estruturais, formando a epicutícula mais externamente, seguida pela procutícula e epiderme. A epicutícula é uma camada muito fina (0,1 – 3 µm) e multifacetada, sendo que cada face tem diferentes estruturas químicas e propriedades. A camada superficial externa da epicutícula é constituída de 95% de lipídeos e é a camada que possui mais características de barreira devido a sua resistência à degradação enzimática e resistência a perda de água (PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007; BIDOCHKA; St. LEGER; ROBERTS, 1997).

A procutícula é uma camada rica em proteínas (61%), quitina (30%) e lipídeos (7%) e é composta por duas camadas, a exocutícula e a endocutícula. A epiderme é a camada mais interna da cutícula (PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007; BIDOCHKA; St. LEGER; ROBERTS, 1997).

A proposta do mecanismo de infecção ocorre em três estágios sucessivos: (1) adsorção dos conídios do fungo na superfície cuticular, (2) adesão ou consolidação da interface entre o conídio pré-germinado e a epicutícula e (3) germinação do fungo e desenvolvimento na superfície cuticular até iniciar o estágio de penetração (PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007).

Os conídeos do fungo *B. bassiana* são responsáveis pela disseminação e início da infecção no hospedeiro, que ocorre por contato ou adesão à cutícula do inseto. O conídio viável germina sobre o inseto e, por ação química e física, atravessa a cutícula, penetra na cavidade geral do corpo, colonizando-o e matando-o. Posteriormente, com o objetivo de se reproduzir, o fungo atravessa a

cutícula do inseto e esporula, ou seja, produz conídios em grande quantidade que serão responsáveis pela disseminação e infecção de insetos, completando o ciclo do patógeno (NEVES, 2006).

No processo infeccioso, o fungo penetra na cutícula do inseto hospedeiro principalmente por ação de enzimas extracelulares produzidas em resposta a constituição da cutícula do inseto. Essas enzimas hidrolisam os polímeros constituintes do exoesqueleto, garantindo ao fungo os nutrientes necessários para o seu crescimento. As principais enzimas produzidas por *B. bassiana* são proteases, lipases e quitinases (GUPTA et al., 1992; ITO et al., 2007; DHAR; KAUR, 2010).

3.5 PROTEASES

Um dos principais constituintes da cutícula dos insetos são as proteínas e, sabe-se que, entre as enzimas extracelulares produzidas por *B. bassiana*, as proteases são fatores de virulência que desempenham um importante papel na penetração cuticular (SAMUELS; PATERSON, 1995; URTZ; RICE, 2000; DONATTI et al., 2008).

Proteases constituem um grande grupo de enzimas hidrolíticas que clivam as ligações peptídicas das proteínas em peptídeos menores e aminoácidos.

As proteases fúngicas apresentam uma ampla faixa de pH de ação (4 a 11) e especificidade de substrato. No entanto, essas enzimas têm uma menor taxa de reação e menor tolerância ao calor do que as bacterianas (RAO et al., 1998).

A atividade proteolítica pode ser medida por métodos qualitativos e quantitativos. O princípio fundamental destes métodos consiste na medida dos produtos de hidrólise da proteína ou na quantidade de proteína residual (GUPTA et al., 2002).

De acordo com o Comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, proteases são classificadas no subgrupo 4 do grupo 3 (hidrolases). No entanto, na maioria das vezes, as proteases não se encaixam no sistema de nomenclatura de enzimas, devido a sua enorme diversidade de ação e estrutura. Sendo assim, as proteases são classificadas com base em três critérios principais: o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e o seu desenvolvimento estrutural (RAO et al., 1998).

As proteases podem ser subdivididas em dois grandes grupos de acordo com o seu sítio de ação: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases quebram a ligação peptídica próxima ao sítio amino ou carboxi terminal no substrato, as endopeptidases quebram as ligações peptídicas distantes dos sítios amino e carboxi terminais. Com base no grupo funcional presente nos sítios catalíticos dessas enzimas elas podem ser classificadas em quatro grupos: serina proteases, aspartato proteases, cisteína proteases e metaloproteases (RAO et al., 1998).

No fungo *M. anisopliae* o fator determinante de sua entomopatogenicidade é baseado na protease tipo serina subtilisina (designada Pr1), onde o seu papel mais conhecido no processo infeccioso foi determinado. Esta enzima tem a função de degradar proteínas da cutícula de insetos e sua estrutura foi localizada na cutícula de insetos hospedeiros durante as fases iniciais de penetração do fungo. A enzima tipo tripsina (Pr 2) pertencente ao grupo das serina proteases também ocorre durante as fases iniciais de colonização da cutícula, sugerindo que esta enzima tem um papel complementar à Pr 1 no processo de degradação proteica (DONATTI et al., 2008).

Proteases com propriedades semelhantes a Pr1 e Pr2 também tem sido identificadas em filtrados de cultura do fungo *B. bassiana* (SAMUELS; PATERSON, 1995). A protease Pr1 de *B. bassiana* é considerada um fator de virulência pela capacidade de degradar a cutícula de insetos e semelhança genética com a Pr 1 de *M. anisopliae* (URTZ; RICE, 2000; DONATTI et al., 2008).

Tripsina e subtilisina são cineticamente muito semelhantes hidrolisando peptídeos e substratos ésteres sintéticos. Seus picos de atividade são próximos a pH 7 e 8, decaindo em pH baixo. A grande diferença entre as serino proteases é a especificidade, sendo a tripsina específica para peptídeos e ésteres dos aminoácidos lisina e arginina e a subtilisina específica para a fração hidrofóbica de cadeias de fenilalanina, tirosina e triptofano (FERSHT, 1977).

3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO *BEAUVERIA BASSIANA* PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES

A produção de proteases é uma propriedade comum a todos os organismos e estas enzimas são, geralmente, constitutivas. No entanto, às vezes podem ser parcialmente induzidas. Proteases são produzidas durante a fase

estacionária e, portanto, são geralmente reguladas por concentrações da fonte de carbono e nitrogênio. Métodos de fermentações submersas têm sido usados para regular a síntese de proteases com estratégias combinadas de batelada alimentada e contínua (GUPTA et al., 2002).

A produção de proteases extracelulares por *B. bassiana* é influenciada por componentes do meio de cultivo, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, fatores físicos e químicos tais como pH, temperatura, densidade de inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação (RAO et al., 2006; GUPTA et al., 2002).

No estudo de Rao et al. (2006) foi realizada uma otimização dos processos de cultivo com experimentos para verificar os fatores que influenciavam na produção de proteases por *B. bassiana* cepa A1. O efeito da fonte de carbono e nitrogênio na produção de proteases foi realizado em cultivos com 3% de fonte de carbono (glicose, maltose, amido de milho e pó de casca de camarão) e 1% da fonte de nitrogênio (pó de soja, proteína da soja, fermento em pó, extrato de levedura e peptona). A atividade máxima de proteases foi verificada utilizando as combinações de pó de casca de camarão e proteína de soja no 7º dia de cultivo.

Bidochka e Khachatourians (1988) relataram produção de protease por *B. bassiana* em meios contendo 1% de gelatina como única fonte de carbono e nitrogênio. Essa protease foi inibida por N-acetyl-D-glucosamine, apresentou massa molecular de 35 KDa e pH ótimo de 8,5.

Urtz e Rice (2000) estudaram uma protease de *B. bassiana* designada PBB. A condição de cultivo do fungo foi em meio com 1% de gelatina, taxa de aeração de 8:2 (volume do recipiente: volume do meio), incubados em 130 rpm por 5 dias. A enzima obtida foi estável a 25°C e apresentou um pH alcalino com atividade entre 7,5-9,5.

O íon Ca^{2+} e outros como Ba^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} podem ser utilizados para estabilizar proteases alcalinas. Estes íons metálicos protegem a enzima contra desnaturação térmica e desempenham um papel vital mantendo a conformação nativa da enzima em altas temperaturas (GUPTA et al., 2002).

No estudo realizado por Ito et al. (2007) foi analisada a produção de protease extracelular por *B. bassiana* CG432, pré-ativada na broca-do-café, em meio líquido contendo 1% de glicose e 0,5% de extrato de levedura. O fungo apresentou crescimento ativo após um período lag de 24 horas e produziu 80% do total de atividade de protease em 48 horas, com o máximo atingido no 5º dia de cultivo. A

enzima apresentou atividade ótima a 60°C, manteve-se estável em até 1M de Cl⁻ e durante 15 dias a 4°C e -18°C. Entretanto, perdeu a estabilidade depois de repetidos descongelamentos.

Neves e Hirose (2005) observaram que a cepa brasileira *B. bassiana* CG432 bioensaiada na broca do café, *Hypothenemus hampei*, apresentou melhor produção de conídios entre as 61 cepas brasileiras estudadas e reativadas no mesmo inseto. A taxa de mortalidade foi superior a 70% com concentração de 10⁸ conídeos/mL. Estudos anteriores mostraram que proteases extracelulares produzidas por essa cepa apresentaram atividade em pH 4,5, 7,0 e 9,5, sugerindo a produção de pelo menos três diferentes tipos de proteases (STURMER et al., 2003/2004).

No trabalho realizado por Dhar e Kaur (2010) foi investigada a atividade proteolítica de 17 isolados de *B. bassiana* cultivados em 10 dias. Avaliou-se o efeito do tempo de incubação na produção de proteases Pr1 e Pr2 em meios de cultivo com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Além dos possíveis efeitos indutores, foram avaliadas a liberação de amônia e alteração do pH no meio, bem como seus efeitos na produção de proteases. Com os resultados desse trabalho foi observado que a maioria dos isolados do fungo apresentaram maior produção de proteases durante 4 a 6 dias de cultivo, utilizando a caseína (1%) como única fonte de carbono e nitrogênio. A atividade da protease Pr1 foi maior para todos os isolados em relação a atividade de Pr2, mesmo utilizando um meio mínimo de nutrientes, indicando que a produção da enzima é constitutiva. Houve alterações do pH no meio de cultivo principalmente com os isolados que tiveram maior atividade de Pr1 no qual foi observado maior liberação de amônia.

3.7 INDUÇÃO DE PROTEASES POR COMPONENTES DA CUTÍCULA DE INSETOS

A produção de enzimas proteolíticas é um importante fator de virulência para a fixação dos esporos do fungo na cutícula do inseto. Um dos principais determinantes de entomopatogenicidade é a endoprotease subtilisina designada Pr1. Essa proteína é um fator de virulência do fungo que pode ser induzida pela cutícula do inseto e reprimida por nutrientes em excesso. A tripsina, protease designada como Pr2, é a primeira a aparecer “in vitro” durante o crescimento do

fungo na cutícula, mas sua função no parasitismo de insetos ainda não foi completamente elucidada (DHAR e KAUR, 2010).

Os fungos entomopatogênicos podem diversificar a produção de fatores de virulência em resposta a diferentes insetos. Vários substratos indutores já foram estudados para aumentar o teor de proteínas e, conseqüentemente, a produção de proteases extracelulares para facilitar o estudo da estrutura e cinética dessas enzimas e correlacionar com os níveis de virulência da cepa fúngica nos bioensaios em insetos (MOINO-Jr; ALVES; PEREIRA, 1998).

Donatti et al. (2008) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de proteases por *B. bassiana* em meio líquido suplementado com glicose, cutícula de gafanhotos e aminoácidos (alanina, prolina, glicina e metionina), acrescentados ao meio isolados ou combinados. A cutícula do inseto foi preparada em solução de tetraborato de potássio 1% e foi adicionada a um meio mínimo de nutrientes, previamente esterilizada. Em todos os meios testados a produção de proteases foi variável e maior atividade das proteases Pr1 e Pr2 foram encontrados nos sobrenadantes dos meios contendo cutícula de insetos. Neste trabalho também foi observado que o aminoácido metionina desempenhou um papel regulador na secreção da protease Pr1 por *B. bassiana*, sugerindo que a indução e repressão da enzima Pr1 foi dependente da concentração de metionina presente no meio de cultura.

Gupta et al. (1992) observaram maior atividade de proteases Pr1 e Pr2 por *B. bassiana* em meios de cultivo suplementados com cutícula de insetos traça (*Galleria mellonella*).

Dias et al. (2008) estudaram as proteases degradadoras de cutícula Pr1 e Pr2, produzidas por *B. bassiana* cepa CG425 com alta virulência contra broca do café, *Hypothenemus hampei*. O fungo cresceu em meio contendo nitrato e em meio contendo cutícula da broca, em condições tamponadas e não tamponadas. Em meio não tamponado suplementado com cutícula, as atividades de Pr1 e Pr2 foram detectadas somente em valores de pH igual ou superior a 5,5. Em culturas tamponadas (pH = 8), houve maiores atividades de Pr1 e Pr2 em meio suplementado com cutícula, em comparação às atividades em meio contendo nitrato. Os resultados obtidos por esses autores sugerem que Pr1 e Pr2 produzidas pelo isolado CG425 são induzidas por componentes da cutícula da broca do café, e

que o pH da cultura influencia a expressão destas proteases, indicando a ocorrência de um mecanismo eficiente de secreção de enzimas por este fungo.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por Campos et al. (2005). Estes autores descreveram que cutícula de *H. hampei* adicionado ao meio também pode induzir a produção de protease Pr1 por *B. bassiana* e que a adição do aminoácido alanina no meio de cultura reprime a produção de Pr1.

Cardoso, Machado e Varéa (2011) avaliaram a produção de proteases, por *B. bassiana* CG432, em meios de cultura líquida contendo glicose 1% e extrato de levedura 0,5% acrescidos dos indutores gelatina e cutícula de cigarras (*Cicada orni*). Neste trabalho foi observado que no meio contendo cutícula houve um aumento de 57% da produção de protease em comparação com o cultivo padrão sem a presença de indutores.

3.8 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Metodologias estatísticas como o delineamento fatorial, de misturas e metodologia de superfície de resposta (MSR) são utilizadas na otimização em bioprocessos (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000), uma vez que avaliam as interações entre os parâmetros que influenciam a fermentação como pH (PRAKASH; PADMAJA; KIRAN, 2008), temperatura, aeração, concentração dos nutrientes do meio (RAO et al., 2006; CRUZ, 2009), entre outros.

Modelos empíricos e análises estatísticas são fundamentais na compreensão dos mecanismos básicos em situações complexas, proporcionando assim um maior entendimento e controle do processo. Na maioria dos problemas de MSR a relação entre a resposta e as variáveis independentes é desconhecida, assim o primeiro passo na MSR é aproximar o processo para uma função (f) em alguma região das variáveis independentes. Se a resposta é bem modelada por uma função linear das variáveis independentes, a função é no modelo de primeira ordem. Se houver curvatura no sistema ou na região ótima deverá ser aplicado uma função de segunda ordem. O objetivo principal da MSR é determinar as condições operacionais ótimas para o sistema ou uma região que satisfaça as especificações operacionais (ELIBOL; OZER, 2002).

A produção de proteases extracelulares por *B. bassiana* é fortemente influenciada por componentes do meio de cultivo, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, fatores físicos e químicos como pH, temperatura, densidade de inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação. Devido a esses vários fatores que influenciam o crescimento do fungo e a sua produção de enzimas, convém à aplicação de metodologias estatísticas, tais como a MSR, que permite verificar a importância de vários fatores relacionados às condições de produção (GUPTA et al., 2002; RAO et al., 2006).

No estudo de Rao et al. (2006) foi realizada uma otimização dos processos de cultivo com uma série de experimentos e aplicação da MSR, com análise dos fatores influenciaram a produção de proteases pelo fungo *B. bassiana* cepa A1. Os resultados demonstraram que a produção máxima de proteases foi obtida no 7º dia de cultivo. O efeito da fonte de carbono e nitrogênio na produção de proteases foi realizado com 3% (p/v) de fonte de carbono (glicose, maltose, amido de milho e pó de casca de camarão) e 1% (p/v) de fonte de nitrogênio (pó de soja, proteína da soja, fermento em pó, extrato de levedura e peptona). A atividade máxima de proteases de 280,72 U mL⁻¹ foi verificada nas combinações de pó de casca de camarão e proteína de soja.

Cruz (2009) realizou uma otimização da produção de lipases por fungo *B. bassiana* CG432 em cultivos submersos suplementados com óleos e resíduos gerados por refinarias de óleos vegetais. Foram aplicados modelos fatoriais incompletos (2^{4-1} e 2^{3-1}) com ponto central e MSR para as variáveis concentração de Triton X-100, glucose, óleo de oliva e uréia para obter como resposta alta produção de lipases e baixa produção de biomassa. As condições indicadas na MSR demonstraram que os cultivos de 4 dias contendo 0,35% do surfatante Triton X-100, 0,75% de óleo de oliva e 1,5% de uréia aumentaram a produção de lipases em 229% ao mesmo tempo em que reduziram a produção de biomassa em 441%.

Prakash, Padmaja e Kiran (2008) realizaram uma otimização das variáveis do processo para a produção em larga escala de esporos de *M. anisopliae* por fermentação em estado sólido. O processo fermentativo foi realizado usando três substratos: arroz, cevada e sorgo e as variáveis pH, umidade e concentração de extrato de levedura foram consideradas importantes na produção de esporos de *M. anisopliae*. Foi aplicado um delineamento fatorial completo 2^3 para determinar a concentração ótima de cada variável e obtido um polinômio de segunda ordem por

análise de regressão múltipla dos dados experimentais. Os valores ótimos encontrados foram teor de umidade de 75,68% para o sorgo, 73,21% para a cevada e 22,34% para o arroz. O rendimento máximo de conídios foi observado para o arroz em um pH de 7,01; sorgo em pH 7,06 e cevada em pH 6,76.

A metodologia de delineamento de misturas é uma importante área dentro da estatística aplicada e pode ser entendida como a variação da metodologia no cálculo de superfícies de resposta para modelar, simular e otimizar determinada propriedade de uma mistura em função de seus componentes. Ao contrário das técnicas de delineamento fatorial, este método respeita a restrição entre os constituintes, tanto na escolha do delineamento quanto na análise dos resultados. Neste modelo dois ou mais componentes são misturados em proporções variadas e as características dos produtos resultantes são registradas, as respostas dependem somente das proporções dos componentes presentes na mesma, que na maioria dos casos esses constituintes somam 100% (CORNELL, 2002).

Giese et al. (2011) realizaram uma análise estatística por delineamento de mistura para otimizar a produção de β 1-3 glucanases pelos fungos *Botryosphaeria rhodina* e *Trichoderma harzianum*. As variáveis independentes analisadas foram as fontes de carbono botriosferana, glicose e lactose. Para a *B. rhodina*, a glicose e lactose influenciaram a produção de glucanase nos mesmos níveis ($2,30 \text{ U mL}^{-1}$), enquanto que para *T. harzianum*, a botriosferana adicionada ao meio com os demais substratos exerceu um efeito sinérgico favorável a produção de glucanase ($4,25 \text{ U mL}^{-1}$).

Delabona et al. (2012) investigaram o perfil da glicosil hidrolase de uma nova cepa de *T. harzianum* cultivada em fermentação submersa controlada por biorreator. Foi aplicado um delineamento experimental de mistura para analisar a influencia de diferentes componentes do meio (bagaço de cana deslignificado por vapor, sacarose e farelo de soja) sobre a biossíntese de glicosil hidrolase. Aplicando a metodologia de delineamento de mistura foi observado que dos componentes analisados, o bagaço de cana deslignificado por vapor foi o mais importante do meio de cultura para a maximização da atividade da glicosil hidrolase.

Ainda não há estudos com aplicação do delineamento de misturas para a análise da produção de enzimas pelo fungo *B. bassiana*.

3.9 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *BEAUVERIA BASSIANA*

A análise da expressão de sequências Tag, inserção mutagênese e estudos funcionais dos genes de *B. bassiana* têm identificado alguns genes envolvidos no desenvolvimento do fungo, virulência e respostas ao estresse. Para facilitar o entendimento sobre a patogênese deste fungo e a interação com insetos, Xiao et al. (2012) sequenciaram o genoma de *B. bassiana* cepa ARSEF 2860, e realizaram uma análise comparativa com os genomas sequenciados de outros Ascomycetos patógenos de insetos *Metarhizium robertsii*, *M. acridum* e *Cordyceps militaris*. A comparação revelou um conjunto comum de expansões de genes da família que distinguem esses fungos de patógenos de plantas e saprófitas, como também o ganho ou perda de genes espécie-específica que se correlacionam com diferentes estratégias patogênicas. O sequenciamento resultou em um genoma de *B. bassiana* cepa ARSEF 2860 com um tamanho total de 33,7 mega bytes (Mb), que é semelhante ao do *Cordyceps militaris* (32,2 Mb), porém menor que *Metarhizium robertsii* (39,0 Mb) e *M. acridum* (38,1 Mb). Por mapeamento de 13.412 sequências EST, o genoma de *B. bassiana* foi estimado como sendo 96,1% completo. Foi codificado 10.366 genes de proteínas e, em termos de densidade de genes, (genes por Mb) a *B. bassiana* teve a mais compacta estrutura do genoma em relação aos outros fungos entomopatogênicos analisados.

O fungo *B. bassiana* possui um estilo de vida oportunista em ambos os habitats patogênico e saprofítico. Essa versatilidade vital sugere ser devido à expressão diferencial de genes no fungo como uma resposta ao ambiente circundante. Pode-se supor que os fungos têm diferentes subconjuntos de genes de resposta ao crescimento em diferentes substratos, que podem ser considerados como indicadores moleculares de adaptação estratégica (PATHAN et al., 2007).

