



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEANDRO DE BARROS FERRARI

**REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBTILISINAS PELO  
FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana***

---

Londrina  
2008

**LEANDRO DE BARROS FERRARI**

**REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBTILISINAS PELO  
FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina  
2008

**LEANDRO DE BARROS FERRARI**

**REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBTILISINAS PELO  
FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Londrina, 28 de março de 2008.

**Dedico:**

Aos meus pais **José Carlos Ferrari** e **Tânia Maria de Barros Ferrari** pela minha formação; amor, carinho, alegria, otimismo e confiança depositados, além de serem os melhores exemplos por demonstrarem que a felicidade está na simplicidade da vida.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela presença permanente em minha vida; pelo auxílio, esperança e fé recebidos, principalmente nos momentos mais difíceis.

À **Universidade Estadual de Londrina** pelo apoio e incentivo à minha formação.

Ao **Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular** pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho e pela oportunidade de crescimento na vida pessoal e profissional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

À **professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto**, exemplo de profissional ética, dedicada, sincera, amiga e paciente. Muito obrigado por esses dois anos de convívio, pela contribuição ímpar na elaboração deste trabalho e pela confiança, que permitiram meu amadurecimento profissional.

À componente da banca examinadora, **professora Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro**, pela amizade, apoio, disponibilidade de equipamentos e notáveis sugestões para a trabalho.

À componente da banca, **professora Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto-Maia** pelo incentivo, discussões fundamentais e notáveis sugestões para o trabalho.

Aos professores: **Dr. André Luiz Martinez de Oliveira**, **Dr<sup>a</sup> Maria Angélica Ehara Watanabe** e **Dr. Maurilio Antonio Varavallo** pelas dicas, disponibilidade de equipamentos e apoio, fundamentais para elaboração do trabalho.

Ao professor **Dr. Marco Antonio Nogueira** pela disponibilidade de equipamentos.

Às professoras do programa: **Dr<sup>a</sup> Ilce Mara Syllus Cólus** e **Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Dias** por acreditarem e confiarem em mim. Muito obrigado pela oportunidade.

Aos funcionários **Claci** do Departamento de Microbiologia e **João** do Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA). Muito obrigado pela disponibilidade de equipamentos e suporte necessários.

Aos amigos **Marcelo Tempesta de Oliveira** e **Ariane Coelho Donatti** pela receptividade no laboratório, dicas, disponibilidade para ajudar, auxílios direto e indireto no desenvolvimento do trabalho, companheirismo e ótimos momentos de convivência.

Aos amigos **Juliana Laino** pelos ensinamentos da técnica de PCR em tempo real e **Daniel Fávero** pelo auxílio na geração e interpretação dos dados.

Aos amigos do laboratório: **Juliana, Emmanuelle, Henrique, Ana Flávia, Viviane e Jussevânia** pelas inúmeras contribuições, grandes amizades e ótimos momentos de convivência.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos: **Daniele, Lara, Lígia, Carla, Roberta, Daniel, Fram, Mateus, Marla, Julie, Thiago, Patrícia** e **Karen** pelo imenso apoio e amizade.

Aos amigos da graduação e pós-graduação: **Maurício, Yuldi, Márcio, Marisa, Érica, Juliana, Ana Lúcia, Maria Eugênia, Elisângela, Vanessa, Raquel, João, Alexandre Morey, Daniel Silva, Luís, Plínio, Zé Pedro, Bruno Ziroldo** e **Alexandre Garcia**. Muito obrigado por todos os momentos que passamos e apoio oferecido, além da grande amizade.

Aos antigos e melhores amigos: **Paulo, Chiba, Celso, Cacá, Luciana, Clarissa** e **Alessandra**. Muito obrigado por fazerem parte dos momentos mais felizes da minha vida.

A todos da minha família, em especial minhas avós, **Clarice de Barros** e **Aparecida Ferrari**, meus avôs **Moacir Rodrigues de Barros** e **Laudelino Ferrari**, além dos meus irmãos **Thiago de Barros Ferrari** e **Rodrigo de Barros Ferrari**. Muito obrigado pelo amor, carinho, confiança e por torcerem por mim, ajudando-me a

vencer mais esta etapa da minha vida.

À minha namorada **Aline Maria Dantas Gerlin**, por contribuir direta e indiretamente com este trabalho e por ser minha fonte de amor, alegrias e entusiasmo. Muito obrigado por me ajudar em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Amo você!