Gupta et al. (1992) relataram que a quantidade das enzimas produzidas por *B. bassiana* envolvidas na degradação da cutícula do inseto depende do tipo de hospedeiro e do ambiente que habitam. Em vista disso, vários estudos têm sido realizados para encontrar alguma correlação entre cepas de *B. bassiana*, região geográfica e inseto hospedeiro de origem.

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 tipo 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 a origem geográfica do que com o tipo do hospedeiro e, como somente duas das 56 cepas examinadas possuem haplótipos idênticos, desenvolvem um estilo de reprodução não-clonal.

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 do 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.

Muro; Mehta e Moore (2003), usando ITS-RFLP (internal-transcribed-spacer ribosomal region restriction fragment length polymorphism), sequenciamento da região ITS e AFLP (amplified fragment length polymorphism), analisaram a variabilidade genética de 50 isolados de *Beauveria spp* coletados de insetos e do solo de 17 países, incluindo o Brasil. Nesse trabalho foi demonstrado que a técnica de AFLP proporciona mais informações quando comparada à técnica de ITS-RFLP, já que os isolados de *B. bassiana* não puderam ser distinguidos por esta técnica, uma vez que todos apresentaram um mesmo padrão de banda. Esse trabalho demonstrou ainda que a técnica de AFLP é adequada para identificação inter-específica dos isolados e para estudar a variabilidade molecular intra específica dos mesmos. Segundo este autor, a técnica de AFLP pode ser um marcador molecular confiável para estudar a variabilidade genética de *B. bassiana*, pois engloba análise total do genoma com uma grande quantidade de informações. Esse trabalho demonstrou também que dois isolados de *B. bassiana* coletados de diferentes insetos e provenientes de duas regiões distantes do Brasil (Mato Grosso e Amazonas) apresentaram similaridade de 82% sugerindo que as regiões geográficas distintas dentro de um país não são responsáveis pela dissimilaridade entre os isolados avaliados no estudo.

Posteriormente, Muro et al. (2005) investigaram a diversidade genética e caracterizaram 110 isolados de *Beauveria*, sendo 104 isolados pertencentes à espécie *B. bassiana*. Para tanto, além de ITS-RFLP, sequenciamento da região ITS e AFLP foi utilizada a técnica de ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Nesse trabalho, as técnicas: ITS-RFLP e sequenciamento da região ITS novamente não detectaram variação genética significativa entre os isolados, impossibilitando o estabelecimento de associações entre os isolados com sua origem geográfica ou seus respectivos hospedeiros. Ao contrário, as análises de ISSR e AFLP deram indicações sobre agrupamentos intra-específicos correlacionando perfil genético e origem geográfica, no entanto não houve associação entre os isolados com seus respectivos hospedeiros de origem.

Mitina et al. (2011) avaliaram o polimorfismo de 10 cepas de *B. bassiana* isoladas de uma espécie de carrapatos na Moldova. As cepas foram agrupadas de forma independente usando filogenia baseada na técnica RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) e seqüências ITS (internal transcribed spacer) e, também, por diferenças nas propriedades morfológicas e culturais (como velocidade de crescimento em vários meios e morfologia da colônia). Após a análise, observaram uma grande diversidade genética e morfológica entre as cepas.

3.9.1 Genes que Codificam Proteases em *B. bassiana*

Foi clonado um gene que codifica para a protease Pr1 de *B. bassiana* a partir de DNA complementar (cDNA) obtido de micélio cultivado na presença de cutícula e quitina. A seqüência de cDNA revelou que Pr1 é sintetizada como um precursor que contém um peptídeo sinal, um propeptídeo e a proteína madura, de forma semelhante a Pr1A e Pr1B de *M. anisopliae*. Concluiu-se neste trabalho que a Pr1 produzida por *B. bassiana* desempenha papel na degradação de cutícula, semelhante ao observado para *M. anisopliae* (JOSHI; St. LEGER; BIDOCHKA, 1995).

Joshi; St. Leger e Bidochka (1994) isolaram um RNAm a partir de *B. bassiana* cultivado em meio contendo cutícula de inseto. A seqüência de aminoácidos predita foi comparada com uma Pr1 de *M. anisopliae* e proteinase de *Tritirachum album*, um fungo saprofítico. A seqüência deste cDNA revelou que a Pr1 de *B. bassiana* é sintetizada como um grande precursor de 360 aminoácidos. O

gene que a codifica contém 1269 pb e a região codificadora contém 1083 pb. O peptídeo maduro contém 260 aminoácidos. Estas informações foram retiradas do banco de dados do NCBI sob o número gi 639711. Além deste cadastro, outras 3 subtilisinas de *B. bassiana* são encontradas neste mesmo banco de dados (gi 14626932 cuticle-degrading proteinase CDEP-1, gi 18026684 cuticle-degrading protease bassiasin I e gi 4761118 cuticle-degrading protease bassiasin I).

Em um estudo de polimorfismo do gene da subtilisina A de *B. bassiana* realizado por Ribeiro (2005), foi observado através de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos preditos, alta similaridade e identidade entre o gene Pr1 de *B. bassiana* e Pr1 A de *M. anisopliae*. As seqüências de aminoácidos, preditas a partir da seqüência de nucleotídeos, da proteína Pr1 subdividiram os isolados brasileiros de *B. bassiana* estudados em três grupos diferentes. Demonstrou-se que os genes de subtilisina de *B. bassiana* depositados no NCBI sob os nº de acessos gi 14626932, gi 18026683, gi 4761118, gi 639711 e outros 6 alelos analisados são ortólogos de Pr1 A descritos para *M. anisopliae*. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que o gene Pr1 de *B. bassiana* é constituído por 3 introns (1, 2, 3). Os introns 2 e 3 foram localizados em todas as linhagens analisadas. Estes, tiveram ligações típicas 5´ (GT) e 3´(AG) e habitam entre dois códons, isso é observado também para *M. anisopliae*. Foi detectada variação no tamanho de ambos os introns para as linhagens de *B. bassiana* analisados. O tamanho do intron 2 variou de 59 a 62 pb. No que se refere ao intron 3, todas as linhagens seqüenciadas tiveram este intron constituído por 67 pb, mas algumas linhagens de *B. bassiana* com seqüência depositada no banco de dados tiveram seu intron 3 constituído por 68 pb. Há de se ressaltar ainda que a localização dos introns foi conservada entre o gene Pr1 A de *M. anisopliae* e Pr1 de *B. bassiana*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

Utilizou-se o fungo *Beauveria bassiana*, cepa CG432 isolada de adultos da família Membracidae (Homóptera), na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil. A cepa foi procedente da EMBRAPA/Cenargen e armazenada no Banco de Entomopatógenos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

4.2 ATIVAÇÃO DOS ESPOROS DA CEPA CG432 DE *BEAUVERIA BASSIANA*

A cepa, estocada a -20°C , foi inicialmente repicada em meio solidificado complexo otimizado por Alves (1998) composto por 0,2 g de ágar, 10 g de D-glucose anidra, 5 g de extrato de levedura, 1,58 g de NaNO_3 , 1,05 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de KCl, 0,6 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,36 g de KH_2PO_4 , e água para 1 litro, incubado em estufa BOD a 26°C , em fotoperíodo de 12 horas por cerca de 10 dias ou até completa esporulação.

4.3 PREPARO DO INÓCULO

Os esporos produzidos no meio de manutenção foram utilizados para a padronização das suspensões (10^8 esporos mL^{-1}) através de diluições em solução salina fisiológica estéril adicionada de 0,01% de Tween 80 e contagem dos esporos em câmara reticulada de Neubauer sob microscopia óptica.

4.4 CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO COM AGENTES INDUTORES DE PROTEASES

Foram realizados cultivos submersos em salina de Vogel (1956) adicionada de 1% de glicose como única fonte de carbono. Os meios de cultura líquido foram suplementados com diferentes indutores de proteases: caseína (Riedel) 1%, gelatina (Acros organics, cod. 410875000) 0,5% e 1%, quitina (Sigma) 2%, Uréia (Sigma) 0,4%, prolina (Casa Americana), glicina (Merck), alanina (Merck)

e metionina (Merck) a 0,5%, cutícula de cigarras (Homóptera: Cicadidae) a 0,5 e 1%; larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a aproximadamente 1% (150 mg).

As cigarras foram fornecidas pelo professor Dr. Carlos Eduardo do Laboratório de Zoologia da UEL. A cutícula foi previamente tratada em solução de tetraborato de sódio 1%, dessecada em estufa a 37°C e moída em gral de porcelana (PATERSON et al., 1994; PATHAN et al., 2007). As larvas, fornecidas pelo professor Dr. João Zequi do Laboratório de Entomologia da UEL, foram sacrificadas em salina concentrada 10 vezes, filtradas à vácuo, secas em estufa a 60°C por 20 minutos e mantidas sob congelamento a -20°C até o momento do uso.

Os cultivos foram realizados em três repetições contendo 12,5 mL de meio de cultura para cada frasco de erlenmeyer de 125 mL, autoclavados a 120°C por 20 minutos. Após esterilizados, os meios foram colocados em câmara de fluxo laminar estéril (modelo CLFV – 12 Veco) e foram adicionados um inóculo a 1% (v/v) da suspensão de esporos padronizada (conforme descrito no item 4.3), de modo a obter um inóculo de 10^6 esporos por mL de meio de cultura.

Paralelamente foram realizados cultivos controle, sem adição de indutores, contendo glicose 1% como única fonte de carbono. Realizou-se também um cultivo estéril para cada condição estudada.

Os cultivos foram mantidos em incubadora orbital (Shaker MA 420 Marconi) a 28°C sob agitação a 150 rpm durante 5 dias.

4.5 INTERRUPÇÃO DO CULTIVO

Os cultivos foram interrompidos por filtração a vácuo em banho de gelo utilizando papel de filtro e centrifugados a 8000 xg por 20 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (Boeco U-32R). O filtrado, denominado como extrato livre de células (ELC), foi analisado quanto ao teor de proteínas e atividade de proteases.

4.6 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

O crescimento do fungo foi avaliado pela quantificação da biomassa por gravimetria a 80°C até peso constante.

4.7 DIÁLISE

Os ELCs foram dialisados contra tampão Tris-HCl 5mM pH 7,0 durante 24 horas a 4°C, com três trocas do tampão ao longo desse período, para eliminar interferentes do meio de cultura e, então, utilizados para estudos referentes à atividade enzimática.

4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.8.1 Determinação do Teor de Proteínas

Foi realizada a quantificação das proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) presentes nos ELC pelo método de Bradford (1976), com base na equação de regressão $y = 0,0045x + 0,0633$ ($R^2 = 0,9987$), obtida da curva de calibração com concentrações de 50 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina de soro bovino (ASB).

4.8.2 Determinação da Atividade de Proteases

A atividade de proteases no ELC foi determinada segundo a técnica de Lemos et al. (1990). Alíquotas de 200 μL dos extratos enzimáticos foram adicionadas a 200 μL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 e a 100 μL de ASB 12,5 mg mL^{-1} . A reação foi interrompida, após incubação em banho maria a 37°C por 1 hora, pela adição de 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) gelado a 10%, seguida de centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos.

Os peptídeos solúveis presentes no sobrenadante foram determinados pelo método de Hartree (1972) com base na equação de regressão $y = 0,002x - 0,0027$ ($R^2 = 0,9976$), obtida da curva de calibração com concentrações de 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASB.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades de Protease (UP), onde 1UP foi definida como o número de μg de peptídeos solúveis liberados pela ação da protease, por mL do extrato, nas condições da reação.

4.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE MISTURAS

Após a realização do experimento anterior, foram selecionados os três melhores indutores na produção de proteases: as larvas de *Aedes aegypti*, caseína e metionina.

Utilizou-se um planejamento experimental de misturas simplex-centroide para avaliar a influência da adição de agentes indutores ao meio de cultivo: larvas de *Aedes aegypti* (x_1), caseína (x_2) e metionina (x_3), na produção de proteases (UP mL⁻¹) e atividade específica (UP/mg de proteína), no crescimento do fungo através do peso da biomassa (mg) e teor de proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.9.1 Condições de cultivo do fungo *Beauveria bassiana* CG 432

B. bassiana CG432 foi cultivado em meio mínimo de Vogel (1956) com 1% de glicose e suplementado com os agentes indutores (variáveis independentes x_1 , x_2 e x_3). Foram adicionados 30 mL de meio de cultura em frascos de erlenmeyer de 125 mL e inoculados 10⁶ conídios mL⁻¹ (inóculo preparado conforme o item 4.3). O cultivo foi realizado a 28°C, sob agitação a 150 rpm, durante 5 dias (conforme o item 4.4). Paralelamente, foi realizado cultivo controle, sem adição de indutores, contendo glicose 1% como única fonte de carbono. Os valores reais das variáveis independentes: larva de *Aedes aegypti* (x_1), caseína (x_2) e metionina (x_3) adicionados ao meio de cultura encontra-se na Tabela 1 do item 4.9.3.

Neste experimento foram realizadas as mesmas etapas já descritas nos itens 4.5, 4.6, 4.7, 4.8.1 e 4.8.2.

4.9.2 Especificidade das proteases

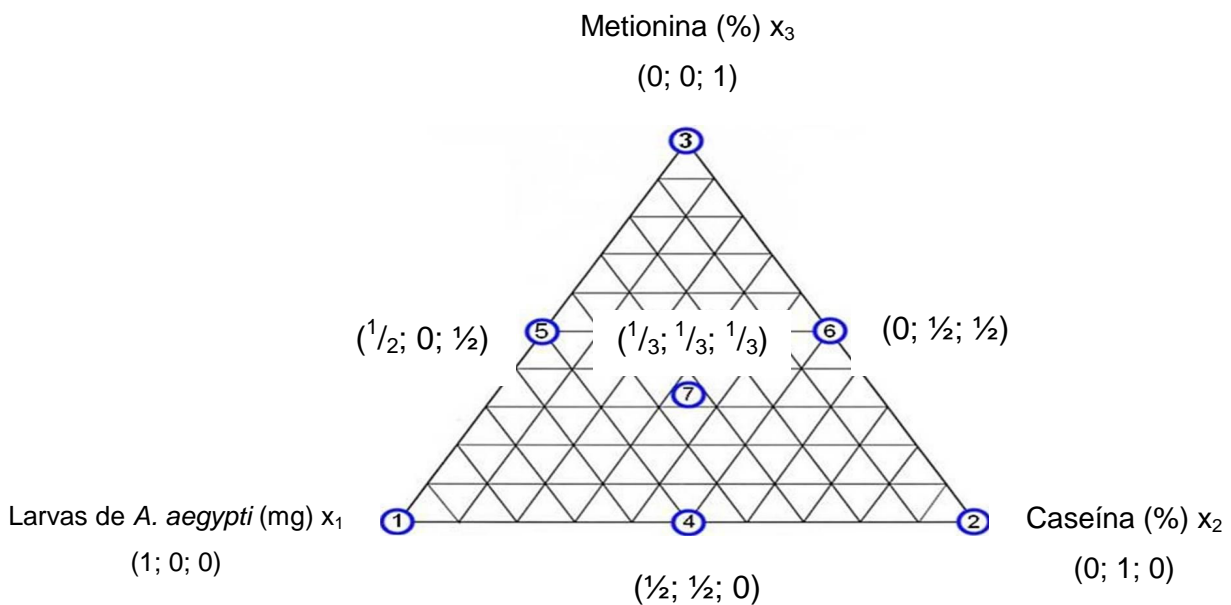
Alíquotas de 300 μL dos ELC liofilizados e concentrados 4 vezes foram incubados com 350 μL de tampão Tris-HCl 15 mM, pH 8 e 100 μL dos substrato específicos de proteases tipo subtilisina e tipo tripsina, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida e N-Benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida 1 mM, respectivamente, a 37°C por 1 hora (TIAGO et al., 2004). A reação foi interrompida pela adição de 250 μL de ácido acético 30% e centrifugada a 1250 xg por 15 minutos. A concentração do cromogênico p-nitroanilina do sobrenadante foi determinada por leitura de

absorvância em 410 nm e equação de regressão ($y = 0,0721x - 0,0034$; $R^2 = 0,9954$) obtida da curva de calibração construída com 1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *p*-nitroanilina. Uma unidade de atividade de protease tipo subtilisina e tipo tripsina foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μg de *p*-nitroanilina por mL de ELC nas condições da reação.

4.9.3 Descrição do delineamento de misturas e análise estatística

O delineamento para três componentes foi composto por 7 ensaios com 2 repetições no ponto central (figura 1).

Figura 1 - Delineamento experimental simplex-centroide para 3 componentes



Os valores dos níveis no delineamento de mistura e os valores reais referentes a cada nível encontram-se na Tabela 1.

Após a execução do experimento e coleta dos dados, fez-se o ajuste de uma equação polinomial, estimando os respectivos coeficientes das variáveis independentes através do modelo cúbico especial descrito na equação 1:

$$y = \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_i^{\circ} x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij}^{\circ} x_i x_j + \gamma_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 \quad (1)$$

onde o y representa a função resposta dos dados experimentais, x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes e correspondem à quantidade de larvas de *Aedes aegypti* (mg) e as porcentagens de caseína e metionina na mistura, respectivamente, e γ representa os parâmetros estimados (CORNELL, 2002).

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas no delineamento experimental de misturas simplex-centroide.

Ensaio	Mistura	Valores reais
1	(1; 0; 0)	(360mg; 0; 0)
2	(0; 1; 0)	(0; 1%; 0)
3	(0; 0; 1)	(0; 0; 0,5%)
4	($\frac{1}{2}$; $\frac{1}{2}$; 0)	(180mg; 0,5%; 0)
5	($\frac{1}{2}$; 0; $\frac{1}{2}$)	(180mg; 0; 0,25%)
6	(0; $\frac{1}{2}$; $\frac{1}{2}$)	(0; 0,5%; 0,25%)
7	($\frac{1}{3}$; $\frac{1}{3}$; $\frac{1}{3}$)	(120mg; 0,33%; 0,16%)
8	($\frac{1}{3}$; $\frac{1}{3}$; $\frac{1}{3}$)	(120mg; 0,33%; 0,16%)
9	($\frac{1}{3}$; $\frac{1}{3}$; $\frac{1}{3}$)	(120mg; 0,33%; 0,16%)
Controle	(0; 0; 0)	(0; 0; 0)

Para a análise dos dados foi utilizado o programa STATISTICS v. 9.0 e os modelos matemáticos ajustados, para cada resposta, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar o nível de significância, o coeficiente de determinação (R^2) e a falta de ajuste. A influência das variáveis foi visualizada através de gráficos de superfície de resposta e de otimização.

4.10 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram selecionadas 16 cepas de *B. bassiana* isolados de diferentes insetos hospedeiros e origens geográficas distintas, conforme mostra a Tabela 2. As cepas foram obtidas do Banco de Patógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Pragas do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Tabela 2 - Hospedeiro e origem das cepas de *Beauveria bassiana* utilizadas para a análise de polimorfismo em genes codificadores de proteases.

Isolados	Hospedeiro	Família	Origem
CG71	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lepidoptera: Pyralidae	PE-Brasil
CB64	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	RO-Brasil
CB66	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	SP-Brasil
CG481	<i>Diabrotica speciosa</i>	Coleoptera: Crysomelidae	BA-Brasil
CB35	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	BA-Brasil
CG138	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	PE-Brasil
UEL4	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
UEL54	<i>Diabrotica sp.</i>	Coleoptera: Crysomelidae	PR-Brasil
CG458	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Curculionidae	PR-Brasil
CB95	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	MT-Brasil
UEL55	Não identificado	Hemíptera	PR-Brasil
CG25	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lepidoptera: Noctuidae	DF-Brasil
CB102	solo		SP-Brasil
CB47	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Crysomelidae	SP-Brasil
CG425	<i>Rhammatocerus schistocercoides</i>	Orthoptera: Acrididae	MT-Brasil
CG432	Não identificado	Hemíptera: Membracidae	RN-Brasil

As cepas de *B. bassiana*, estocadas a -20°C, foram inicialmente repicadas em meio solidificado complexo otimizado por Alves (1998), incubado em estufa BOD a 26°C, em fotoperíodo de 12 horas por 10 dias ou até completa esporulação. Posteriormente, os esporos fúngicos produzidos por cada cepa foram utilizados no preparo de suspensões padronizadas 10^8 esporos mL⁻¹, conforme descrito no item 4.3. Foram inoculados 1% (v/v) da suspensão de esporos de cada cepa em meio líquido otimizado por Alves (1998) de modo a obter 10^6 esporos por mL de meio de cultura. Os cultivos foram mantidos a 28°C, sob agitação a 150 rpm por 5 dias (de acordo com o item 4.4).

O micélio do fungo obtido pela filtração à vácuo do meio de cultivo foi reduzido a pó em geral na presença de nitrogênio líquido. O pó resultante foi distribuído em tubos de microcentrífuga de 2 mL. Os extratos filtrados de cada cepa foram utilizados posteriormente para análise da atividade de proteases.

As células fúngicas presentes nos tubos de microcentrifuga foram homogeneizadas com 0,5 mL de tampão CTAB (CTAB 2%, PVP 1%, Tris-HCl 100 mM, EDTA 25 mM, e NaCl 1,4 mM), aquecidas a 80°C por 20 minutos e resfriadas em seguida em banho de gelo. Foi adicionado 1 µL de RNase 20 µg mL⁻¹ (Invitrogen) e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Adicionou-se 0,5 mL de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguido de homogeneização manual e centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm e 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos microtubos, acrescentando-se 0,6 volumes de isopropanol. As amostras foram incubadas por 1 hora a -20°C e posteriormente foram centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm e 4°C. Descartou-se os sobrenadantes e ao pellet foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 400 µL de etanol absoluto. Os tubos foram homogeneizados por inversão por aproximadamente 30 segundos e em seguida foram centrifugados por 10 minutos a 14000 RPM e 4°C. As suspensões obtidas foram lavadas com etanol 70%, secas a 60°C e ressuspensas com 50 µL de água ultrapura esterilizada. A presença e integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 0,9% por eletroforese, corado com brometo de etídeo visualizada em transiluminador sob luz ultravioleta.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA obtido da etapa anterior foi quantificado através de análise espectrofotométrica. Foram feitas diluições das amostras de DNA para leitura em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, utilizando-se cubeta de quartzo. Para cada amostra, foi feita a razão da densidade ótica (DO) lida em 260 nm pela DO lida em 280 nm para verificar a pureza do extrato ($1,8 \leq x \leq 2$), que pode ser prejudicada pela presença de solventes ou proteínas. Após a quantificação as amostras de DNA foram padronizadas, por diluição, em soluções contendo aproximadamente 20 ng µL⁻¹ e conservadas a -20°C.

4.12 AMPLIFICAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEASES

A sequência dos genes que codificam proteases (Pr1) de *B. bassiana* contendo 1335 pares de bases foi obtida da base de dados *on line* National Center

for Biotechnology Information (NCBI: www.ncbi.nih.gov) sob o número de acessos gi 1095250 (JOSHI; St. LEGER; BIDOCHKA, 1995). A partir da sequência foram desenhados os “primers” (DaniF forward: 5’ – TTGAGCCTGCTCCTCTCATCG – 3’ e DaniR reverse: 5’ – TGCCCTGTGCGAGATGCGAC – 3’) pelo programa BioEdit e utilizados para amplificação do gene da protease de *B. bassiana* via reação em cadeia da polimerase (PCR).

O processo de amplificação foi realizado com um volume final de 50 µL contendo: 1,5 µL de DNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados, estoque com 1,5 mM de cada base, Invitrogen), 5 µL de tampão 10X (Invitrogen, 10mM Tris-HCL pH 8,3), 4 µL de MgCl₂ (Invitrogen, 25 mM), 1 µL de cada “primer” a 20 pmol µL⁻¹ (Invitrogen), 2 µL de DNA molde (20 ng µL⁻¹), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5 U µL⁻¹) e 35,3 µL de H₂O ultrapura estéril, reação controle negativa também foi realizada. A mistura da reação foi submetida ao termociclador Life Express, BIOER.

A reação de amplificação seguiu-se com uma etapa de desnaturação inicial (94°C, 5 minutos), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento do iniciador (64°C, 1 minuto), extensão (72°C, 1 minuto) e extensão final (72°C, 1 minuto).

Após amplificação, 8 µL de cada amostra adicionados a 2 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,025% e glicerol 50%) foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% (90V por 1 hora) em tampão TBE 1X (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução), depois corado com brometo de etídio (1µg mL⁻¹) e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta. O marcador de tamanho molecular utilizado para comparação foi o 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). As amostras apresentaram uma banda no tamanho esperado de 400 pb e foram tratadas utilizando o kit PureLink™ PCR Purification (Invitrogen™) para a reação de sequenciamento.

4.13 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO NOS GENES CODIFICADORES DE PROTEASES

Os produtos de amplificação foram analisados quanto à existência de polimorfismo por meio do sequenciamento dos genes codificadores de proteases de 16 cepas de *B. bassiana*.

4.13.1 Quantificação dos produtos de amplificação e Reação de PCR para Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba-PR). Após a purificação, os fragmentos amplificados pela reação de PCR foram quantificados em espectrofotômetro a 260 nm NanoDrop 2000 Spectrofotometer (Thermo Scientific) para a reação de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems), em microplacas de 96 poços, utilizando o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism”, de acordo com as instruções do fabricante. Em cada reação, foram utilizados 10 ng de DNA ; 0,5 μ M do oligonucleotídeo iniciador 27f; 1 μ L do terminador Big Dye; 2 μ L de tampão Save Money [Tris-HCl 400 mM (pH 9) e $MgCl_2$ 10 mM] e água ultrapura estéril para 10 μ L de reação. As condições da PCR foram: 1 ciclo de 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação (96°C por 15 segundos), anelamento (58°C por 10 segundos) e extensão (60°C por 4 minutos).

4.13.2 Precipitação das reações de Sequenciamento

Após a amplificação, o DNA foi precipitado, adicionando-se 10 μ L de água ultrapura estéril, 2 μ L de acetato de amônio e 3x o volume de etanol absoluto a cada poço. Centrifugou-se a microplaca a 3.500 rpm e 20 °C, por 45 minutos (Centrífuga 5810 R, Eppendorf). Descartou-se o sobrenadante e secou-se a placa sobre papel absorvente. O DNA sedimentado foi lavado com 80 μ L de etanol 70%, centrifugando-se por mais 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se a placa secar à vácuo por 40 minutos e ressuspendeu-se o DNA com 10 μ L de formamida.

4.13.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems, German).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Artigo 1 intitulado: Indução de proteases extracelulares de *Beauveria bassiana* CG432. Elaborado conforme normas da revista *Biochemistry and Biotechnology Reports*.

Artigo 2 intitulado: Produção de proteases por *Beauveria bassiana* CG432 em cultivo submerso otimizado com diferentes agentes indutores utilizando um planejamento experimental de misturas. Elaborado conforme normas da revista *Process Biochemistry*.

Artigo 3 intitulado: Análise de Polimorfismo em genes codificadores de proteases em *Beauveria bassiana*. Elaborado conforme normas da revista *Brazilian Journal of Microbiology*.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

- Os agentes indutores que contribuíram para induzir uma maior atividade de proteases ($UP\ mL^{-1}$) pelo fungo *B. bassiana* CG432, como também, uma maior atividade específica desta enzima (UP/mg de proteína) foram a cutícula de cigarras e as larvas de *Aedes aegypti*, indicando que na presença de substratos proteicos mais complexos o fungo produz mais proteases.

- em todos os ensaios induzidos com larvas de *Aedes aegypti* foram produzidos proteases do tipo-subtilisina (Pr1), isso mostra que a produção desta enzima foi influenciada pela presença de cutícula no meio.

- O crescimento do fungo foi fortemente influenciado pela caseína presente no meio de cultivo, que contribuiu para a maior produção de biomassa.

- Ambos os indutores larvas de *Aedes aegypti*, caseína e metionina influenciaram no desenvolvimento do fungo, isto foi observado pelo aumento do teor de proteínas nos extratos fúngicos.

- Entre os 16 isolados de *B. bassiana* analisados quanto à presença de polimorfismos nos genes codificadores de proteases, foi observado a formação de dois grupos, sendo que essa variabilidade genética não foi correlacionada com a atividade de proteases, inseto hospedeiro e origem geográfica dos isolados do fungo.

O estudo sobre a indução de proteases por *B. bassiana* é importante, pois permite analisar os melhores agentes indutores e assim aumentar a produção da enzima de interesse. Como visto neste trabalho as larvas de *Aedes aegypti* foram os melhores agentes indutores de proteases, isto sugere que a cepa CG432 de *B. bassiana* poderá ser induzida em laboratório para posterior uso em bioensaios sobre o mosquito *Aedes aegypti*.

A análise de polimorfismos não mostrou um padrão polimórfico muito variado nos genes codificadores de proteases das 16 cepas de *B. bassiana*, indicando que mesmo a protease sendo um fator de virulência importante na penetração do fungo no inseto, talvez a virulência não esteja diretamente ligada a alterações na sequência dos genes que codificam proteases 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 (PCR em tempo real) visando compreender melhor o processo de infecção e conseqüentemente a virulência deste fungo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, 2ª edição, 1998.
- AMÓRA, S.S.A., BEVILAQUA, C.M.L., FEIJÓ, F.M.C., SILVA, M.A., PEREIRA, R.H.M.A, SILVA, S.C., ALVES, N.D., FREIRE, F.A.M., OLIVEIRA, D.M. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), a potential biological control agent of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). **Biological Control**, Brazil; n. 50, p. 329–335, 2009.
- ANDALÓ, V. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com Agrotóxicos Visando o Controle da Cochonilha-da-Raiz-do-Cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, Lavras – MG, v. 33, n. 4, p. 463-467, 2004.
- BIDOCHKA, M. J.; St. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 213-224, 1997.
- BIDOCHKA, M.J., 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**, Canada; v. 62, n. 1, p. 53-57, 1993.
- BIDOCHKA, M.J., KHACHATOURIANS, G.G. N-Acetyl-D-Glucosamine-Mediated Regulation of Extracellular Protease in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Canada; v. 54, n. 11, p. 2699-2704, 1988.
- 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.
- BUKHARI, T., TAKKEN, W., KOENRAADT, C.J.M. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. **Parasites & Vectors**, Wageningen; v. 4, n. 23, p. 1-14, 2011.
- CAMPOS, R.A., ARRUDA, W., BOLDO, J.D., 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.
- CARDOSO, D.C., MACHADO, A.C., VARÉA, G.S. Indução de proteases por *Beauveria bassiana* em cultivo submerso acrescido de cutícula de cigarras, *Cicada orni*. I SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, Londrina; Agosto, 2011.

CLARK, T.B., KELLEN, W.R., FUKUDA, T., LINDEGREN, J.E. Field and Laboratory Studies on the Pathogenicity of the Fungus *Beauveria bassiana* to Three Genera of Mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, Califórnia, n. 11, p. 1-7, 1968.

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.

CORNELL, J.A. Experiments with Mixtures: **Designs, Models and the Analysis of Mixture Data**. New York: John Wiley and Sons, 3rd edition, 2002.

CRUZ, M. C. B. **Produção de lipases por fermentação submersa suplementada com óleos vegetais e resíduo agroindustrial pelo fungo *Beauveria bassiana***. 2009. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 65p.

DELABONA, P.S.; FARINAS C.S.; LIMA, D.J.S. ; PRADELLA, J.G.C. Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. **Bioresource Technology** (2012), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.087>

DEMBILIO, O.; MORAGA, E.Q.; ÁLVAREZ, C.S.; JACAS, J.A. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, USA, v. 104, p. 214-221, 2010.

DHAR, P., KAUR, G. Production of cuticle - degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. **African Journal of Biochemistry Research**, Africa; v. 4, n. 3, p. 65-72, 2010.

DIAS, B.A., NEVES, P.M.O.J., MAIA, L.F., FURLANETO, M.C. Cuticle –Degrading Proteases Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil; n. 39, p. 301-306, 2008.

DONATTI, A.C., MAIA, F.L., FUNGARO, M.H.P., FURLANETO, M.C. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. **Current Microbiology**; v. 56, p. 256–260, Brasil, 2008.

DONG, Y., MORTON, J.C., RAMIREZ, J.L., SOUSA, J.A., DIMOPOULOS, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 126-132, 2012.

ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, n. 38, p. 367-372, 2002.

FARIA, M. R., MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência**, n. 22, p. 18-21, setembro/outubro, 2001.

FERSHT, A. The three-dimensional structure of enzymes. In: FERSHT, A. Enzyme structure and mechanism. **W. H. Freeman Company**, p. 3-32, 1977.

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.

GIESI, E.C.; DEKKER, R.F.H.; SCARMINIO, I.S.; BARBOSA, A.M.; SILVA, R. Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. **Biochemical Engineering Journal**, n. 53, p. 239–243, 2011.

GUPTA, R., BEG, Q.K., KHAN, S., CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**; India, n. 60, p. 381–395, 2002.

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

HARTREE, E.F. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

ITO, E.T., PEREIRA, G.V., MIYAGUI, D.T., PINOTTI, M.H.P., NEVES, P.M.O.J. Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brazil; v. 50, n. 2, p. 217-223, 2007.

JOSHI L.; St. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M. J. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, p. 211-217, 1994.

JOSHI, L.; St. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M. J. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, p. 211-218, 1995.

KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Essex, v. 35, n. 6, p. 539-550, 2000.

LEMONS, F.J.A., CAMPOS, F.A.P., SILVA, C.P., XAVIER-filho, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfaciatus* reared on cowpea *Vigna unguiculata* seeds. **Entomologia Experimental et Applicata**, v. 56, p. 219-227, 1990.

MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology**, Canada; v. 37, n. 2, p. 155 – 162, 1990.

MITINA, G.V., TOKAREV, Y.S., MOVILA, A.A., MATTILA, T.Y. Polymorphism of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) strains isolated from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Moldova. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.2, p. 50–54, 2011.

MOINO-Jr, A. Controle Microbiano de Pragas. In: VENSON, M., PAULA-Jr., T.J., PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, 22 ed. Minas Gerais: EPAMIG-CTZM, p. 43 – 69, 2006.

MOINO-Jr., A.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. **Journal of Applied Entomology**, 122, 301-305, 1998.

MONZÓN, A.J., GUHARAY, F., KLINGEN, I. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) populations in unsprayed coffee fields. **Journal of Invertebrate Pathology**, Norway; n. 97, p. 134–141, 2008.

MURO, M.A.; ELLIOTT, S.; MOORE, D.; PARKER, L.B.; SKINNER, M.; REID, W.; BOUHSSINI, M. Molecular characterization of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**, v. 109, p. 294-306, 2005.

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.

NEVES, P. M. O. J. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill no manejo integrado da broca-do-café *Hypothenemus Hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). In: VENSON, M., PAULA-Jr., T.J., PALLINI, A. **Tecnologias Alternativas para o Controle de Pragas e Doenças**, 22 ed. Minas Gerais: EPAMIG-CTZM, 2006, p. 138 – 139.

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.

OWNLEY, B.H., GRIFFIN, M.R., KLINGEMAN, W.E., GWINN, K.D., MOULTON, J.K., PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, USA; v. 28, p. 267–270, 2008.

PATERSON, L.C., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M., CLARKSON, J.M. Specific Induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p. 185-189, 1994.

- PATHAN, A.A.K., DEVI, K.U., VOGEL, H., REINEKE, A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. **Fungal Genetics and Biology**, Germany; n. 44, p. 1231–1241, 2007.
- PEDRINI, N., CRESPO, R., JUÁREZ, M.P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 146, p. 124–137, Argentina, 2007.
- PRAKASH, G.V.S.B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R.R.S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, n.99, p. 1530–1537, 2008.
- RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.
- RAO, Y.K., LU, S.C., LIU, B.L., TZENG, Y.M. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochemical Engineering Journal**, Taiwan; n. 28, p. 57–66, 2006.
- RIBEIRO R. A.; Polimorfismo do gene da subtilisina A do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Monografia (Bacharelado em Biomedicina)** - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2005. 45p.
- SAMUELS, R.I., PATERSON, I. C. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Great Britain; v. 110b, n. 4, p. 661-669, 1995.
- SANTOS, A.H., TAI, M.H.H., ROCHA, L.F.N., SILVA, H.H.G., LUZ, C. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, Brazil; n. 50, p. 37–42, 2009.
- SCHOLTE, E.J., KNOLS, B.G.J., SAMSON, R.A., TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **Journal of Insect Science**, n. 04, v. 19, p. 1-24, 2004.
- SCHOLTE, E.J., TAKKEN, W., KNOLS, B.G.J. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica**, Wageningen; n. 102, p. 151–158, 2007.
- SHANKAR, S., RAO, M., LAXMAN, R.S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria sp.* **Process Biochemistry**, India; n. 46, p. 579–585, 2011.
- STURMER, A.T., ITO, E.T., PEREIRA, G.V., MIYAGUI, D.T. Stability of proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Unopar Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina; v. 5/6, n. 1, p. 85-88, 2003/2004.

TIAGO, P.V.; FUNGARO, M.H.P.; FARIA, M.F.; FURLANETO, M.C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumoroseus* on protease activities, conidia production and virulence. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p. 335-339, 2004.

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.

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

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p. 42-43, 1956.

VU, V.H., HONG, S., KIM, K. Selection of Entomopathogenic Fungi for Aphid Control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Korea, v. 104, n. 6, p. 498–505, 2007.

XIAO, G.; YING, S.H.; ZHENG, P.; WANG, Z.L.; ZHANG, S.; XIE, X.Q.; SHANG, Y.; St.-LEGER, R.J.; ZHAO, G.P.; WANG, C.; FENG, M.G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, China, v. 2, n. 483, p. 1- 10, 2012.

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: Indução de proteases extracelulares de *Beauveria bassiana* CG432

Proteases extracelulares de *Beauveria bassiana* CG432 induzidas por larvas de *Aedes aegypti* e outros substratos indutores

Danielle Cardoso Gimenes¹; Thaís Dolfini Alexandrino¹; Alana Carvalho Machado¹;
Geni da Silva Varéa^{1*}

¹ Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr.

*Autor para correspondência: genivarea@uel.br

RESUMO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* penetra na cutícula de insetos por ação de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteases, lipases e quitinases. As proteases podem ser induzidas em cultivos submersos na presença de indutores de natureza proteica. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar a produção de proteases de *B. bassiana* CG432 em cultivo submerso em meio mínimo de Vogel suplementado com cutícula de cigarras, larvas de *Aedes aegypti*, caseína, quitina, gelatina, ureia e os aminoácidos metionina, prolina, alanina e glicina como substratos indutores. O inóculo continha 10⁶ esporos e o cultivo foi conduzido a 28°C, 200 rpm durante 5 dias. Extratos enzimáticos obtidos pela centrifugação foram analisados quanto ao teor de proteínas, produção de biomassa e atividade de proteases. Dos substratos analisados nos meios de cultura, a cutícula de cigarras, as larvas de *A. aegypti* e a caseína apresentaram maior atividade de proteases e, entre os aminoácidos, a metionina foi que apresentou melhor resultado. Entre esses indutores a cutícula e as larvas foram os que induziram maior atividade específica da enzima e a caseína contribuiu para o maior crescimento da biomassa fúngica.

Palavras chave: *Beauveria bassiana*, proteases, indução.

1 INTRODUÇÃO

O fungo *B. bassiana* tem aplicação no controle biológico de insetos com grande potencial para o controle no desenvolvimento de populações de insetos sugadores que causam sérios prejuízos à produção de alimentos de origem vegetal (OWNLEY et al., 2008) e animal (KAAYA, HASSAN, 2000) e provocam doenças em humanos como o mosquito transmissor da dengue (DONG et al., 2012). Sua ação bioinseticida ocorre devido à liberação de enzimas como quitinases, lipases e especialmente proteases, produzidas em resposta à constituição da cutícula do inseto (GUPTA et al., 1992).

O interesse por este fungo se deve a sua fácil obtenção, por ser uma alternativa ao uso de inseticidas químicos, contribuem para a diminuição da poluição ambiental, apresentam especificidade sobre determinados insetos e não promovem desenvolvimento de resistência nos mesmos, como ocorre com inseticidas químicos (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos podem diversificar a produção de fatores de virulência em resposta a diferentes insetos. Cutícula de insetos, como a traça *Galleria mellonella* (GUPTA et al., 1992), carrapatos *Boophilus microplus* (CAMPOS et al., 2005), broca do café *Hypothenemus hampei* (DIAS et al., 2008), gafanhotos *Rhammatocerus schistocercoides* (DONATTI et al., 2008) já foram estudados, como substratos indutores, a fim de aumentar o teor de proteínas e, conseqüentemente, a produção de proteases extracelulares, para facilitar o estudo da estrutura e cinética dessas enzimas e correlacionar com os níveis de virulência da cepa fúngica nos bioensaios em insetos.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência dos indutores: cutícula de cigarras *Cicada orni*, larvas de *A. aegypti*, caseína, quitina, gelatina, uréia, metionina, glicina, alanina e prolina na produção de proteases por *B. bassiana* CG432.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ativação e preparo do inóculo

Suspensões contendo esporos do fungo *B. bassiana* cepa CG432 foram ativadas em meio de cultura solidificado otimizado por Alves (1998) constituído por 0,2 g de ágar, 10 g de D-glucose anidra, 5 g de extrato de levedura, 1,58 g de NaNO₃, 1,05 g de Na₂HPO₄.7H₂O, 1 g de KCl, 0,6 g de MgSO₄.7H₂O e 0,36 g de KH₂PO₄, água para 1 litro, incubado em estufa BOD a 26 °C em fotoperíodo de 12 horas por 10 dias ou até completa esporulação. Estes esporos recém ativados foram utilizados para preparar uma suspensão com aproximadamente 10⁸ esporos mL⁻¹ em salina fisiológica contendo 0,01% de Tween 80.

2.2 Produção de enzimas em cultivos submersos

Os cultivos do fungo *B. bassiana* foram feitos em meio submerso inoculados com 10⁶ esporos mL⁻¹ e conduzidos em triplicata utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 12,5 mL de meio mínimo de Vogel (1956) com 1% de glicose, à temperatura de 28 °C e agitação a 200 rpm em Incubadora Orbital (Shaker MA 420 Marconi). Para indução de proteases, os meios foram suplementados com 0,4% de uréia (Sigma); 0,5% dos aminoácidos glicina, alanina, prolina e metionina (Merck); 0,5 e 1% de gelatina (Acros organics, cod. 410875000); 1% de caseína (Riedel); 2% de quitina coloidal (Sigma); 0,5 e 1% de cutícula de cigarras (Homóptera: Cicadidae); aproximadamente 1% (150 mg) de larvas de *A. aegypti* (Diptera: Culicidae).

Cutículas de cigarras foram previamente tratadas em solução de tetraborato de sódio 1%, dessecadas em estufa a 37 °C e moídas em gral de porcelana (PATERSON et al., 1994; PATHAN et al., 2007). As larvas de *A. aegypti* foram sacrificadas em salina concentrada 10 vezes, filtradas a vácuo, secas em estufa a 60 °C por 20 minutos e mantidas a - 20 °C.