Aos meus pais **José Carlos Ferrari e Tânia Maria de Barros Ferrari** por significarem tudo para mim e possibilitarem a construção e realização de mais um sonho. Muito obrigado por serem o meu chão e meu porto seguro. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês!!!

"A sabedoria não é um produto da escolaridade,  
mas da tentativa ao longo de uma vida para a obter"

**Albert Einstein**

"Para ser um bom observador é preciso ser um bom teórico"

**Charles Darwin**

"É por retomar o antigo que se aprende o novo, e assim nos tornamos mestres"

**Confúcio**

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação,  
mãe de todo conhecimento” **Leonardo da Vinci**

"Eu descobri que quanto mais eu trabalho, mais sorte pareço ter"

**Thomas Jefferson**

“A sorte favorece a mente bem preparada"

**Louis Pasteur**

Se você não for melhor que hoje no dia de amanhã, então para que você precisa do  
amanhã?"

**Rabbi Nahman de Brastslav**

“Declaro com ufania que sou homem de fé. Creio no poder da oração. Creio nisto  
não só como fiel cristão, mas também como cientista” **Guglielmo Marconi**

“Quem reconhece um plano, um objetivo, uma finalidade e uma intenção na  
Natureza, reconhece também a existência do Criador” **Jakob Von Uexküll**

FERRARI, Leandro de Barros. **Regulação da produção de subtilisinas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana***. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

As proteases extracelulares tem sido demonstradas como determinantes de virulência na patogenicidade dos fungos contra insetos. Neste estudo foi analisada a produção de protease tipo-subtilisina (Pr1) por *Beauveria bassiana* CG425, que é um fungo de interesse para o controle do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides*. Para entender o papel de Pr1 durante a infecção de *R. schistocercoides* foi analisado a secreção desta protease durante o crescimento do fungo em meio contendo nitrato e meio contendo a cutícula. Foi observado um aumento da produção de Pr1 em meio contendo cutícula. As análises de PCR em tempo real revelaram que o nível de expressão relativa de *Pr1Bb* em 12 horas de incubação no meio contendo a cutícula, foi aproximadamente 32 vezes superior ao observado no meio contendo nitrato. Em meio mínimo contendo metionina (0,5%) um alto nível de Pr1 também foi observado. Nestas condições os níveis transcricionais de *Pr1Bb* foi aproximadamente 6 vezes superior em relação ao meio contendo nitrato. Além disso, no meio suplementado com cutícula de gafanhoto, a adição de metionina numa concentração de 0,75% reprimiu a produção desta protease e a expressão de *Pr1Bb*. Os resultados obtidos demonstraram que o gene *Pr1Bb* é regulado por componentes da cutícula de *R. schistocercoides* e pelo aminoácido metionina. Neste estudo foi demonstrado, pela primeira vez, os níveis transcricionais do gene *Pr1* de *B. bassiana* na presença da cutícula de *R. schistocercoides*, ampliando o conhecimento sobre a regulação da produção de Pr1 por este fungo.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*. Subtilisinas (Pr1). Regulação.

FERRARI, Leandro de Barros. **Regulation of the subtilisins production by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana***. 2008. 67f. Dissertation (Master Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

Extracellular proteases have been shown to be virulence factors in fungal pathogenicity towards insects. We examined the production of extracellular subtilisin-like protease (Pr1) by *Beauveria bassiana* CG425, which is a fungus of interest for the control of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides*. To access the role of Pr1 during infection of *R. schistocercoides* we analyzed its secretion during fungus growth in either in nitrate-medium or in cuticle-containing medium. An enhancing effect of cuticle on Pr1 production was observed. Real-time PCR assay revealed that the relative expression level of *Pr1Bb* in 12 h post-incubation in cuticle-containing medium was approximately 32-fold greater than in nitrate-containing medium. In minimal medium containing methionine (0.5%) a high level of Pr1 was also observed. In this culture condition the transcript levels of *Pr1Bb* was approximately 6-fold greater than in nitrate-containing medium. Moreover, in medium supplemented with grasshopper cuticle, the addition of methionine at a concentration of 0.75% repressed protease production and *Pr1Bb* expression. The results obtained have demonstrated that *Pr1Bb* gene is regulated by *R. schistocercoides* cuticle components and by the amino-acid methionine. In this study, we showed for the first time the transcription levels of *B. bassiana Pr1* gene in the presence of *R. schistocercoides* cuticle, extending our knowledge about regulation of Pr1 production in this fungus.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*. Subtilisins (Pr1). Regulation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – 1a- conídios aéreos, 1b- blastosporos, 1c- conídios submersos .....17
- Figura 2** – Curvas de fluorescência de amostras com quantidades de cDNA diferentes, demonstrado pelos Cts distintos, indicados pelas setas...32
- Figure 1** – **(PAPER)** Subtilisin-like (Pr1) activities in culture supernatants from *Beauveria bassiana* CG425. Values are the means of three replicates. The results are means of three independent experiments, with two replicates for each enzymatic assay. Activities are represented as units; bars represent the standard error. MM – minimal médium, MM +cut - MM plus *R. schistocercoides* cuticle (0.5%) .....65
- Figure 2** – **(PAPER)** Relative transcript levels of *Pr1Bb* in cuticle-containing medium by real-time PCR. The relative levels of *Pr1Bb* mRNA in each of the sample was normalized using the Ct obtained for the tubulin gene. The values represent the number of times the gene is expressed in presence of cuticle (0.5%) compared with the sample grown in nitrate-containing medium. The results are averages of three repetitions .....66
- Figure 3** – **(PAPER)** Relative transcript levels of *Pr1Bb* in cuticle-containing medium by real-time PCR. The relative levels of *Pr1Bb* mRNA in each of the sample was normalized using the Ct obtained for the tubulin gene. The values represent the number of times the gene is expressed in minimal medium supplemented with methionine (0.5%) (a) and in minimal medium supplemented with cuticle (0.5%) plus methionine (0.75%) (b) compared with the sample grown in minimal medium (nitrate-containing medium). The results are averages of two repetitions .....67

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Produtos em comercialização a base de *Beauveria bassiana* para controle de insetos pragas.....18
- Table 1** – **(PAPER)** Effect of methionine on production of subtilisin-like (Pr1) protease from *Beauveria bassiana* CG425. The results are means of three independent experiments, with two replicates for each enzymatic assay .....63

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO .....	15
2.2 <i>Beauveria bassiana</i> E O CONTROLE MICROBIANO EE PRAGAS .....	17
2.3 CONTROLE DO GAFANHOTO <i>Rhammatocerus schistocercoides</i> .....	21
2.4 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA.....	23
2.4.1 Regulação da Produção de Proteases .....	25
2.5 RT-PCR EM TEMPO REAL.....	31
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>ARTIGO – REGULATION OF PR1-LIKE PROTEASE PRODUCTION BY THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS <i>Beauveria bassiana</i> USING REAL- TIME RT-PCR 40 ASSAY</b> .....	48
Abstract .....	49
Introduction.....	50
Materials and methods .....	52
Results .....	55
Discussion .....	57
Acknowledgments .....	59
References .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos são os microrganismos mais utilizados para o controle biológico de insetos considerados pragas na agricultura. Possuem algumas vantagens em relação ao controle químico, como a seletividade e especificidade, não afetando, portanto, outros insetos ecologicamente importantes. Além disso, ao contrário de outros entomopatógenos não necessitam serem ingeridos para que se ocorra a infecção (ALVES, 1998a).

Neste contexto, destaca-se a espécie *Beauveria bassiana*, a qual tem sido a mais comumente isolada a partir de insetos na natureza (CHAMPLIN; GRULA, 1979), incluindo os gafanhotos que têm causado danos extensivos às lavouras, principalmente em regiões tropicais como o Brasil. A utilização de *B. bassiana* para o controle de gafanhotos tem se mostrado eficiente (INGLIS et al., 1996; JEFFS et al., 1997; MAGALHÃES et al., 2000).

A enzimas degradadoras de cutícula, principalmente as proteases, representam um importante fator de virulência na patogenia de fungos entomopatogênicos, visto que no geral, as proteínas são os componentes estruturais predominantes na cutícula de insetos (St. LEGER et al., 1988). Duas proteases alcalinas foram caracterizadas em estudos com *Metarhizium anisopliae*, e posteriormente com *Beauveria bassiana*, sendo uma delas com atividade tipo-subtilisina, designada Pr1, a qual apresentou alta atividade sobre cutícula de gafanhoto e elastina (St. LEGER et al., 1987a; St. LEGER et al., 1987b). Além da regulação em função da fonte de carbono, a produção de Pr1 também apresenta um padrão diferencial de expressão em relação ao pH do ambiente no qual o fungo se encontra (St. LEGER et al., 1998; DIAS, 2005).

A regulação de genes que codificam enzimas degradadoras de cutícula é complexa, usualmente envolvendo uma combinação de indução pelo substrato cuticular e repressão por carbono e nitrogênio (St. LEGER et al., 1998). A análise da expressão gênica tornou-se altamente importante nos estudos de regulação gênica, e em muitos campos da pesquisa biológica, sendo a técnica da PCR em tempo real uma das ferramentas utilizadas para este fim e que vem revolucionando o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA (VANDESOMPELE et al., 2002).