Todos os cultivos foram interrompidos no quinto dia para obtenção de proteases, utilizando filtração a vácuo em banho de gelo seguida por centrifugação a 8.000 xg por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram dialisados contra tampão TRIS-HCl 5 mM, pH 7,0 e os extratos livres de células (ELC) utilizados para determinação do teor de proteínas e da atividade enzimática. Paralelamente, foram realizados cultivos controle sem adição de indutores contendo 1% de glicose como única fonte de carbono e um cultivo estéril para cada condição estudada.

2.3 Determinação de atividade de protease

A atividade de proteases no ELC foi determinada segundo a técnica de Lemos et al. (1990). Alíquotas de 200 µL dos extratos enzimáticos foram adicionadas a 200 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 e a 100 µL albumina de soro bovino (ASB) 12,5 mg mL⁻¹. A reação foi interrompida, após incubação em Banho Maria a 37 °C por 1 hora, pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) gelado a 10%, seguida de centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos.

Os peptídeos solúveis presentes no sobrenadante foram determinados pelo método de Hartree (1972) com base na equação de regressão $y = 0,002x - 0,0027$ ($R^2 = 0,9976$), obtida da curva de calibração com concentrações de 20 a 200 µg mL⁻¹ de ASB.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades de Protease (UP), onde 1UP foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de peptídeos solúveis pela ação da protease, por mL do extrato, nas condições da reação.

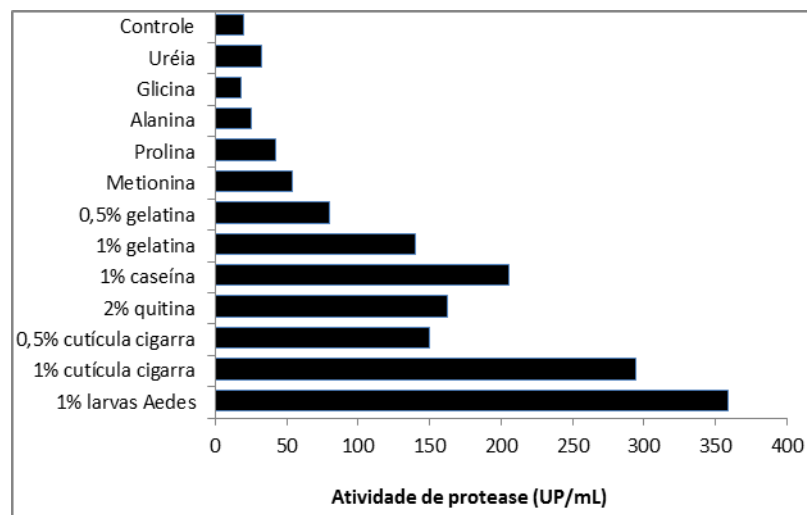
2.4 Quantificação de proteínas e biomassa

Foi realizada a quantificação das proteínas (µg mL⁻¹) presentes nos ELC pelo método de Bradford (1976), com base na equação de regressão $y = 0,0045 + 0,0633x$ ($R^2 = 0,9987$), obtida da curva de calibração com concentrações de 50 a 200 µg mL⁻¹ de ASB. O crescimento do fungo foi avaliado pela quantificação da biomassa por gravimetria a 80 °C até peso constante.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de proteases (UP mL⁻¹) nos cultivos suplementados de *B. bassiana* CG432, ocorreu em quantidades variadas para os diferentes agentes indutores testados, sendo que o uso da maioria deles, contribuiu para o aumento da produção de proteases, isto é visualizado pelo aumento da atividade da enzima, em relação ao cultivo controle. Os resultados podem ser observados na figura 1, indicando que os ELC suplementados com todos os agentes indutores, com exceção da glicina, apresentaram maior produção de proteases, sendo que a uréia e os aminoácidos alanina e prolina induziram menor produção de proteases em relação aos demais indutores, com os resultados de atividade 1,6; 1,2; 2,2 vezes superiores ao resultado do cultivo controle. Campos et al. (2005) observaram que a adição do aminoácido alanina ao meio de cultivo do fungo *B. bassiana* reprimiu a atividade da protease Pr1, e essa enzima foi induzida quando o meio de cultivo foi suplementado com cutículas de *H. hampei*.

Figura 1 – Atividade de proteases dos extratos enzimáticos produzidos por *Beauveria bassiana* CG432 em cultivo submerso em meio de Vogel suplementado com diferentes indutores.



Os maiores valores de atividade de proteases (UP mL⁻¹) obtidos foram dos cultivos suplementados com 1% de larvas de *A. aegypti* e 1% de cutícula de cigarras sendo, aproximadamente, 18 e 15 vezes superiores ao cultivo controle, respectivamente. Isso indica que o fungo produziu mais proteases na presença de substratos mais complexos. De acordo com Bidochka; St. Leger e Roberts (1997), as proteínas são os principais constituintes da procutícula dos insetos (61%) e devido a isso, proteases extracelulares são

produzidas pelo fungo *B. bassiana* em resposta a constituição da cutícula do inseto hospedeiro.

A presença de 1% de larvas de *A. aegypti* no meio de cultivo induziu maior produção de proteases, visto pelo aumento na atividade da enzima (359 UP mL^{-1}), em relação a 1% de cutícula de cigarras ($294,42 \text{ UP mL}^{-1}$), figura 1. Essa diferença na indução da enzima pode ser devido a componentes da hemolinfa das larvas e também por diferenças nos polímeros constituintes de cada cutícula. Considerando que as larvas são muito pequenas, o tratamento para a extração da cutícula foi menos eficiente que para as cigarras. Os componentes proteicos da hemolinfa de *A. aegypti* provavelmente induziram maior produção de proteases. Nos trabalhos realizados por Pathan et al. (2007) e Wang; Gang e St. Leger (2005) foi observado que os fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meios de cultivo suplementados com cutículas de insetos e hemolinfa apresentaram maior expressão dos genes de proteínas responsáveis pelo crescimento dos fungos.

A suplementação com 1% de caseína também apresentou maior produção de proteases, com resultado de atividade da enzima de $205,8 \text{ UP mL}^{-1}$, correspondente a, aproximadamente, 10,4 vezes superior a encontrada no cultivo controle (figura 1). A caseína é uma fosfoproteína que contém um grande número de resíduos de prolina que não interagem em suas cadeias laterais e não possui ponte de dissulfeto (KUNZ; LONNERDAL, 1990). Esse resultado sugere que a caseína é um substrato facilmente clivado pelas proteases no meio possibilitando ao fungo os nutrientes necessários para o seu crescimento e, conseqüentemente, uma maior produção dessa enzima.

A adição de 2% de quitina induziu a produção de proteases, visualizado no resultado da atividade enzimática de $162,52 \text{ UP mL}^{-1}$, sendo, aproximadamente, 8 vezes superior ao resultado do cultivo controle (figura 1). A quitina é um polissacarídeo constituído por um polímero de cadeia longa de N-acetilglicosamina, sendo o principal componente da parede celular dos fungos. Dhar e Kaur (2010) observaram a indução de proteases Pr1 em cultivos contendo 2% de quitina como agente indutor. Segundo esses autores, a produção de proteases pode ser induzida por substâncias poliméricas como os constituintes da cutícula de insetos, e a quitina, sendo o principal constituinte, aumenta a produção de proteases Pr1 possivelmente por ser um agente indutor dessa protease, ou por ser incapaz de produzir repressão catabólica.

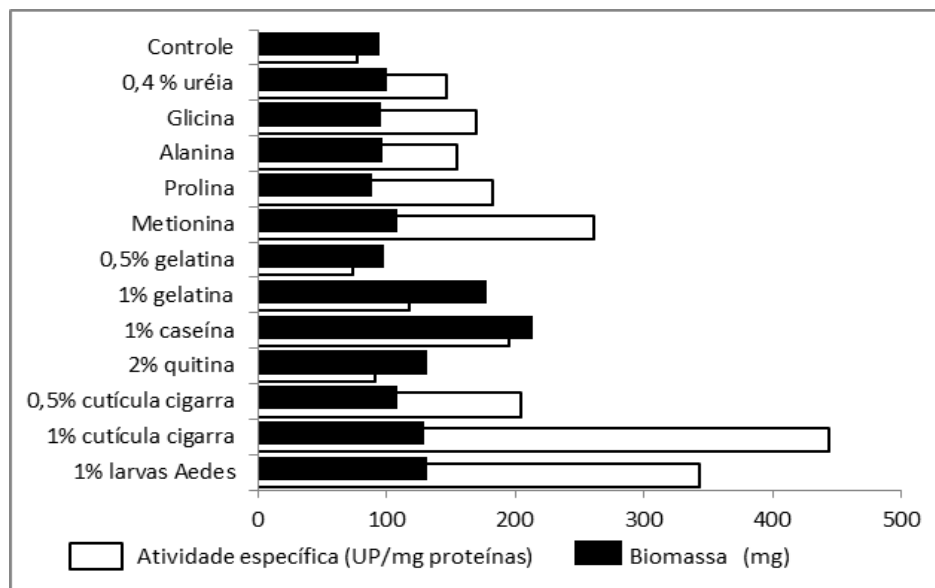
Nos cultivos de *B. bassiana* suplementados com 0,5 e 1% de gelatina houve indução de proteases, como mostra na figura 1, a atividade de proteases foi, aproximadamente, 4 e 7 vezes superiores em relação ao resultado do controle, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Urtz e Rice (2000) que observaram maior atividade de proteases ($15,5 \text{ UP mL}^{-1}$) por *B. bassiana* (isolado ARSEF 149) em meios de cultivos suplementados com gelatina 1%.

Dos cultivos suplementados com aminoácidos, a adição de 0,5% de metionina foi a que mais contribuiu para a produção de proteases (54 UP mL^{-1}), sendo, aproximadamente, 3 vezes superior ao resultado do cultivo controle (figura 1). Esses resultados estão de acordo com Donatti et al. (2008) que encontraram maiores níveis na produção de protease Pr1 ($193,5 \text{ UP mL}^{-1}$), por *B. bassiana* cepa CG425, em meios suplementados com 0,5% de metionina. Esses autores relataram que o aminoácido metionina parece desempenhar um papel regulador na produção de protease Pr1 por *B. bassiana* e também foi observado que tanto a indução como a repressão desta enzima pode ser dependente da concentração de metionina presente no meio de cultura.

A análise da atividade específica de proteases, obtida nos cultivos suplementados, indicou que 1% de cutícula de cigarras e 1% de larvas de *A. aegypti* induziram uma maior atividade específica de protease, em relação aos outros indutores e ao cultivo controle, (figura 2).

Os cultivos suplementados com 1% de caseína e 1% de gelatina apresentaram maior crescimento de biomassa fúngica em relação aos demais, como mostra a figura 2.

Figura 2 – Atividade específica de proteases e biomassa dos extratos enzimáticos produzidos por *B. bassiana* CG432 em cultivo submerso em meio de Vogel suplementado com diferentes indutores.



Os cultivos de *B. bassiana* CG432 que apresentaram maior atividade específica de proteases, quando enriquecidos com cutícula de cigarras e larvas de *A. aegypti*, concordam com outros trabalhos da literatura (GUPTA et al., 1992; CAMPOS et al., 2005; DIAS et al., 2008; DONATTI et al., 2008), nos quais houve maior produção de proteases Pr1 e Pr2 em cultivos de *B. bassiana* suplementados com cutícula de diferentes insetos.

Essa especificidade enzimática deve-se ao fato de que os fungos entomopatogênicos podem diversificar a produção de fatores de virulência em resposta aos polímeros constituintes da cutícula de diferentes insetos. A produção de enzimas proteolíticas, em especial uma endoprotease subtilisina designada Pr1, é um fator de virulência essencial para a germinação dos esporos fúngicos e propagação das hifas na cutícula de insetos (MOINO-Jr; ALVES; PEREIRA, 1998).

A caseína e a gelatina foram os indutores que mais contribuíram para o crescimento do fungo, pois são proteínas simples e acessíveis no meio de cultura, com estrutura pouco complexa (KUNZ; LONNERDAL, 1990), facilitando a clivagem por proteases extracelulares e dessa forma, proporcionando ao fungo os nutrientes necessários para o seu crescimento.

Para o uso do fungo *B. bassiana* no controle biológico de insetos praga é importante se utilizar uma cepa com alta virulência, ou seja, que possua maior capacidade de produzir proteases com atividade específica para hidrolisar a cutícula de insetos, dentre outras enzimas (quitinases e lipases), os indutores larvas de *A. aegypti* e cutícula de cigarras contribuíram para essa resposta. A maior produção de biomassa, em cultivos suplementados com caseína e gelatina, é interessante, pois quanto maior a massa fúngica produzida, maior vai ser a capacidade do fungo de eliminar os insetos praga.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os agentes indutores que contribuíram para induzir uma maior atividade de proteases e atividade específica pelo fungo *B. bassiana* CG432 foram as larvas de *A. aegypti*, a cutícula de cigarras e a caseína. Entre os aminoácidos, a metionina foi que apresentou melhor resultado. A caseína contribuiu para o maior crescimento da biomassa fúngica. Esses dados poderão ser utilizados em estudos posteriores aplicando metodologias estatísticas tais como metodologia de superfície de resposta e otimização para se obter resultados ainda mais satisfatórios sobre os melhores indutores e concentrações para a produção de proteases por *B. bassiana* CG432.

O estudo sobre a indução de proteases é importante, pois permite analisar os melhores agentes indutores e assim aumentar a produção da enzima de interesse. Como visto neste trabalho as larvas de *A. aegypti* foram um dos melhores agentes indutores de proteases, isto sugere que a cepa CG432 de *B. bassiana* poderá ser induzida em laboratório para posterior uso em bioensaios sobre o mosquito *A. aegypti*.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: à CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado e a CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica; ao professor Dr. Pedro M. O. J. Neves pelo fornecimento da cepa de *Beauveria bassiana* CG432; ao professor Dr. Carlos Eduardo pelo fornecimento das cigarras; ao professor Dr. João Zequi pelo fornecimento das larvas de *Aedes aegypti* e ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, 2ª edição, 1998.
- BIDOCHKA, M. J.; St. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 213-224, 1997.
- 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.D., 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.
- DHAR, P., KAUR, G. Production of cuticle - degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. **African Journal of Biochemistry Research**, Africa; v. 4, n. 3, p. 65-72, 2010.
- DIAS, B.A., NEVES, P.M.O.J., MAIA, L.F., FURLANETO, M.C. Cuticle –Degrading Proteases Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil; n. 39, p. 301-306, 2008.
- DONATTI, A.C., MAIA, F.L., FUNGARO, M.H.P., FURLANETO, M.C. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. **Current Microbiology**; v. 56, p. 256–260, Brasil, 2008.
- DONG, Y., MORTON, J.C., RAMIREZ, J.L., SOUSA, J.A., DIMOPOULOS, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 126-132, 2012.
- GUPTA, S.C., LEATHERS, T.D., SAYED, G.N.E, IGNOFFO, C. M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, USA, v.16, p.132-137, 1992.
- HARTREE, E.F. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

- ITO, E.T., PEREIRA, G.V., MIYAGUI, D.T., PINOTTI, M.H.P., NEVES, P.M.O.J. Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brazil; v. 50, n. 2, p. 217-223, 2007.
- KAAYA, G., HASSAN, S. Entomogenous Fungi as Promising Biopesticides for Tick Control. **Experimental & Applied Acarology**; v. 24, n. 12, p. 913-926, 2000.
- KUNZ, C., LONNERDAL, B. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. **The American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v. 51, p. 37-46, 1990.
- LEMOES, F.J.A., CAMPOS, F.A.P., SILVA, C.P., XAVIER-filho, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfaciatus* reared on cowpea *Vigna unguiculata* seeds. **Entomologia Experimental et Applicata**, v. 56, p. 219-227, 1990.
- MOINO-Jr., A.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. **Journal of Applied Entomology**, 122, 301-305, 1998.
- OWNLEY, B.H., GRIFFIN, M.R., KLINGEMAN, W.E., GWINN, K.D., MOULTON, J.K., PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, USA; v. 28, p. 267–270, 2008.
- PATERSON, L.C., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M., CLARKSON, J.M. Specific Induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p. 185-189, 1994.
- PATHAN, A.A.K., DEVI, K.U., VOGEL, H., REINEKE, A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. **Fungal Genetics and Biology**, Germany; n. 44, p. 1231–1241, 2007.
- SAMUELS, R.I., PATERSON, I. C. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Great Britain; v. 110b, n. 4, p. 661-669, 1995.
- URTZ, B.E., RICE, W. C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, United Kingdom; v. 2, n. 104, p. 180-186, 2000.
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p. 42-43, 1956.
- WANG, C., GANG, H., St. LEGER, R.J. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 704 – 718, 2005.

ANEXO B

Artigo 2: Produção de proteases por *Beauveria bassiana* CG432 em cultivo submerso otimizado com diferentes agentes indutores utilizando um planejamento experimental de misturas.

Produção de proteases por *Beauveria bassiana* CG432 em cultivo submerso otimizado com diferentes agentes indutores utilizando um planejamento experimental de misturas

Danielle Cardoso Gimenes¹, Dionísio Borsato², Geni da Silva Varéa^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Caixa Postal 6001, Brasil

² Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Caixa Postal 6001, Brasil

*Autor para correspondência gpvarea@uel.br Centro de Ciências Exatas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, CEP 86051-990, Caixa Postal 6001, telefone (43) 33714270.

RESUMO

Beauveria bassiana é um entomopatógeno que apresenta potencial no controle de insetos-praga causadores de prejuízos para a produção de alimentos e vetores de doença como a dengue. O mecanismo de infecção envolve a produção de enzimas extracelulares que degradam a cutícula do inseto. As proteínas são os principais constituintes da procutícula dos insetos e as proteases desempenham um importante papel na penetração cuticular. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência dos agentes indutores: larvas de *Aedes aegypti*, caseína e metionina no meio de cultivo para a produção de proteases por *B. bassiana*, utilizando um delineamento de misturas composto por 7 ensaios com 2 repetições no ponto central. O micro-organismo foi cultivado em meio de Vogel suplementado com os indutores e inoculado a 10^6 esporos mL^{-1} , mantido a 28 °C, 150 rpm, por 5 dias. Extratos enzimáticos obtidos pela centrifugação foram analisados quanto à atividade de proteases e atividade específica, ao teor de proteínas, produção de biomassa e especificidade da enzima. Entre os indutores analisados, as larvas de *Aedes aegypti* contribuíram para uma maior atividade de proteases, como também da atividade específica desta enzima, a caseína aumentou a produção de biomassa fúngica e a adição dos três indutores aumentou o teor de proteínas. Em todos os ensaios contendo larvas de *Aedes aegypti* foi observado a produção de proteases tipo- Pr1.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, proteases, indução, delineamento simplex-centróide, *Aedes aegypti*.

1. Introdução

O fungo *Beauveria bassiana*, pertencente à classe Ascomycetes e família Cordycipitaceae, é o mais isolado de insetos praga na natureza. Esse fungo mostra grande potencial para o controle do desenvolvimento de populações de insetos sugadores que causam sérios prejuízos à produção de alimentos de origem vegetal e animal e doenças em humanos, como o mosquito transmissor da dengue [1,2, 3, 4].

Há uma preocupação mundial com relação ao mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) como vetor de epidemias urbanas como a dengue, dengue hemorrágica e febre amarela. Em bioensaios laboratoriais já foi demonstrado que fungos entomopatogênicos são eficazes no combate aos ovos, larvas e mosquitos adultos de *A. aegypti* [5, 6, 7,8]. Apesar de ainda serem necessários mais estudos de campo, o fungo *B. bassiana* tem se mostrado eficaz no combate a esse mosquito vetor.

No processo infeccioso, o fungo penetra na cutícula do inseto hospedeiro principalmente por ação de enzimas extracelulares produzidas em resposta a constituição da cutícula do inseto. Essas enzimas são capazes de hidrolisar os polímeros constituintes do exoesqueleto, garantindo ao fungo os nutrientes necessários para o seu crescimento. Um dos principais constituintes da cutícula dos insetos são as proteínas e, sabe-se que, as proteases produzidas por *B. bassiana* são fatores de virulência que desempenham um importante papel na penetração cuticular [9,10,11,12].

A produção de proteases extracelulares por *B. bassiana* é fortemente influenciada por componentes do meio de cultivo, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, fatores físicos e químicos como temperatura, pH, densidade de inóculo,

oxigênio dissolvido e tempo de incubação [13,14,12]. Devido a esses vários fatores que influenciam o crescimento do fungo e a sua produção de enzimas, é conveniente a aplicação de metodologias estatísticas, tais como o delineamento fatorial, de misturas e metodologia de superfície de resposta, que permitem verificar a importância de vários fatores relacionados às condições de produção [15].

A metodologia de delineamento de misturas é uma importante área dentro da estatística aplicada e pode ser entendida como a variação da metodologia no cálculo de superfícies de resposta para modelar, simular e otimizar determinada propriedade de uma mistura em função de seus componentes. Neste modelo, dois ou mais componentes são misturados em proporções variadas e as características dos produtos resultantes são registradas. As respostas dependem somente das proporções dos componentes presentes na mesma [16].

Ainda não há estudos com aplicação do delineamento de misturas para a análise da produção de enzimas pelo fungo *B. bassiana*. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência da adição dos agentes indutores: larvas de *Aedes aegypti*, caseína e metionina, ao meio de cultivo para a produção de proteases pelo fungo *B. bassiana*, utilizando como ferramenta um delineamento de misturas.

2. Material e Métodos

Utilizou-se um planejamento experimental de misturas simplex-centróide para avaliar a influência da adição de agentes indutores: larvas de *Aedes aegypti* (x_1), caseína (x_2) e metionina (x_3) sobre a produção de proteases, analisado pela atividade de proteases (UP/ mL) e sua atividade específica (UP/ mg de proteína), crescimento do fungo através do peso da biomassa (mg) e teor de proteínas ($\mu\text{g/ mL}$), quando esses indutores foram adicionados ao meio de cultivo.

2.1 Condições de cultivo do fungo *Beauveria bassiana* CG 432

O fungo *B. bassiana* CG432 foi cultivado em meio mínimo de Vogel [17] com 1% de glicose e suplementado com os agentes indutores (variáveis independentes x_1 , x_2 e x_3). Foram adicionados 30 mL de meio de cultura em frascos de erlenmeyer de 125 mL, esterilizados e inoculados 10^6 conídios/ mL. O cultivo foi realizado a 28 °C, sob agitação a 150 rpm, durante 5 dias. Paralelamente foi realizado cultivo controle, sem adição de indutores, contendo glicose a 1% como única fonte de carbono. Os valores reais das variáveis independentes: larva de *Aedes aegypti* (x_1), caseína (x_2) e metionina (x_3) adicionados ao meio de cultura encontra-se na Tabela 1.

2.2 Análise da atividade de protease, quantificação do teor de proteínas e biomassa

Os cultivos foram interrompidos por filtração a vácuo em papel de filtro e centrifugados a 8000 xg, por 20 min, a 4 °C. Dos extratos fúngicos obtidos foram utilizados 200 µL de cada ensaio (em triplicata) para a determinação da atividade de proteases, utilizando 100 µL do substrato albumina de soro bovino (12,5 mg/ mL) em 200 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 e incubados durante 1 h a 37 °C. As proteínas não degradadas por ação das proteases presentes no extrato foram precipitadas com 250 µL de ácido tricloroacético (TCA), gelado, a 10% e separadas por centrifugação a 3000 rpm por 15 min [18]. Os peptídeos solúveis presentes no sobrenadante foram determinados pelo método de Hartree [19] com base na equação de regressão $y = 0,0019 X + 0,0052$ ($R^2 = 0,9992$), obtida da curva de calibração com concentrações de 20 a 200 µg /mL de albumina de soro bovino. Uma unidade de atividade das proteases (UP) foi determinada como µg de peptídeos solúveis liberados por mL de extrato fúngico nas condições da reação.

Foi realizada a quantificação das proteínas ($\mu\text{g/ mL}$) presentes nos extratos fúngicos pelo método de Bradford [20], com base na equação de regressão $y = 0,0032x + 0,0289$ ($R^2 = 0,9982$) obtida da curva de calibração com concentrações de 20 a 100 $\mu\text{g/ mL}$ de albumina de soro bovino.

O crescimento do fungo foi avaliado pela quantificação da biomassa por gravimetria a 80 °C até peso constante.

2.3 Delineamento Experimental de Misturas

O delineamento para três componentes foi composto por 7 ensaios com 2 repetições no ponto central (figura 1).

Após a execução do experimento e coleta dos dados, fez-se o ajuste de uma equação polinomial, estimando os respectivos coeficientes das variáveis independentes através do modelo cúbico especial descrito na equação 1:

$$y = \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_i^{\circ} x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij}^{\circ} x_i x_j + \gamma_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 \quad (1)$$

onde o y representa a função resposta dos dados experimentais, x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes que correspondem à quantidade de larvas de *Aedes aegypti* (mg) e as porcentagens de caseína e metionina na mistura, respectivamente, e γ representa os parâmetros estimados [16].

Para a análise dos dados foi utilizado o programa STATISTICS v. 9.0 e os modelos matemáticos ajustados, para cada resposta, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar o nível de significância, o coeficiente de determinação (R^2) e a falta de ajuste. A influência das variáveis foi visualizada através de gráficos de superfície de resposta e de otimização.

2.4 Especificidade das proteases

Alíquotas de 300 µL dos extratos fúngicos liofilizados e concentrados 4 vezes foram incubados com 350 µL de tampão Tris-HCl 15 mM, pH 8 e 100 µL dos substrato específicos de proteases tipo- subtilisina e tipo-tripsina, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida e N-Benzoil-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilida 1 mM, respectivamente, a 37 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de ácido acético 30% e centrifugada a 1250 xg por 15 min [21].

A concentração do cromogênico *p*-nitroanilina do sobrenadante foi determinada por leitura de absorvância em 410 nm e equação de regressão ($y = 0,0721x - 0,0034$; $R^2 = 0,9954$) obtida da curva de calibração construída com 1 a 10 µg/mL de *p*-nitroanilina. Uma unidade de atividade de protease tipo subtilisina e tipo-tripsina foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de *p*-nitroanilina por mL de extrato fúngico nas condições da reação.

3. Resultados

A partir do delineamento de misturas foram obtidas quatro respostas: produção de proteases, visto pela atividade da enzima (UP/ mL) e sua atividade específica (UP/ mg de proteína), biomassa (mg) e teor de proteínas (µg/ mL), junto a este modelo estatístico foi realizado um cultivo controle (tabela 1).

Os modelos ajustados para as respostas protease (y_1), atividade específica (y_2), biomassa (y_3) e teor de proteínas (y_4) estão apresentados nas equações a seguir onde os termos com asteriscos são significativos em nível de 5%.

$$y_1 = 583,2 * x_1 + 199,2 * x_2 + 27x_3 + 511,2x_1x_2 - 1128,4 * x_1x_3 + 2567,6 * x_2x_3 - 5854,8 * x_1x_2x_3 \quad (1)$$

$$y_2 = 356,40 * x_1 + 66,40 x_2 + 58,91 x_3 - 225,33x_1x_2 - 719,25 * x_1x_3 + 786,10 * x_2x_3 - 1458,95x_1x_2x_3 \quad (2)$$

$$y_3 = 131,4 * x_1 + 213,8 * x_2 + 108,6 * x_3 - 116,4 * x_1x_2 - 5,6 x_1x_3 + 22,4 x_2x_3 + 1177,2 * x_1x_2x_3 \quad (3)$$

$$y_4 = 1,63 * x_1 + 3 * x_2 + 0,4583 * x_3 + 4,115 * x_1x_2 - 0,8852x_1x_3 + 4,7354 * x_2x_3 + 12,3771 * x_1x_2x_3 \quad (4)$$

A análise de variância para as respostas protease (y_1), atividade específica (y_2), biomassa (y_3) e teor de proteínas (y_4), mostrou que os modelos apresentaram coeficiente de determinação ajustados de 0,9937; 0,9949; 0,9950 e 0,9985, respectivamente. Apesar da falta de ajuste ser significativa para quase todas as respostas quando se eliminou os termos de interação ternária (exceto a resposta y_2 – atividade específica $p = 7,04\%$), os modelos ajustados para todas as respostas foram significativos em nível de 2% indicando que eles podem ser utilizados para fins preditivos.

A produção de proteases (UP/ mL), representada pela função resposta y_1 (equação 1), foi influenciada positivamente pelas variáveis larvas de *Aedes aegypti* (x_1), caseína (x_2) e as interações caseína e metionina (x_2x_3), sendo que esta última exerceu a maior influência na produção de proteases. Como pode ser visto na tabela 1 e ensaio nº 6 a maior atividade de proteases (755 UP/mL) pelo fungo *B. bassiana* deve-se ao cultivo suplementado com ambos os indutores: caseína e metionina sendo, neste caso, a atividade enzimática 16 vezes maior que no cultivo controle. Em seguida, o meio de cultivo suplementado apenas com larvas de *Aedes aegypti* (tabela 1, ensaio nº1) apresentou a segunda maior atividade de proteases (583,2 UP/mL), indicando que apenas a variável x_1 suplementando o meio de cultivo, atua como um bom indutor na produção de proteases. Apesar da interação larva de *A. aegypti* e caseína (x_1x_2) no cultivo do fungo, visto na tabela 1, ensaio nº4, ter apresentado uma alta atividade de proteases (519 UP/mL), a equação nº1 indica que essa interação não foi estatisticamente significativa.

As combinações entre as três variáveis independentes x_1 , x_2 e x_3 podem ser observadas através da curva de nível apresentada na figura 2. A curva de nível indica que a melhor produção de proteases (visualizado em atividade UP/

mL) situa-se na região entre a metionina e a caseína, indicando que é necessário uma fração de caseína (0,5%) e uma fração de metionina (0,25%) suplementando o meio de cultivo para se obter uma boa produção da enzima. Também pode ser observada uma região ótima acima de 560 UP/ mL entre a larva e a caseína, indicando que a larva também foi um bom indutor para a produção de proteases.

A equação preditiva, que mostra as condições ótimas para a melhor produção de proteases (figura 3), sugere que não é necessária a combinação da larva com as demais variáveis independentes (caseína e metionina), no entanto, analisando apenas os termos lineares, ou seja, a influência de cada variável isolada, a larva é o indutor que melhor contribuiu para a produção de proteases (figura 4).

A atividade específica da enzima (UP/ mg de proteína) representada pela função resposta y_2 (equação 2) foi influenciada positivamente pelas variáveis larvas de *Aedes aegypti* (x_1) e a interação caseína e metionina (x_2x_3). A curva de nível representada na Figura 5 mostra as interações das variáveis x_1 , x_2 e x_3 para a resposta atividade específica da enzima (y_2). O gráfico indica a melhor região experimental para a obtenção de atividade específica ótima da protease de *B. bassiana* CG432, é na região da variável x_1 (larvas de *Aedes aegypti*) e isso também pode ser observado na tabela 1 e ensaio nº 1, indicando que ao adicionar apenas larvas de *A. aegypti* no meio de cultivo, o fungo é capaz de produzir proteases com maior atividade específica (356,4 UP/ mg de proteínas), 6,9 vezes superior a encontrada no cultivo controle.

As larvas de *A. aegypti* foram os melhores indutores, estimulando a produção de uma protease com atividade para este substrato específico. A equação preditiva confirma esta informação, pois mostra que para alcançar o valor ótimo de atividade específica é necessário suplementar o meio de cultivo apenas com larvas

de *A. aegypti* na maior concentração estudada (360 mg). As outras variáveis apresentaram uma influência menor nessa resposta (figura 6).

Realizando a otimização dos resultados de produção de proteases (y_1) e atividade específica (y_2) foi encontrado as condições ótimas para se obter os melhores resultados para as duas respostas, isto pode ser visto nos valores preditivos do gráfico representado na figura 7. O gráfico mostra que as condições ótimas para ambas as respostas produção de proteases (y_1) e atividade específica (y_2) é adicionar no meio de cultura do fungo apenas as larvas de *A. aegypti* (x_1) na maior concentração utilizada (360 mg) e não suplementar o meio de cultura com os outros indutores (x_2 e x_3), ou seja, as larvas de *A. aegypti* (x_1) foi a variável que exerceu a maior influência nessas duas respostas.

O crescimento do fungo analisado através do peso da biomassa fúngica (mg), resposta representada pela função y_3 (equação 3), indica que essa resposta foi influenciada positivamente pelas larvas de *A. aegypti* (x_1), caseína (x_2), metionina (x_3) e as interações das três variáveis ($x_1x_2x_3$). A curva de nível representada na figura 8 mostra as interações das variáveis independentes para a resposta biomassa. O gráfico indica que a melhor região experimental para a resposta biomassa (mg) é na região da variável caseína (x_2), quando está na maior concentração analisada (1%). Na tabela 1 e ensaio nº 2 foi adicionado apenas a variável caseína (x_2) no meio de cultivo do fungo e foi obtido a maior produção de biomassa (213,8 mg), 2,3 vezes maior que a produção de biomassa apresentada pelo cultivo controle. Isso indica que a caseína foi o melhor indutor que influenciou o crescimento do fungo no meio de cultura. A equação preditiva confirma isto, mostrando que a condição ótima de produção de biomassa fúngica (mg) é

adicionando ao meio apenas a caseína na maior concentração (1%) e sem a influência das demais variáveis, figura 9.

O teor de proteínas dos extratos fúngicos, representada pela função y_4 (equação 4), aumentou significativamente em função das variáveis larva de *A. aegypti* (x_1), caseína (x_2), metionina (x_3) e das interações larva (x_1) e caseína (x_2), caseína (x_2) e metionina (x_3), e da interação das três variáveis (x_1 , x_2 e x_3). A curva de nível representada na figura 10 mostra a interação das variáveis independentes para a resposta teor de proteínas. Esse gráfico indica que as três variáveis combinadas influenciaram no aumento do teor de proteínas dos extratos fúngicos. Isso também pode ser observado na tabela 1 e ensaio nº 4, que indica o maior teor de proteínas obtido do extrato suplementado com larvas de *A. aegypti* e caseína (x_1x_2) com o valor de 3,3469 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 3,6 vezes superior ao encontrado no cultivo controle.

Em seguida os extratos que apresentaram o maior teor de proteínas, foram os ensaios em triplicata (ensaios 7, 8 e 9) tabela 1, estes foram suplementados com os três indutores analisados (variáveis x_1 , x_2 e x_3), indicando que ambos os indutores adicionados no meio contribuíram para o aumento do teor de proteínas.

A equação preditiva representada no gráfico da figura 11, indica os valores necessários das três variáveis independentes para se obter o maior teor de proteínas (3,4191 $\mu\text{g} / \text{mL}$), para alcançar esse resultado é necessário suplementar o meio de cultivo do fungo com 0,75% de caseína; 0,08654% de metionina e 54,8456 mg de larvas de *A. aegypti*.

Os resultados obtidos para a resposta teor de proteínas (y_4) indicam que as três variáveis independentes apresentaram grande influencia no aumento do

teor de proteínas e, dessa forma, contribuíram para o desenvolvimento do fungo, quando adicionados no meio de cultura como agentes indutores.

Os extratos fúngicos dos ensaios de 1 a 9 foram liofilizados e concentrados 4 vezes para a análise da atividade de protease específica tipo subtilisina (com o substrato GAPNA) e tipo tripsina (com o substrato BAPNA). O ensaio nº4 (que continha como indutores 180 mg de larvas de *Aedes aegypti* e 0,5% de caseína) foi o único ensaio que apresentou atividade de protease tipo tripsina, porém muito baixa (1,5756 UP/ mL). Os ensaios que foram induzidos com larvas de *Aedes aegypti*, ensaios nº 1, 4, 5 e triplicata (7, 8 e 9) apresentaram atividade de protease tipo-subtilisina com os resultados: 12,0610 UP/ mL, 11,2843 UP/ mL, 9,2316 UP/ mL, 12,5049 UP/ mL, respectivamente.

4. Discussão

Como visto, as larvas de *A. aegypti* (x_1) foi o indutor que melhor contribuiu para o aumento da produção de proteases (y_1) e sua atividade específica (y_2), proporcionando os melhores resultados para ambas as respostas y_1 e y_2 . Isso ocorre, pois as proteínas são as principais constituintes da cutícula de insetos e, dentre as enzimas extracelulares produzidas pelo fungo *B. bassiana*, as proteases são os principais fatores de virulência produzidos e vão desempenhar um importante papel na penetração cuticular [25, 11, 3] e como a larva é um substrato mais complexo para ser clivado em relação aos demais indutores, o fungo teve que produzir mais proteases para obter os aminoácidos necessários para o seu crescimento.

Esses resultados condizem com outros trabalhos. Gupta et al. [9] observaram que maiores níveis de proteases Pr1 e Pr2 foram produzidos por *B. bassiana* em meios de cultivo suplementados com cutícula de insetos traça (*Galleria*

mellonella) e Campos et al. [22] descreveram que a cutícula da broca do café (*Hypothenemus hampei*) adicionado ao meio de cultivo do fungo *B. bassiana* também pode induzir a produção de protease Pr1.

Alguns trabalhos também afirmam a eficácia de fungos entomopatogênicos no combate ao *Aedes aegypti* em bioensaios laboratoriais [5, 6, 8]. A análise da atividade de proteases nos extratos fúngicos obtidos do meio de cultura suplementado com as larvas desse mosquito, sugere que as proteases desempenham um papel chave nesse processo infeccioso.

As duas variáveis combinadas caseína (x_2) e metionina (x_3) influenciaram o aumento da produção de proteases. A caseína é uma fosfoproteína que contém um grande número de resíduos de prolina que não interagem em suas cadeias laterais e não possuem nenhuma ponte de dissulfeto, devido a isso, apresenta pouca estrutura secundária e terciária, não formando estruturas globulares [23]. Estas características mostram que a caseína é um substrato acessível ao fungo no meio de cultura. O aminoácido metionina adicionado ao meio junto com a caseína atuou de forma sinérgica como agente indutor na produção de proteases. Em estudos anteriores, Donatti et al. [3] observaram que este aminoácido tem um importante papel na regulação da protease Pr1 de *B. bassiana*. Esses dois indutores combinados no meio de cultura possibilitaram ao fungo ótimas condições para o seu crescimento e, conseqüentemente, uma maior produção de proteases.

De acordo com a literatura, a metionina é um aminoácido facilmente assimilado pelos fungos como fonte de nitrogênio e enxofre. O enxofre é essencial para o crescimento do fungo. Esse íon é reduzido por mecanismos desconhecidos e pode ser utilizado na síntese de outros compostos importantes para o fungo como vitaminas (tiamina e biotina), o tripeptídeo glutathiona, bem como outros aminoácidos

(cisteína e cistina). O nitrogênio é um macroelemento, necessário para o fungo em quantidades relativamente grandes. Ele é necessário para a síntese de outros aminoácidos e das proteínas, ácidos nucleicos e algumas vitaminas. Através de uma reação chamada transaminação é possível que a metionina seja convertida em outros aminoácidos necessários, estes podem ser usados diretamente na síntese de proteínas ou outros compostos essenciais para o crescimento do fungo [24, 25, 26].

O ensaio nº 3 (tabela 1) no qual foi adicionado somente metionina (x_3) no meio de cultura foi observado uma baixa atividade de protease (27 UP mL^{-1}), duas vezes menor em relação ao cultivo controle. Neste caso é provável que o fungo tenha consumido o aminoácido, pois este é facilmente absorvido pela membrana celular do fungo e atua como um fator de crescimento [26]. Devido a isso, a produção de proteases foi menor comparando ao teste controle, pois não foi necessário o fungo produzir grande quantidade da enzima para adquirir os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento.

A caseína (x_2) foi o indutor que mais influenciou no crescimento do fungo, visto na quantidade de biomassa produzida. A caseína por ser uma proteína simples, com estrutura pouco complexa [23], torna-se acessível ao fungo no meio de cultura, facilitando sua clivagem pelas proteases extracelulares produzidas pelo fungo e tornando os aminoácidos livres acessíveis para a nutrição e consequente crescimento do fungo.

Para aplicação no controle biológico de insetos, é importante se obter uma cepa do fungo *B. bassiana* com maior virulência, neste caso, com uma maior capacidade de produzir proteases com atividade específica para hidrolisar a cutícula de insetos, a maior produção de biomassa é interessante, pois quanto maior a

massa fúngica produzida, maior vai ser a capacidade do fungo de eliminar os insetos praga.

Os ensaios que foram induzidos com larvas de *A. aegypti* apresentaram atividade de proteases tipo-subtilisina e apenas o ensaio nº4, que continha como indutores 180 mg de larvas de *A. aegypti* e 0,5% de caseína, apresentou atividade de protease tipo tripsina. A protease tipo-subtilisina é designada Pr1 tem a função de degradar proteínas da cutícula de insetos nas fases iniciais de penetração do fungo. A protease tipo-tripsina, designada Pr2, ocorre durante as fases iniciais de colonização da cutícula e desempenha um papel complementar à Pr1 no processo de degradação proteica [10,11, 3]. Estas enzimas podem ser induzidas em meios de cultivo suplementados com cutícula de diferentes insetos e também podem ser reprimidas por nutrientes em excesso [12].

Em estudos realizados com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, foi empregado diversos inibidores enzimáticos e demonstrou-se que ambas proteases Pr1 e Pr2 possuem resíduos de serina e histidina no sítio ativo, também foi observado que a protease Pr1 apresentou alta atividade sobre a cutícula de insetos e elastina, enquanto que a Pr2 hidrolisou a caseína e substratos sintéticos contendo arginina ou lisina, mas não apresentou atividade sobre cutícula ou elastina [27].

Em outros trabalhos da literatura também foi observado à indução de proteases Pr1 e Pr2 de *B. bassiana* em meios suplementados com diferentes substratos protéicos sintéticos e diferentes cutículas de insetos. Nestes trabalhos a produção de Pr1 e Pr2 foi variada, sendo que a protease Pr1 mostrou maior atividade em meios contendo cutículas de insetos [9, 22, 3, 28].

O estudo sobre a indução de proteases por *B. bassiana* é importante, pois permite analisar os melhores agentes indutores e assim aumentar a produção da enzima de interesse. Como visto neste trabalho, as larvas de *Aedes aegypti* foram os melhores agentes indutores de proteases com maior atividade específica. Isto sugere que a cepa CG432 de *B. bassiana* poderá ser induzida em laboratório para posterior uso em bioensaios sobre o mosquito *Aedes aegypti*. O aumento da produção de proteases poderá colaborar com a ação bioinseticida do fungo em consequência da maior capacidade de hidrolisar as proteínas, que constituem os principais e mais abundantes polímeros formadores da cutícula protetora dos insetos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado, ao professor Dr. Pedro M. O. J. Neves pelo fornecimento da cepa CG432 de *B. bassiana*, ao professor Dr. João Zequi pelo fornecimento de larvas de *Aedes aegypti* e ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais.