## Objetivos

- Analisar a atividade proteolítica de subtilisina tipo-Pr1 no sobrenadante de cultivo de *B. bassiana* após crescimento na ausência e presença de substrato cuticular;
- Analisar a atividade proteolítica após crescimento em diferentes concentrações do aminoácido metionina, na ausência e presença de substrato cuticular;
- Avaliar quantitativamente o transcrito do gene *pr1Bb* após crescimento na ausência e presença de substrato cuticular, empregando a metodologia de RT-PCR em tempo real;
- Avaliar quantitativamente o transcrito deste gene após crescimento em diferentes concentrações do aminoácido metionina, na ausência e presença de substrato cuticular.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Na agricultura, grandes prejuízos são provocados por insetos-pragas que atuam em lavouras economicamente importantes. Isto se deve principalmente ao aumento do desequilíbrio ecológico provocado pelo homem. Estima-se que cerca de 10% das espécies conhecidas de insetos sejam consideradas pragas da agricultura ou pragas urbanas (ALVES, 1998a).

Desde a década de 40 que o controle destes insetos baseia-se no emprego de inseticidas químicos. Os agrotóxicos geralmente empregados apresentam elevado grau de toxicidade, bem como acúmulo nos organismos podendo levar a danos consideráveis ao homem e outros animais, além dos ambientais como a contaminação do solo e água (AZEVEDO; MESSIAS, 1985; BUTT et al., 2001). Evidenciado esses problemas, o interesse pelo uso de microrganismos para o controle de pragas da agricultura aumentou, principalmente a partir da década de 70. O emprego de biopesticidas à base de microrganismos entomopatogênicos têm sido considerado uma opção valiosa principalmente em casos onde os insetos-praga adquirem resistência aos produtos químicos empregados ou quando o custo dos mesmos se torna incompatível com o valor econômico da cultura (BUTT et al., 2001).

O controle biológico de pragas é um processo natural de regulação populacional pelo emprego de inimigos naturais. A utilização de inimigos naturais para o controle de populações de pragas propiciou o surgimento do controle biológico aplicado como uma biotecnologia baseada na utilização de recursos genéticos microbianos, insetos predadores e parasitóides (ANDALO et al., 2004). A utilização de agentes de controle biológico se insere no agronegócio através do controle natural de pragas e doenças de plantas, em substituição ou complementação aos pesticidas químicos no manejo integrado de pragas (ALVES, 1998a).

Vários tipos de patógenos microbianos dentre bactérias, vírus e fungos têm sido utilizados no controle de insetos considerados pragas. A utilização

destes agentes microbianos apresenta vantagens como a especificidade e seletividade, não afetando, portanto, outros insetos ecologicamente importantes. Além disso, o controle é mais duradouro, ocorre diminuição do desenvolvimento de resistência e não causa danos ao ambiente. Seu uso ainda melhora e/ou aumenta a qualidade do produto agrícola e contribui para a preservação dos recursos naturais, aumentando a sustentabilidade dos agroecossistemas. Em geral o bioinseticida é capaz de causar mortalidade nos diferentes estágios de desenvolvimento de um inseto, e em suas gerações seguintes, diminuindo a oviposição, a viabilidade de ovos e aumentando a sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos. Porém há algumas desvantagens quando comparada ao controle químico, como a ação lenta, necessidade de condições ambientais favoráveis como temperatura, umidade, luminosidade e radiação e ainda maiores cuidados no armazenamento visando a manutenção da viabilidade e virulência (ALVES, 1998a).