Referências

- [1] Ito ET, Pereira GV, Miyagui DT, Pinotti MHP, Neves PMOJ. Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. Brazil: Brazilian Archives of Biology and Technology 2007; 50, 2: p. 217-223.
- [2] Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. USA: Journal of Invertebrate Pathology 2008; 28: p. 267–270.
- [3] Donatti AC, Maia FL, Fungaro MHP, Furlaneto MC. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. Current Microbiology 2008; 56: p. 256–260.
- [4] Dong Y, Morton JC, Ramirez JL, Sousa JA, Dimopoulos G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 2012; 42: p. 126-132.
- [5] Clark TB, Kellen WR, Fukuda T, Lindegren JE. Field and Laboratory Studies on the Pathogenicity of the Fungus *Beauveria bassiana* to Three Genera of Mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology 1968; 11: p. 1-7.
- [6] Mirampuri GS, Khachatourians GG. Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. Canada: Veterinary Parasitology 1990; 37, 2: p. 155 – 162.

- [7] Scholte EJ, Takken W, Knols BGJ. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica* 2007; 102: p. 151–158.
- [8] Santos AH, Tai MHH, Rocha LFN, SILVA HHG, Luz C. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. *Biological Control* 2009; 50: p. 37–42.
- [9] Gupta SC, Leathers TD, Sayed GNE, Ignoffo CM. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. USA: *Experimental Mycology* 1992; 16: p.132-137.
- [10] Samuels RI, Paterson IC. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. Great Britain: *Comparative Biochemistry and Physiology* 1995; 110b, 4: p. 661-669.
- [11] Urtz BE, Rice WC. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. United Kingdom: *Mycological Research* 2000; 2, 104: p. 180-186.
- [12] Dhar P, Kaur G. Production of cuticle - degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. *African Journal of Biochemistry Research* 2010; 4, 3: p. 65-72.
- [13] Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 60: p. 381–395.

- [14] Rao YK, Lu SC, Liu BL, Tzeng YM. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochemical Engineering Journal* 2006; 28: p. 57–66.
- [15] Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry* 2000; 35, 6: p. 539-550.
- [16] Cornell JA. *Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixture Data*. New York: John Wiley and Sons, 3rd edition, 2002.
- [17] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bulletin* 1956; 13: p. 42-43.
- [18] Lemos FJA, Campos FAP, Silva CP, Xavier -filho J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfaciatus* reared on cowpea *Vigna unguiculata* seeds. *Entomologia Experimental et Applicata* 1990; 56: p. 219-227.
- [19] Hartree EF. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 1972; 48: p. 422-427.
- [20] Bradford MMA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: p. 248-254.
- [21] Tiago PV, Fungaro MHP, Faria MF, Furlaneto MC. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* and *Paecilomyces fumoroseus* on protease activities, conidia production and virulence. *Canadian Journal of Microbiology* 2004; 50: p. 335-339.

- [22] Campos RA, Arruda W, Boldo JD, Silva MV, Barros NM, Azevedo JL, Schrank A, Vainstein MH. *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. *Current Microbiology* 2005; 50: p. 257–261.
- [23] Kunz C, Lonnerdal B. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel eletrophoresis, and specific staining methods. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1990; 51: p. 37-46.
- [24] Sussman AS. The fungi – An advanced Treatise. In: *The Fungal Cell* 1965. London: Academic Press; 13: p. 368 – 373.
- [25] Landecker EM. *Fundamentals of the fungi*. New Jersey: Prentice – Hall; 1982. p. 281 – 333.
- [26] Kavanagh K. *Fungi – Biology and Applications*. In: John Wiley e Sons editors; 2005. p. 11 – 27.
- [27] St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. Characterization of cuticle degrading proteases produced by the intomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1987; 253: p. 221-232.
- [28] Dias BA, Neves PMOJ, Maia LF, Furlaneto MC. Cuticle –Degrading Proteases Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; 39: p. 301-306.

Legenda das Figuras

Figura 1. Delineamento experimental simplex-centroide para 3 componentes: variáveis x_1 = larvas de *A. aegypti*, x_2 = caseína e x_3 = metionina

Figura 2. Região de combinação entre as três variáveis x_1 , x_2 e x_3 obtida para a resposta y_1 proteases (UP/ mL)

Figura 3. Gráfico das condições ótimas de produção de proteases (UP/mL) para as variáveis estudadas

Figura 4. Gráfico das condições ótimas de produção de proteases (UP/mL) para as variáveis estudadas no modelo linear

Figura 5. Região de combinação entre as três variáveis x_1 , x_2 e x_3 para a resposta y_2 atividade específica da enzima (UP/ mg de proteína)

Figura 6. Gráfico das condições ótimas de atividade específica da enzima (UP/mg de proteína) para as variáveis estudadas

Figura 7. Gráfico das condições ótimas para se obter maior produção de proteases (UP/mL) e maior atividade específica da enzima (UP/mg de prot.)

Figura 8. Região de combinação entre as três variáveis x_1 , x_2 e x_3 para a resposta y_3 biomassa (mg)

Figura 9. Gráfico das condições ótimas de crescimento da biomassa (mg) para as variáveis estudadas

Figura 10. Região de combinação entre as três variáveis x_1 , x_2 e x_3 para a resposta y_4 teor de proteínas ($\mu\text{g/mL}$)

Figura 11. Gráfico das condições ótimas do teor de proteínas ($\mu\text{g} / \text{mL}$) para as variáveis estudadas

Tabela 1

Condições experimentais utilizadas no delineamento experimental de mistura simplex-centróide e resultados do cultivo do fungo *Beauveria bassiana* CG432

Ensaio	Mistura	Variáveis reais	Protease (UP /mL)	Atividade específica (UP/mg de prot.)	Biomassa (mg)	Teor de proteínas (µg /mL)
1	(1; 0; 0)	(360mg;0;0)	583,2000	356,4000	131,4000	1,6363
2	(0; 1; 0)	(0; 1%;0)	199,2000	66,4000	213,8000	3,0000
3	(0; 0; 1)	(0;0;0,5%)	27,0000	58,9090	108,6000	0,4583
4	(½; ½; 0)	(180mg;0,5%;0)	519,0000	155,0671	143,5000	3,3469
5	(½; 0; ½)	(180mg;0;0,25%)	23,0000	27,8421	118,6000	0,8260
6	(0; ½; ½)	(0;0,5%;0,25%)	755,0000	259,1791	166,8000	2,9130
7	(¹ / ₃ ; ¹ / ₃ ; ¹ / ₃)	(120mg;0,33%;0,16%)	243,0000	77,7600	180,8000	3,1250
8	(¹ / ₃ ; ¹ / ₃ ; ¹ / ₃)	(120mg;0,33%;0,16%)	315,0000	106,5441	181,0000	2,9565
9	(¹ / ₃ ; ¹ / ₃ ; ¹ / ₃)	(120mg;0,33%;0,16%)	251,0000	82,4714	189,6000	3,0434
Controle	(0 ; 0 ; 0)	(0; 0; 0)	47,0000	51,4761	95,0000	0,9130

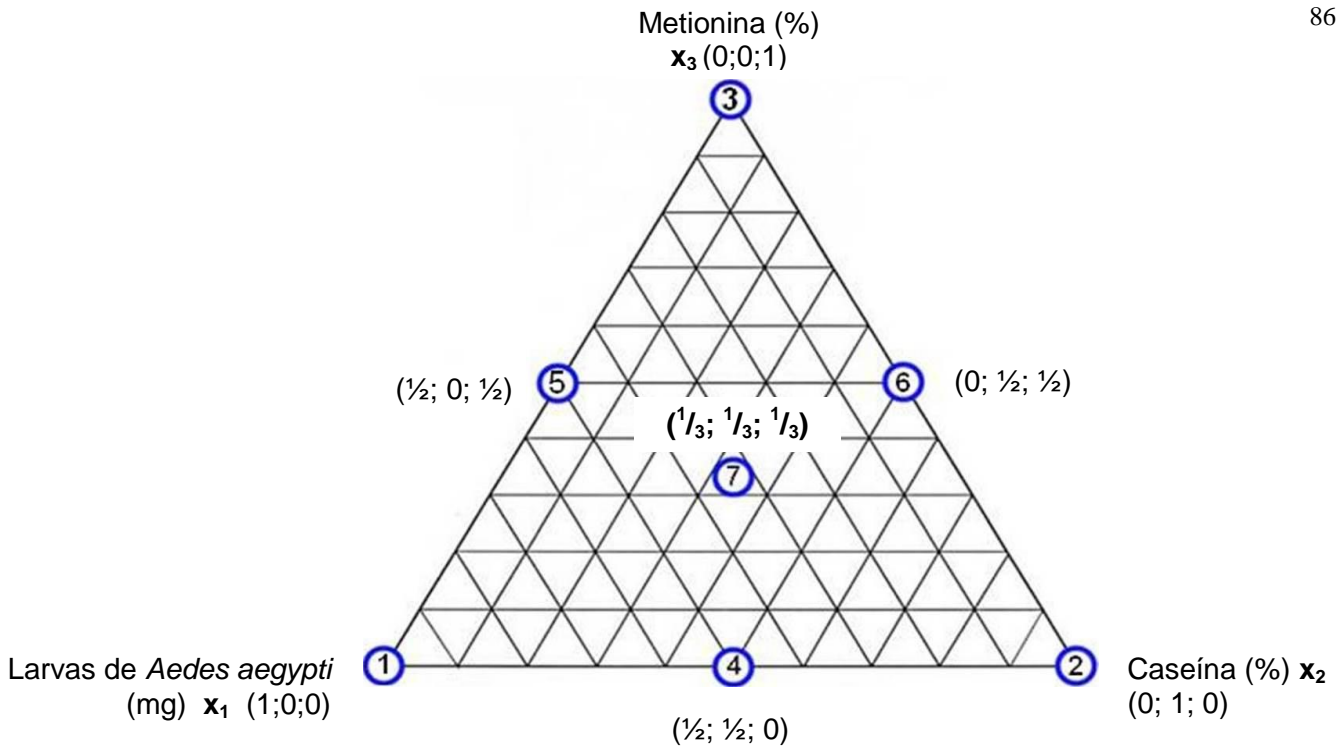


Fig. 1.

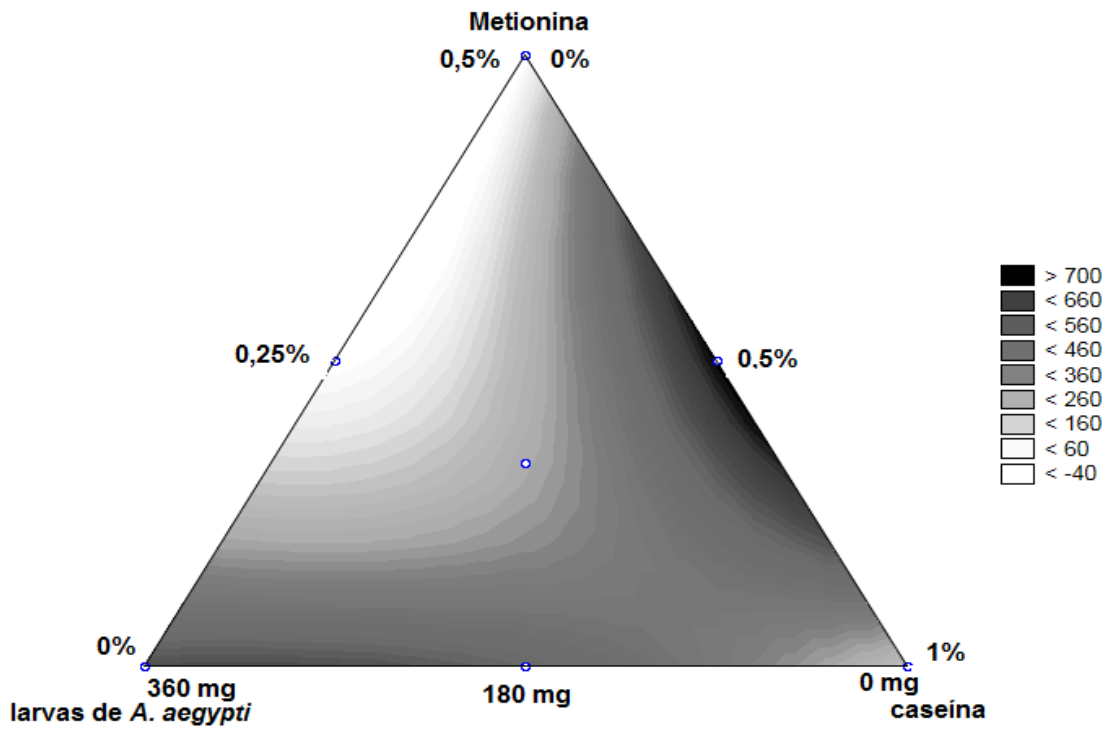


Fig. 2.

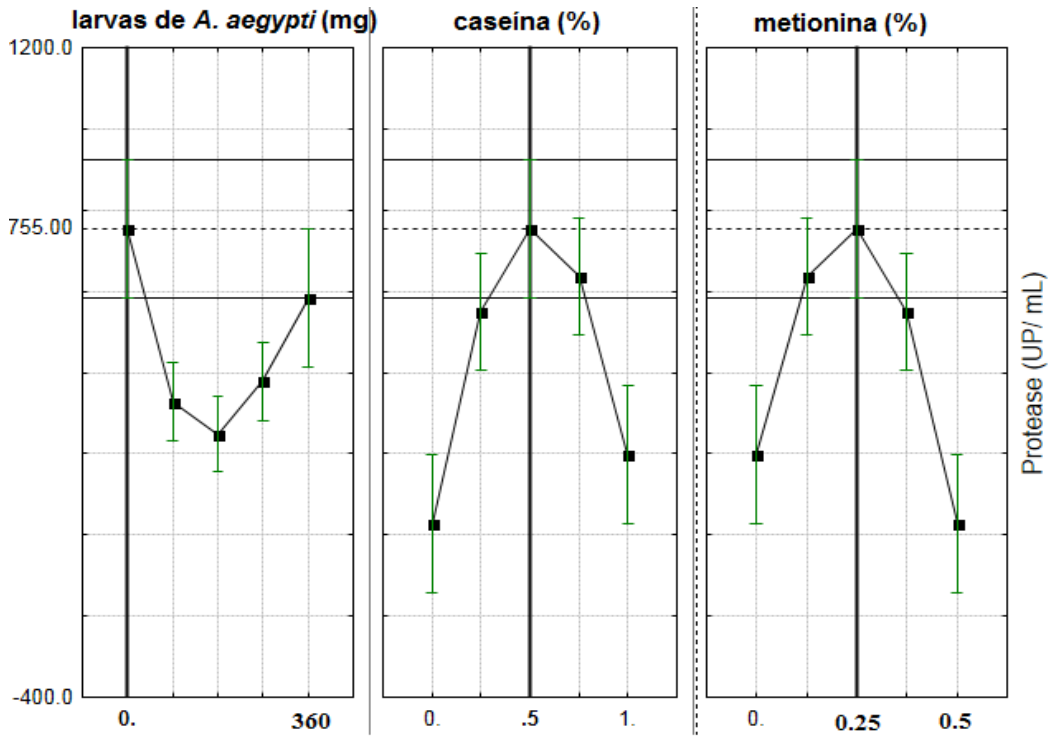


Fig. 3.

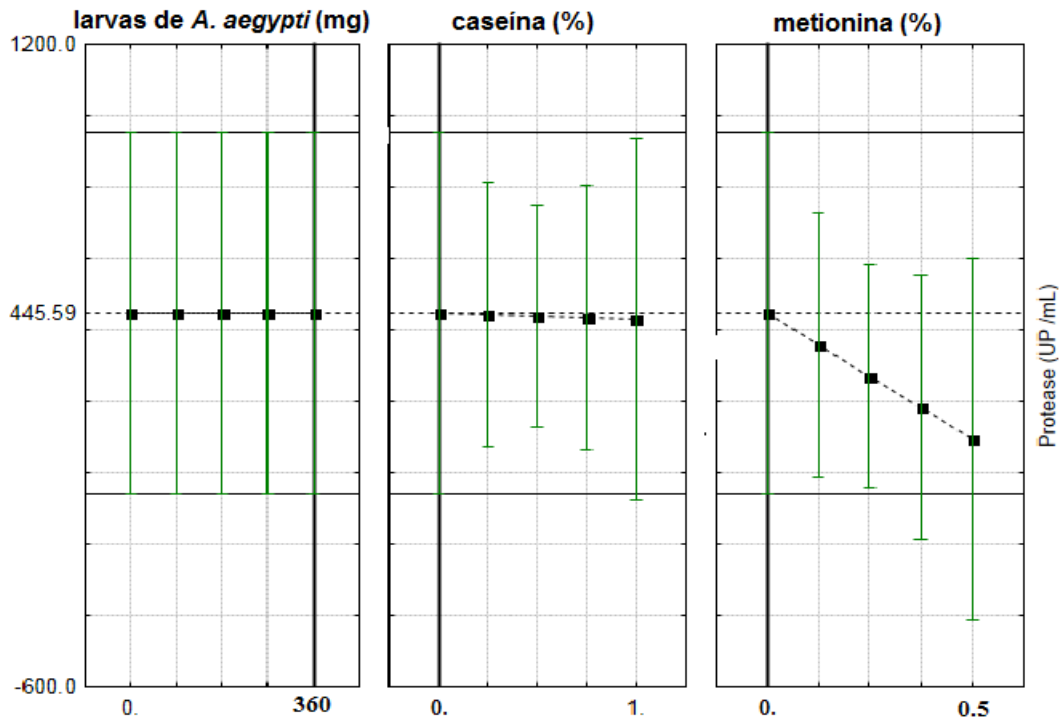


Fig. 4.

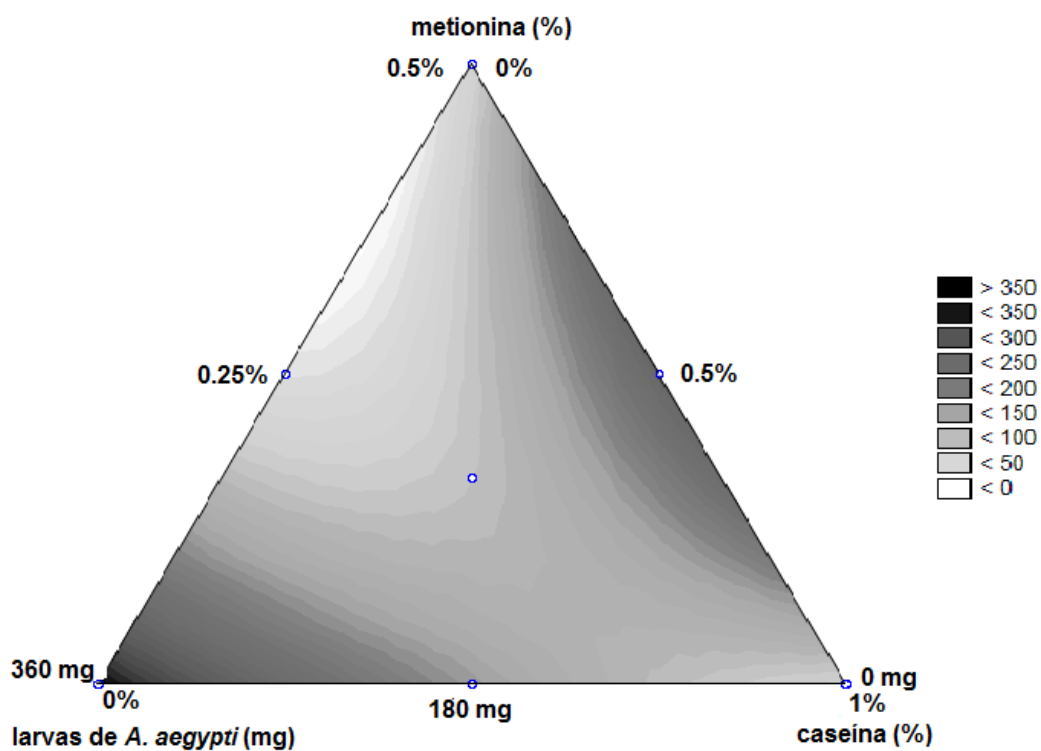


Fig. 5.

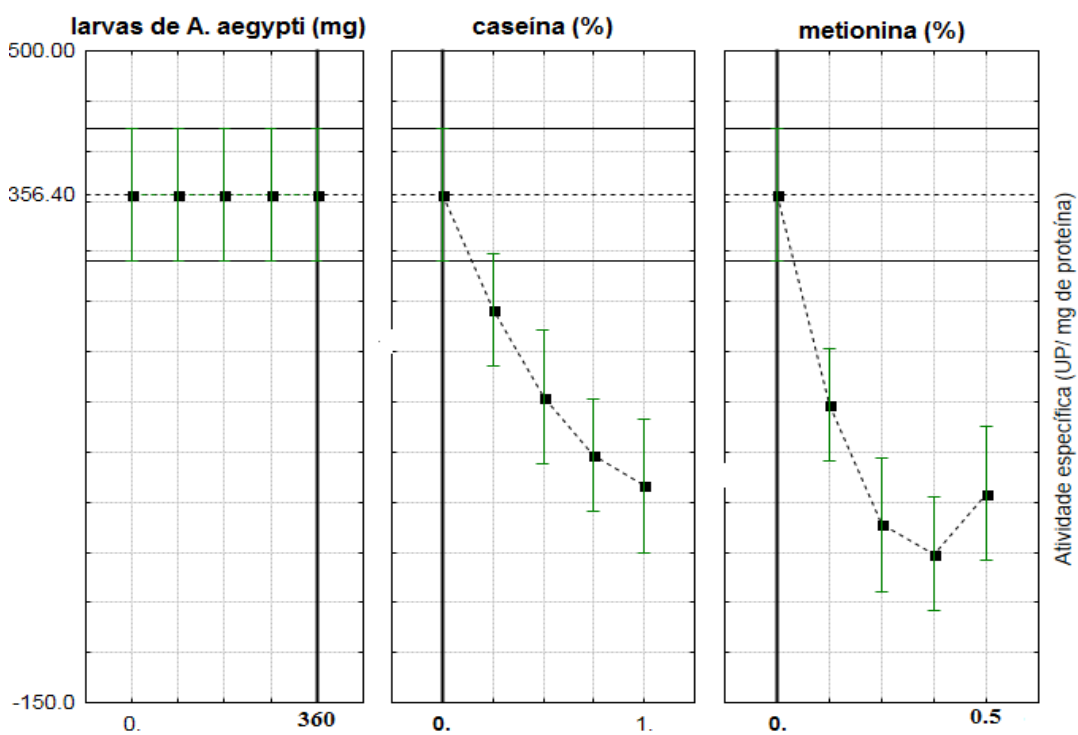


Fig. 6.

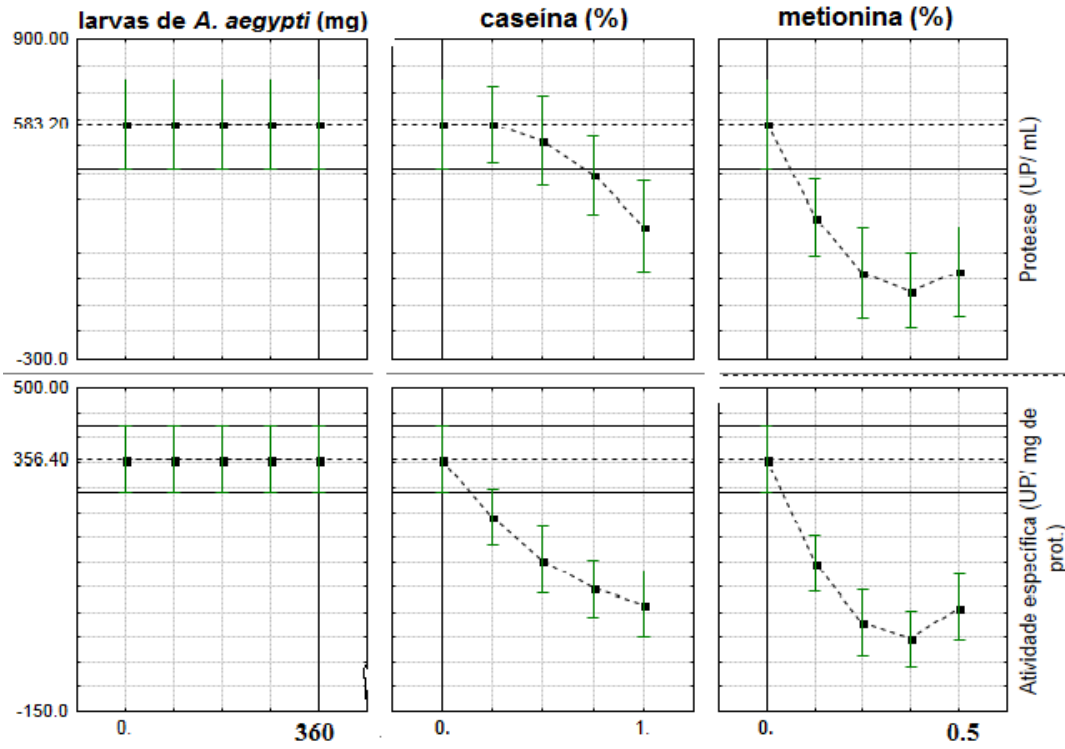


Fig. 7.

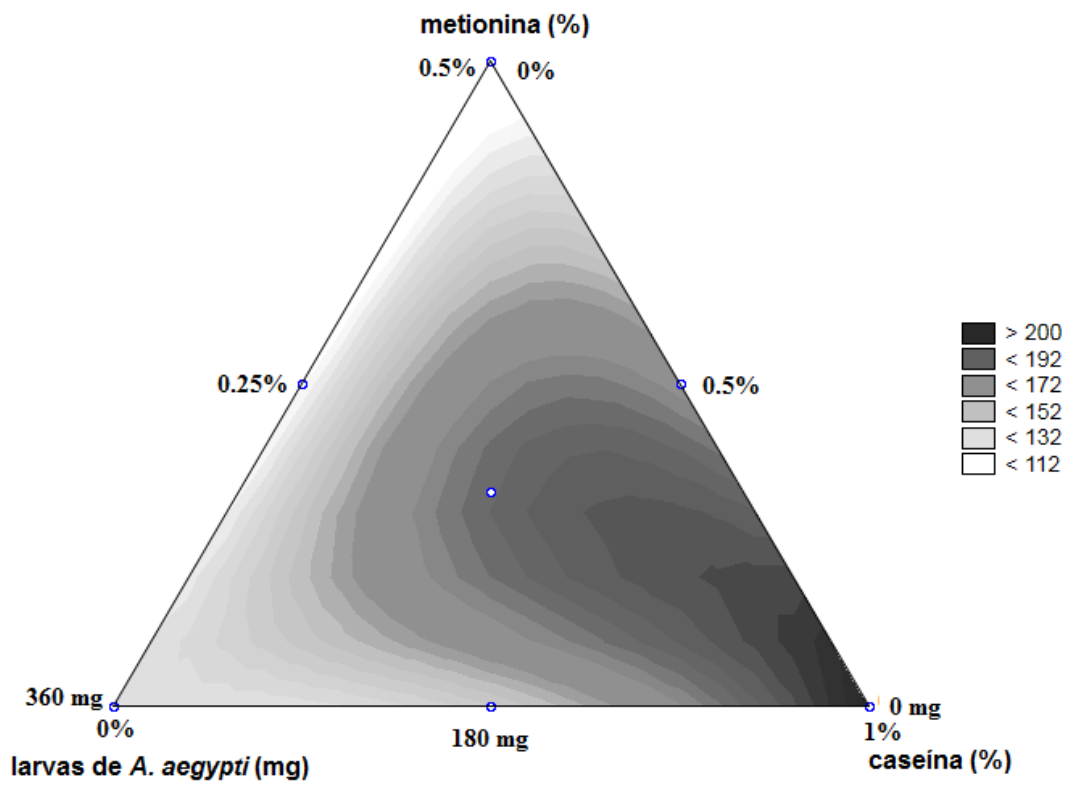


Fig. 8.

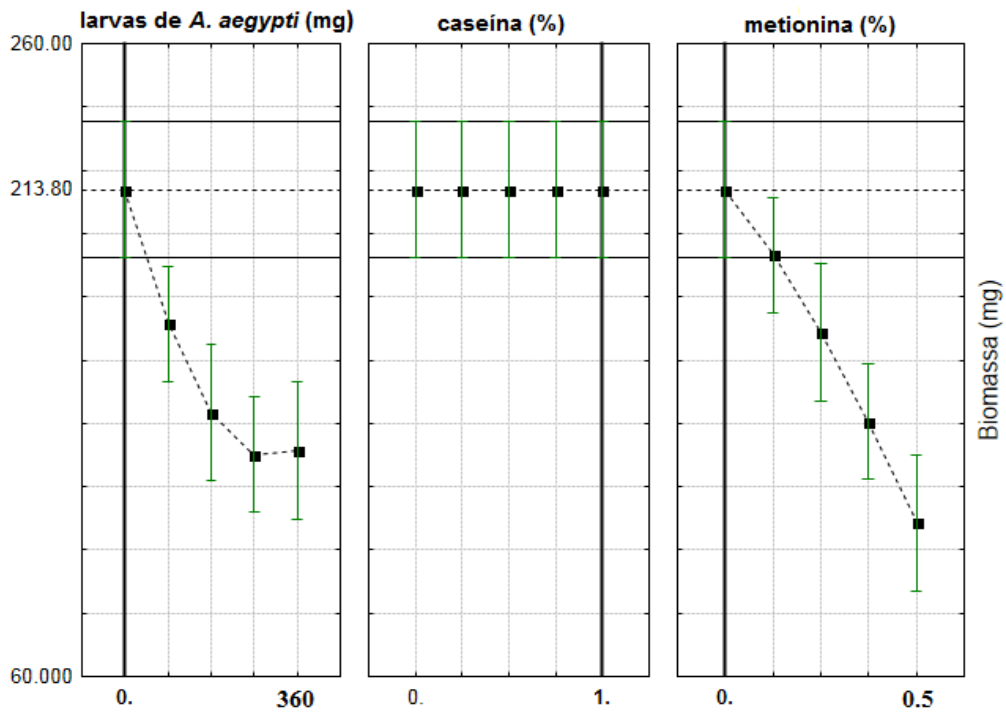


Fig. 9.

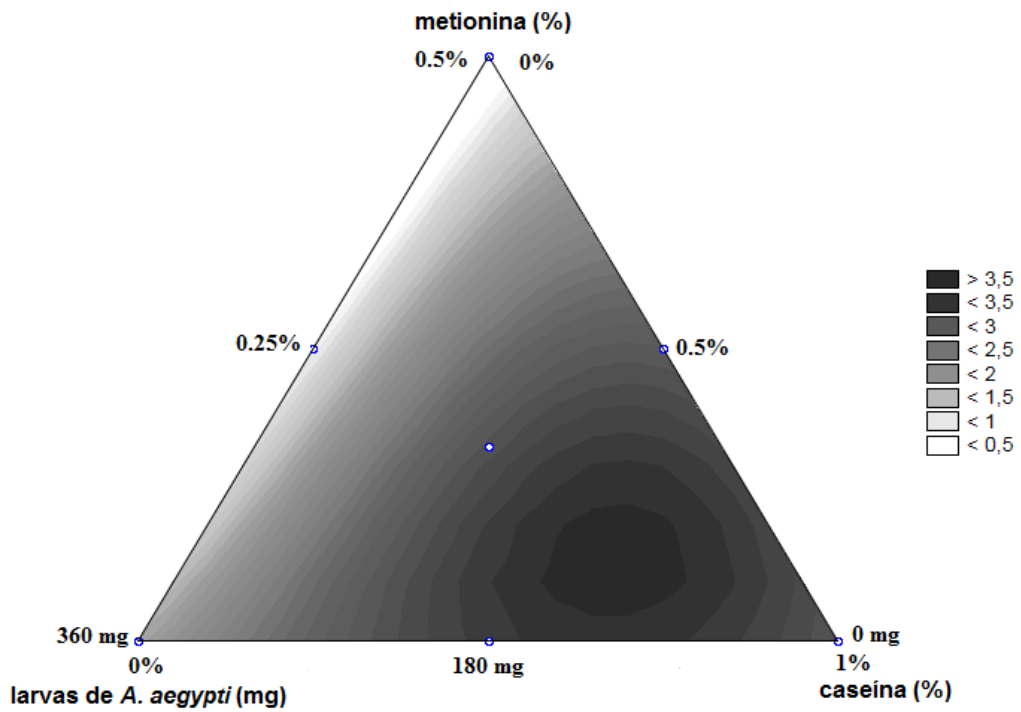


Fig. 10.

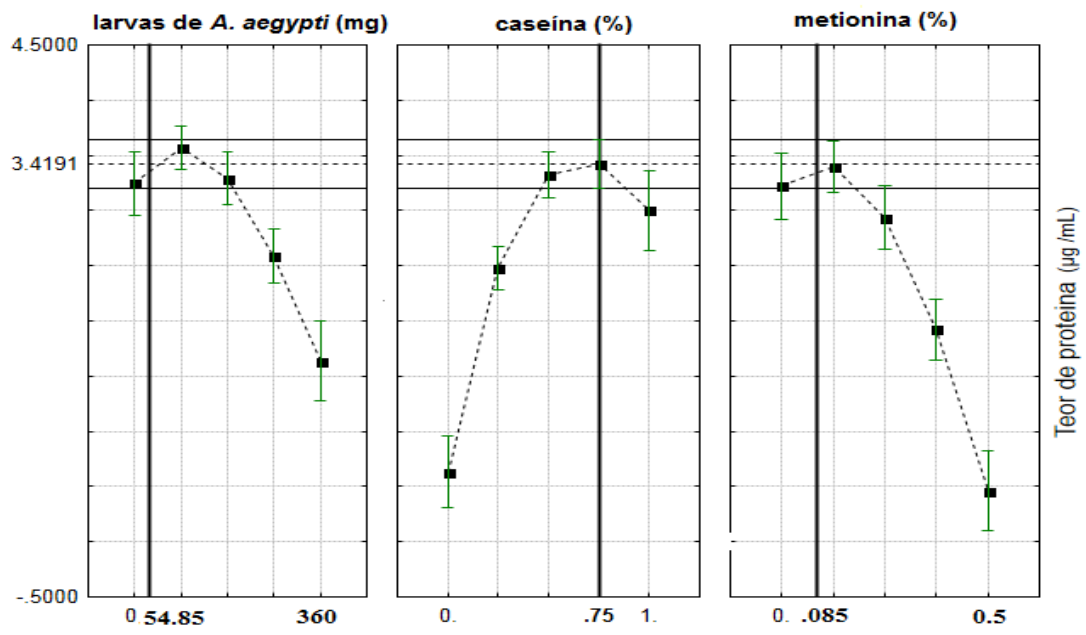


Fig. 11.

ANEXO C

Artigo 3: Análise de Polimorfismo em genes codificadores de proteases em *Beauveria bassiana*.

Análise de Polimorfismo em genes codificadores de proteases em *Beauveria bassiana*

Danielle Cardoso Gimenes¹, Danielle Cristina Ferreira¹, Karita dos Reis Costa¹, Geni da Silva Varéa¹, André Luíz Martinez de Oliveira^{1*}.

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – PR

*Autor para correspondência: almoliva@uel.br

RESUMO

Assim como outros fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* produz enzimas que degradam a cutícula para facilitar sua penetração no hospedeiro no momento da infecção. As proteases são consideradas enzimas importantes nesse processo, pois hidrolisam as proteínas, que são um dos maiores componentes do exoesqueleto dos insetos. Baseado na análise de sequências de proteases de *B. bassiana* já descritas, foram desenhados e validados iniciadores para a porção N-terminal deste gene, que possibilitou estudar o polimorfismo deste gene em 16 cepas de *B. bassiana* isoladas a partir de diferentes tipos de insetos e origens geográficas. A amplificação do gene da protease resultou em um produto de aproximadamente 400 pb para todas as cepas testadas, e todas as sequências obtidas corresponderam ao gene alvo. A análise do polimorfismo das sequências obtidas indicou a formação de dois grupos que não apresentaram correlação com a atividade enzimática, inseto hospedeiro ou origem geográfica. Os iniciadores desenvolvidos apresentam características de especificidade e tamanho de fragmento compatíveis com a ferramenta de PCR em tempo real, possibilitando sua utilização futura no estudo da expressão de proteases em *B. bassiana*.

Palavras chave: *Beauveria bassiana*, protease, polimorfismo, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

O fungo *Beauveria bassiana* pertencente à classe Ascomycetes e família Cordycipitaceae é o mais comumente isolado de insetos e moribundos na natureza (11, 19, 6). Este fungo é conhecido como um fungo entomopatogênico com distribuição em todo o mundo e em diversos habitats ecológicos (19).

Os fungos entomopatogênicos apresentam grande versatilidade, causando danos a artrópodes que vivem em plantas, solos e ambientes aquáticos. Com um mecanismo de infecção especializado, alguns fungos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros. Para a maioria dos fungos a penetração ocorre via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral. Além disso, possuem alta capacidade de disseminação horizontal, podendo ser levados pelos diferentes agentes de disseminação para locais muito distantes. A variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos (1).

No processo infeccioso o fungo penetra na cutícula do inseto hospedeiro principalmente por ação de enzimas extracelulares produzidas em resposta a constituição da cutícula do inseto (8, 11, 5). Um dos principais constituintes da cutícula são as proteínas e, sabe-se que, entre as enzimas extracelulares produzidas pelo fungo *B. bassiana*, as proteases são fatores de virulência que desempenham um importante papel na penetração cuticular (21, 23, 6).

Como a quantidade das enzimas produzidas por *B. bassiana* envolvidas na degradação da cutícula e desenvolvimento da doença no inseto pode depender do hospedeiro e do ambiente que habitam (8), 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 (4, 7, 18, 26, 22, 25, 17, 24).

Até o momento, poucos estudos foram realizados sobre análise de polimorfismos de genes envolvidos com fatores de virulência de diferentes isolados do fungo *B. bassiana*. Em um desses estudos, (26) 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 (18), o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de polimorfismo no gene da protease de *B. bassiana* por meio do sequenciamento do DNA na região deste gene e analisar a possível correlação de polimorfismos com o inseto hospedeiro e a região geográfica de origem, bem como a atividade de protease obtida pelos isolados de *B. bassiana* estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Foram selecionadas 16 cepas de *B. bassiana* isolados de diferentes insetos hospedeiros e origens geográficas distintas, conforme mostra a Tabela 1. As cepas foram obtidas do Banco de Patógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Pragas do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Cultivo do micro-organismo

As cepas de *B. bassiana*, estocadas a -20 °C, foram inicialmente repicadas em meio solidificado complexo otimizado por Alves (1), incubado em estufa BOD a 26 °C, em fotoperíodo de 12 horas por cerca de 10 dias ou até completa esporulação. Posteriormente os esporos fúngicos produzidos por cada cepa foram utilizados no preparo de suspensões padronizadas (10^8 esporos/mL) através de diluições em solução salina fisiológica estéril adicionada de 0,01% de Tween 80 e contagem dos esporos em câmara reticulada de Neubauer sob microscopia óptica. Foram inoculados 1% (v/v) da suspensão de esporos de cada cepa em meio líquido otimizado por Alves (1) de modo a obter 10^6 esporos por mL de meio de cultura, este meio continha glicose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Os cultivos foram feitos em 3 repetições contendo 12,5 mL de meio de cultura para cada frasco de erlenmeyer de 125 mL e mantidos a 28 °C, sob agitação a 150 rpm por 5 dias.

Os cultivos foram interrompidos por filtração a vácuo em banho de gelo utilizando papel de filtro e centrifugados a 8000 xg por 20 minutos a 4 °C. O filtrado obtido foi denominado como extrato livre de células (ELC). Estes foram dialisados contra tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0 durante 24 horas a 4 °C (com três trocas do tampão ao longo desse período) para eliminar interferentes do meio de cultura e, então, utilizados para estudos referentes à atividade enzimática.

Determinação da atividade de protease

A atividade de proteases no ELC foi determinada segundo a técnica de Lemos et al. (15). Alíquotas de 200 µL dos extratos enzimáticos foram adicionadas a 200 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 e a 100 µL albumina de soro bovino (SBA)

12,5mg/mL. A reação foi interrompida, após incubação em Banho Maria a 37 °C por 1 hora, pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) gelado a 10%, seguida de centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos.

Os peptídeos solúveis presentes no sobrenadante foram determinados pelo método de Hartree (10) com base na equação de regressão $y = 0,0019 X + 0,0052$ ($R^2 = 0,9992$), obtida da curva de calibração com concentrações de 20 a 200 µg mL⁻¹ de albumina de soro bovino.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades de Protease (UP), onde 1UP foi definida como o número de µg de peptídeos solúveis liberados pela ação da protease, por mL do ELC nas condições da reação.

Desenho de iniciadores e reações de amplificação por PCR

Os iniciadores utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2. As sequências dos genes *cdep1*, *cdep2*, *bsn1* e *Pr1* recuperadas do GenBank e utilizadas para o desenho dos iniciadores são apresentadas na Tabela 3. As sequências dos genes de proteases foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (9), e o alinhamento foi inspecionado visualmente antes da identificação de regiões conservadas. Em seguida, foram selecionadas regiões de 18 a 25 nucleotídeos para o desenho dos iniciadores. A ocorrência de formação de dímeros e estruturas secundárias foi avaliada utilizando o programa FastPCR (13). A especificidade dos iniciadores foi verificada utilizando a ferramenta Primer-BLAST do servidor NCBI.

Para a realização das reações de amplificação foi realizada a extração de DNA das cepas de *B. bassiana* conforme descrito a seguir. Após cultivo em meio líquido (1) por 5 dias, 28 °C em agitador orbital a 150 rpm, foi feita a coleta do micélio por filtração à vácuo de cada cepa estudada. O micélio do fungo foi reduzido

a pó em gral na presença de nitrogênio líquido, e aproximadamente 0,1 g do pó resultante foi distribuído em tubos de microcentrífuga. Foi em seguida adicionado 0,5 mL de tampão CTAB (CTAB 2%, PVP 1%, Tris-HCl 100 mM, EDTA 25 mM, e NaCl 1,4 mM), homogeneizando-se as amostras em vórtex por cerca de 30 segundos.

Tabela 1. Hospedeiro e origem dos isolados de *B. bassiana* utilizados para a análise de polimorfismo em genes codificadores de proteases

Isolados	Hospedeiro	Família	Origem
CG71	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lepidoptera: Pyralidae	PE-Brasil
CB64	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	RO-Brasil
CB66	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	SP-Brasil
CG481	<i>Diabrotica speciosa</i>	Coleoptera: Crysomelidae	BA-Brasil
CB35	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	BA-Brasil
CG138	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	PE-Brasil
UEL4	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	PR-Brasil
UEL54	<i>Diabrotica sp.</i>	Coleoptera: Crysomelidae	PR-Brasil
CG458	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Curculionidae	PR-Brasil
CB95	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	MT-Brasil
UEL55	Não identificado	Hemiptera	PR-Brasil
CG25	<i>Anticarsia gemmatilis</i>	Lepidoptera: Noctuidae	DF-Brasil
CB102	solo		SP-Brasil
CB47	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera: Crysomelidae	SP-Brasil
CG425	<i>Rhammatocerus schistocercoides</i>	Orthoptera: Acrididae	MT-Brasil
CG432	Não identificado	Hemiptera: Membracidae	RN-Brasil

As amostras foram então aquecidas a 80 °C por 20 minutos e resfriadas em seguida em banho de gelo. Foi adicionado 1 µL da enzima RNase (20 µg mL⁻¹; Invitrogen) e as amostras foram incubadas a 37 °C pelo período de 1 hora.

Adicionou-se 0,5 mL de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguindo homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C.

Tabela 2. Iniciadores de PCR utilizados neste estudo e respectivas regiões-alvo

Iniciador	Sequência (5'-3')	Alvo e tamanho do produto de PCR	Referência
ITS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	região 18S – 1100 pb	White et al., 1990
ITS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG		
BSN-N	AGACGAATTCATGCGTCTATCAATCATCGCTG	gene bassiasin I 1,15 Kb	Kim et al., 1999
BSN-C	TGCTAAGCTTAGGTGGCGCCGTTAAATGC		
PR1AF	TAGTGCTGGTCAGGGTACTT	gene Pr1A	Lu et al., 2008
PR1AR	GGTACCAGAGATGGAGTTTG		
DaniF	TTGAGCCTGCTCCTCTCATCG	Protease 400 pb	Este trabalho
DaniR	TGCCCTGTGCGAGATGCGAC		

Tabela 3. Sequências de proteases utilizadas neste estudo

Gene	Descrição	nº de acesso (GenBank)
cdep 1	<i>B. bassiana</i> cuticle-degrading proteinase	AY040532
Pr1	<i>B. bassiana</i> subtilisin-like protease	U16305
bsn1	<i>B. bassiana</i> cuticle-degrading protease bassiasin I	AF104385
cdep 2	<i>B. bassiana</i> cuticle-degrading proteinase	EF195164
Pr1	<i>B. bassiana</i> strain MTCC 2028 serine proteinase	GU166155
bsn1	<i>B. bassiana</i> cuticle-degrading protease bassiasin I	AF154118
Pr1	<i>B. brongniartii</i> cuticle-degrading protease	AY520815
Pr1	<i>B. brongniatti</i> cuticle-degrading protease	AY520814

Para cada uma das amostras, a fase aquosa foi coletada e transferida para novo microtubo, acrescentando-se 0,6 volumes de isopropanol. As amostras foram incubadas por 1 hora a -20 °C, seguindo uma nova centrifugação por 30 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ao precipitado foi adicionado 100 µL de NaCl 5M e 400 µL de etanol absoluto. Os tubos foram

homogeneizados por inversão por aproximadamente 30 segundos e em seguida foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. O precipitado formado foi lavado com etanol 70%, seco a 60 °C e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura esterilizada. Os extratos de DNA obtidos conforme descrito acima foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,9%, corados com brometo de etídeo ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) visualizados sob luz ultravioleta para avaliação qualitativa. Os extratos obtidos foram quantitativamente avaliados através de análise espectrofotométrica e padronizados para soluções com aproximadamente $20\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$. Os extratos assim obtidos foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso nas reações de amplificação por PCR.

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50 µL, contendo: 1,5 µL de DNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados, estoque com 1,5 mM de cada base, Invitrogen), 5 µL de tampão 10X (Invitrogen, 10 mM, Tris-HCL pH 8,3), 4 µL de MgCl_2 (Invitrogen, 25 mM), 1 µL de cada "primer" a $20\text{ pmol }\mu\text{L}^{-1}$ (Invitrogen), 2 µL de DNA molde ($20\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5 U μL^{-1}) e 35,3 µL de H_2O ultrapura estéril. A mistura da reação foi submetida ao termociclador Life Express, BIOER programado para a seguinte ciclagem: 94 °C, 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C, 30 segundos, 64 °C, 1 minuto, e 72 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto. Os produtos de reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (90 V por 1 hora) em tampão TBE 1X (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução), e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo ($1\mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras que apresentaram fragmentos de amplificação no tamanho esperado (400 pb) foram tratadas para sequenciamento utilizando o kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™).

Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba-PR). Os fragmentos purificados foram submetidos às reações de PCR para o sequenciamento, realizadas em termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems), utilizando o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism”, de acordo com as instruções do fabricante. Em cada reação, foram utilizados 10 ng do fragmento purificado; 0,5 μ M do oligonucleotídeo iniciador 27f; 1 μ L do terminador Big Dye; 2 μ L de tampão Save Money [Tris-HCl 400 mM (pH 9) e $MgCl_2$ 10 mM] e água ultrapura estéril para 10 μ L de reação. As condições da PCR foram: 1 ciclo de 96 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação (96 °C por 15 segundos), anelamento (58 °C por 10 segundos) e extensão (60 °C por 4 minutos).

O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems, German).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade de proteases

A determinação da atividade enzimática realizada para as 16 cepas de *B. bassiana* selecionadas neste estudo indicou que todos esses isolados produziram proteases com diferentes atividades enzimáticas, sendo que as cepas mais produtoras foram CG342, CG458, UEL55 e CB35 com valores em atividade de proteases (UP mL⁻¹) de 47,79; 46,74; 43,58 e 40,95 respectivamente, conforme visto na Figura 1.

A variabilidade na produção de proteases, analisada pelas diferenças na atividade enzimática entre as diferentes cepas de *B. bassiana* sugere uma variabilidade na expressão destes genes sob as condições testadas. Além disso, considerando que as cepas avaliadas foram isoladas de diferentes insetos, pode-se também sugerir a necessidade de indutores específicos para o alcance de elevados níveis na produção de proteases.

Esses resultados concordam com os resultados obtidos por Pinto et al. (20) que analisaram a produção de proteases extracelulares (Pr1 e Pr2) a partir de sete isolados de *M. anisopliae var. acridum* (= *M. flavoviride*) após crescimento em meio contendo cutícula do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* e substratos não cuticulares. Estes autores observaram a ocorrência de variabilidade natural entre os isolados quanto à produção das proteases analisadas, e que o tipo de cutícula utilizada como substrato influenciou sua expressão. Gupta et al. (8) também observaram diferenças na produção de proteases de isolados de *B. bassiana* cultivados em meio contendo cutícula de diferentes insetos, sugerindo que a diferença na produção destas enzimas extracelulares poderia estar relacionada com a constituição da cutícula do inseto hospedeiro e, provavelmente, com a virulência de cada isolado.

Amplificação do gene da protease

Não foi possível a obtenção de produtos de amplificação utilizando nenhum dos iniciadores descritos na literatura, direcionados para a amplificação do gene de protease. Por outro lado, as reações de amplificação utilizando os iniciadores desenvolvidos neste trabalho resultaram na obtenção de produtos de amplificação. O tamanho dos fragmentos amplificados (aproximadamente 400 pb

para a porção N-terminal do gene de protease) indicou especificidade das reações, e que a impossibilidade de obter produtos de amplificação pelo uso de iniciadores já descritos não foi decorrente da presença de inibidores nos extratos de DNA.

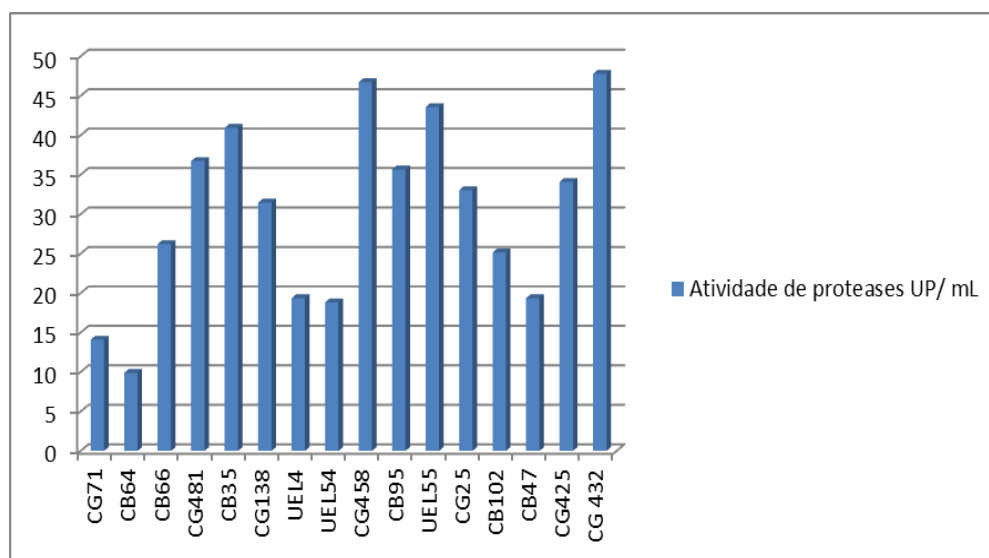


Figura 1. Atividade de proteases (UP mL⁻¹) de isolados de *B. bassiana*

Análise do polimorfismo no gene da protease

A análise da região N-terminal do gene de protease das cepas utilizadas neste trabalho permitiu a realização de uma análise filogenética, conforme apresentado na Figura 2. A análise do dendrograma evidenciou a formação de quatro grupos distintos ao nível de 5 % de dissimilaridade (95 % de similaridade). No Grupo I estão as cepas: CG71, CG138, CB66, UEL54, UEL4, CG432 e CG458, como também as sequências das seguintes proteases de *B. bassiana*: CDEP-1, CDP, Pr1, CDEP2 e bsn1.

No Grupo II encontram-se as cepas CG25, CG425, CB47, CB64, CB102, CB35, CG481, CB95, UEL55. De maneira interessante, nenhuma das

sequências descritas agrupou-se com este conjunto de sequências, sugerindo a existência de uma nova classe de proteases em *B. bassiana*.

Nos Grupos III e IV encontram-se, respectivamente, sequências já descritas da protease Pr1 de *Beauveria bronginiatii*, e da protease Alp de *Fusarium sp.*

As cepas CB66, UEL54, UEL4 e CG432 pertencentes ao grupo I, apresentaram as sequências do gene da protease muito similares entre si e muito próximas à sequência do gene *bsn1* de uma protease de *B. bassiana*, retirada da base de dados NCBI sob o número de acesso gi 18026683. As cepas CG138 e CG71 apresentaram suas sequências semelhantes às sequências das proteases de *B. bassiana* já conhecidas CEDP2 proteinase gi 124110803, serino proteinase (PR1) de *B. bassiana* cepa MTCC2028 gi 239137310, proteinase CDP de *B. bassiana* cepa CA-12 gi 326206267 e proteinase CDEP1 gi 14626932. A cepa CG458 apresentou semelhança, embora não muito próxima, as demais sequências do grupo I.

As duas cepas de *B. bassiana* que tiveram maior atividade de proteases CG432 (47,79 UP mL⁻¹) e CG458 (46,74 UP mL⁻¹) fazem parte do grupo I, outras duas cepas UEL55 (43,58 UP mL⁻¹) e CB35 (40,95 UP mL⁻¹) também tiveram valores próximos na atividade de proteases, mas estão localizadas no grupo II. Isso indica que o polimorfismo no gene da protease das cepas de *B. bassiana* estudadas não se correlaciona com a atividade enzimática apresentada por essas cepas, pois a variação na atividade de proteases foi semelhante entre as cepas dos dois agrupamentos.

Pela análise do dendrograma foi possível observar que a origem geográfica e o hospedeiro não determinaram a formação dos grupos, pois os dois grupos apresentaram cepas isoladas de hospedeiros e origem geográficas

diferentes e também foi observado que cepas isoladas de um mesmo hospedeiro e isoladas de uma mesma região ficaram em grupos diferentes. Esses dados concordam com outros trabalhos da literatura (7, 18, 27) nos quais não houve correlação entre variabilidade genética dos isolados, origem geográfica e inseto hospedeiro.

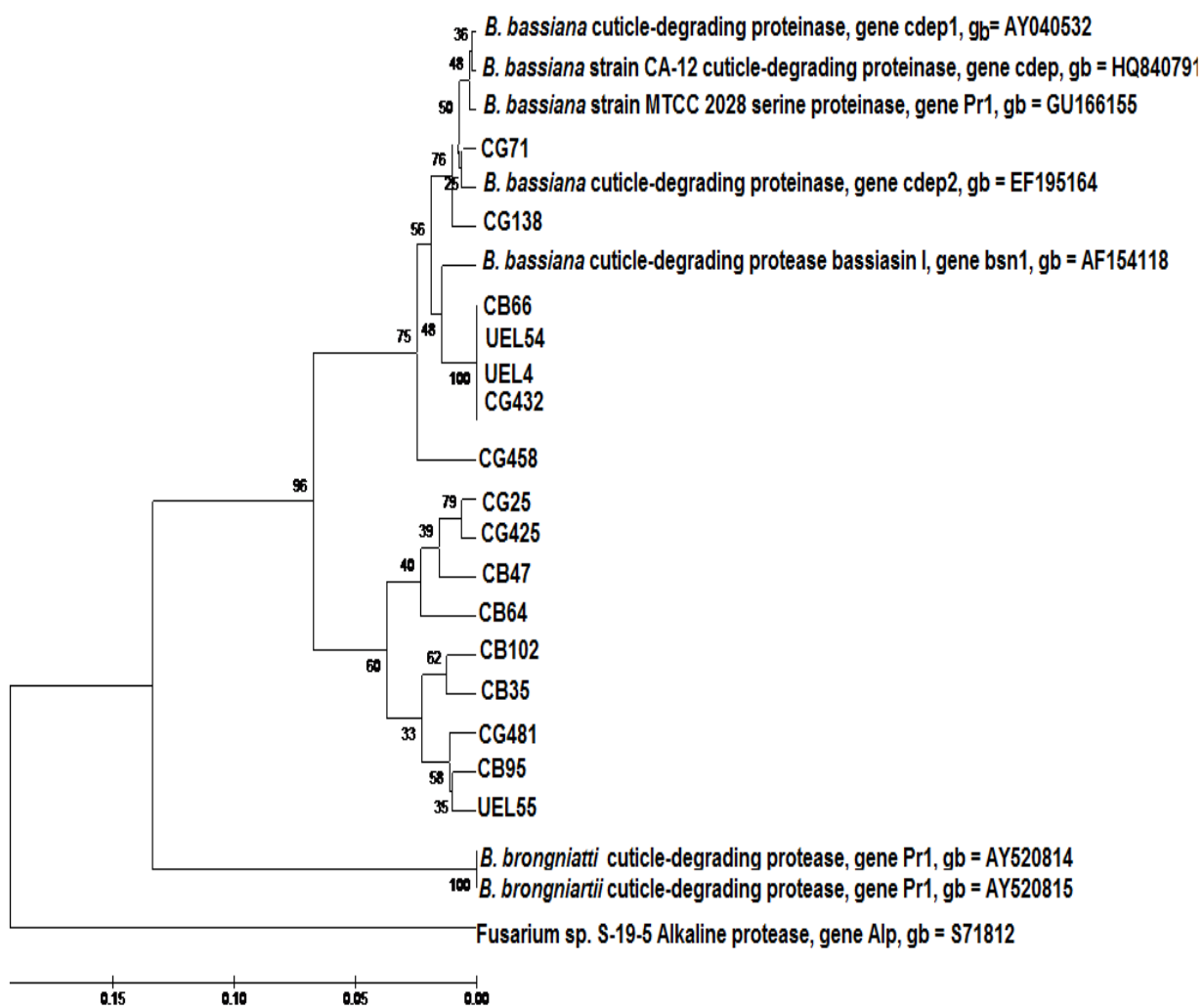


Figura 2. Dendrograma obtido das sequências de DNA do gene da protease de isolados de *B. bassiana*.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem associação entre dados moleculares e hospedeiros, Bidochka et al. (2) sugerem que a estrutura da população relacionando inseto hospedeiro para *B. bassiana* deve ser vista

primeiramente como a co-ocorrência coincidente do micro-organismo patogênico com um inseto suscetível em um determinado habitat.

O fungo *B. bassiana* reproduz preferencialmente via assexual e é predominantemente haplóide. Fungos que se reproduzem via assexual são geralmente menos diversos que os micro-organismos que possuem reprodução sexual devido à ausência de recombinação genética, exceto em casos de hibridização somática e/ou ciclo parassexual que podem compensar a ausência de reprodução sexual. Na maioria dos casos, a única fonte de variação genética desses micro-organismos são as mutações. Apesar de seu modo de reprodução assexual, a espécie *B. bassiana* apresenta uma considerável variabilidade genética devido a sua ampla distribuição geográfica e larga faixa de hospedeiros. Esse polimorfismo genético pode conferir ao micro-organismo uma plasticidade para adaptar e sobreviver em ambientes heterogêneos (3).

Com os resultados desse trabalho esperava-se um padrão polimórfico bastante variado ou pelo menos diferenciado no gene da protease entre as cepas mais e menos virulentas, uma vez que a protease é uma enzima importante durante o processo infeccioso no inseto. 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 sequência do gene da protease 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 (PCR em tempo real) visando compreender melhor o processo de infecção e conseqüentemente a virulência deste fungo.

Os iniciadores desenhados para este trabalho foram eficazes para a amplificação do gene da protease de *B. bassiana* e poderão ser utilizados posteriormente no estudo da expressão desse gene por PCR em tempo real.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: à CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado; ao professor Dr. Pedro M. O. J. Neves pelo fornecimento das cepas de *Beauveria bassiana*; ao Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UFPR pelo auxílio na realização do sequenciamento e ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais.

REFERÊNCIAS

1. Alves SB (1998) Controle microbiano de insetos. Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, 2ª edição.
2. Bidochka MJ, Menzies FV, Kamp AM (2002) Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. Arch. Microbiol. 178: 531-537.
3. Carneiro AA, Gomes AE, Nonato FVL, Britto MAW, Tavares FF, Guimarães TC, Cruz I (2002) Caracterização da Diversidade Genética de Isolados de *Beauveria Bassiana* por RAPD. XXIV Congresso Nacional de milho e sorgo, Florianópolis – SC.
4. Coates BS, Hellmich RL, Lewis LC (2002) *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. Mycol. Res. 106: 40- 50.
5. Dhar P, Kaur G (2010) Production of cuticle - degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. AJAR 4: p. 65-72.
6. Donatti AC, Maia FL, Fungaro MHP, Furlaneto M.C (2008) Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. Curr. Microbiol. 56: p. 256–260.

7. Gaitan A, Valderrama AM, Saldarriaga G, Velez P, Bustillo A (2002) Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. Mycol. Res. 106: 1307-1314.
8. Gupta SC, Leathers TD, Sayed GNE, Ignoffo CM (1992) Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. Exp. Mycol. 16: p.132-137.
9. Hall TA (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. 41: 95-98.
10. Hartree EF (1972) Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48: p. 422-427.
11. Ito ET, Pereira GV, Miyagui DT, Pinotti MHP, Neves PMOJ (2007) Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. Braz Arch Biol Techn. 50: p. 217-223.
12. Joshi L, St. Leger RJ, Bidochka M J (1995) Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiol Lett. 125: p. 211-218.

13. Kalendar R, Lee D, Schulman AH (2011) Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98(2): 137-144.
14. Kim HK, Hoe HS, Suh DS, Kang SC, Hwang C, Kwon ST (1999) Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. *Biotechnol. Lett.* 21: p. 777-783.
15. Lemos SJA, Campos FAP, Silva CP, Xavier -filho J (1990) Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfaciatus* reared on cowpea *Vigna unguiculata* seeds. *Entomol. Exp. Appl.* 56: p. 219-227.
16. Lu D, Pava RM, Li Z, Wang C (2008) Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease. *Appl Microbiol Biotechnol* 3 (38): p. 515-522.
17. Mitina GV, Tokarev YS, Movila AA, Mattila TY (2011) Polymorphism of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) strains isolated from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Moldova. *Ticks Tick Borne Dis.* 2: p. 50–54.
18. Muro MA, Mehta S, Moore D (2003) 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 Microbiol Lett.* 229: p.249-257.

19. Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM (2008) *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *J. Invertebr. Pathol.* 28: p. 267–270.
20. Pinto FGS, Fungaro MHP, Ferreira GM, Inglis MCV, Furlaneto MC (2002) Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genet. Mol. Biol.* 25: p. 231-234.
21. Samuels RI, Paterson IC (1995) Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.* 110b (4): p. 661-669.
22. Uribe D, Khachatourians GG (2004) Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveals high intraspecific variation. *Mycol. Res.* 108 (9): p.1070-1078.
23. Urtz BE, Rice WC (1997) RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptus oryophilus*. *Let. Appl. Microbiol.* 25: 405–409.
24. Xiao G, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang S, Xie XQ, Shang Y, St.-Leger RJ, Zhao GP, Wang C, Feng MG (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci. Rep.* 2 (483): p. 1- 10.

25. Wang C, Fan M, Li Z, Butt TM (2004) Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *J. Appl. Microbiol.* 96: p. 861-870.
26. Wang C, Shah FA, Patel N, Li ZZ, Butt TM (2003) Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Envir. Microbiol.* 10: 908–915.
27. Wang S, Miao X, Zhao W, Huang B, Fan M, Li Z, Huang Y. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats – ISSR (2005) *Mycol. Res.* 109 (12): p. 1364–1372.
28. White T J, Burns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Edited by INNIS M A, GELFAND DH, SNINSKY JJ, WHITE TJ. Academic Press, San Diego, 315 – 322.