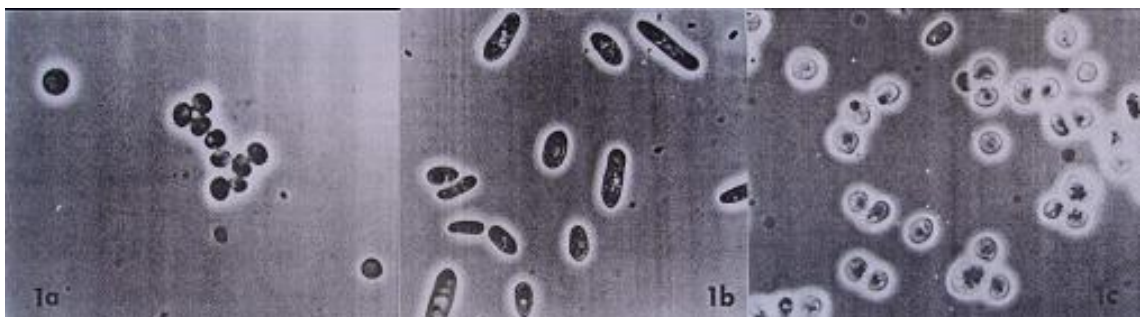
Os fungos são potencialmente os entomopatógenos mais versáteis. Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes a cerca de 90 gêneros e 700 espécies. A maioria dos gêneros relatados ocorrem no Brasil, e mais de 20 destes incidem sobre pragas de importância econômica. Dentre estes, destacam-se espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Asckersonia* e *Entomophthora*. Estes fungos apresentam grande versatilidade, causando danos a artrópodes que vivem em plantas, solos e ambientes aquáticos (SAMSON et al., 1988; TANADA; KAYA, 1993). A ocorrência destes fungos em condições naturais tem sido um fator importante na redução das populações de insetos-praga em nosso país. Embora não se destaque na comercialização de bioinseticida, o Brasil tem tradição nessa área, pois desde a década de 70 comercializa alguns fungos para o controle de alguns insetos, entre eles a *Beauveria bassiana* como controlador do moleque-da-bananeira, e *Metarhizium anisopliae* como controlador da cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) e de pastagens (gêneros *Deois* e *Zulia*) por exemplo (PARRA, 2004).

## 2.2 *Beauveria bassiana* E O CONTROLE MICROBIANO DE PRAGAS

A espécie *B. bassiana* foi primeiramente descrita por Bassi, em 1835, como causadora da “moscardina”, uma doença que atingia as larvas do bicho-da-seda. Foi então denominado como *Botrytis bassiana*, por Giuseppe Balsamo Crivelli, em 1838, recebendo posteriormente várias outras denominações, como *Sporotrichum densum*, *Beauveria densa*, *Sporotrichum globuliferum*, *Beauveria globulifera* e *Beauveria bassiana* (AINSWORTH, 1973). O gênero *Beauveria*, propriamente dito, foi descrito em 1912 por Vuillemin e, a partir de caracteres morfológicos e bioquímicos, seis espécies foram identificadas: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* e *B. vermiconia* (MUGNAI et al., 1989).

Esta espécie pertence à divisão Ascomycota e ordem Hypocrealean (CHO et al., 2006a). Apresenta uma forma de vida única, sendo saprófita facultativo, ou ainda ocorrendo na forma endofítica, como por exemplo, em milho (BING; LEWIS, 1992). *B. bassiana* produz pelo menos três estruturas reprodutivas, sendo estas, conídio aéreo, blastosporos e conídios submersos, as quais apresentam diferentes propriedades morfológicas e bioquímicas (THOMAS et al., 1987; JEFFS et al., 1999). Os conídios aéreos são produzidos em estruturas conidiogênicas a partir de hifas e micélio em superfícies sólidas (HEGEDUS et al., 1992), sendo normalmente empregados como agente infeccioso em práticas de controle biológico.

Os blastosporos representam um estado vegetativo produzido em meios ricos em nutrientes e são liberados a partir da hifa em crescimento e os conídios submersos representam uma adaptação a condições de estresse nutricional (BIDOCHKA et al., 1987) (Figura 1).



**Figura 1** – 1a- conídios aéreos, 1b- blastosporos, 1c- conídios submersos

**Fonte:** Thomas et al. 1987

O fungo *B. bassiana* é de distribuição cosmopolita e pode ser encontrada infectando insetos e em amostras de solo. É parasita natural de um grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos. Em condições laboratoriais pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que no campo podem ocorrer em coleópteros, lepidópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros e ortópteros (ALVES, 1998b). Na agricultura, o potencial de *B. bassiana* foi comprovado para diversos insetos praga. No Brasil existem muitos insetos alvos deste fungo como a broca-do-café, a mosca branca, moleque-da-bananeira, cochonilha, ácaros do mamão e gafanhotos (FARIA; MAGALHÃES, 2001). Para insetos de interesse médico, tem-se o exemplo de *Triatoma infestans* (LUZ et al., 1998).

A espécie *B. bassiana* é o entomopatógeno mais empregado como agente de controle microbiano (BUTT et al., 2001). O grande interesse surgiu por ser o fungo mais comumente isolado de insetos mortos e moribundos na natureza (CHAMPLIN; GRULA, 1979). Destaca-se também por ser um patógeno de um amplo grupo de insetos, incluindo importantes pragas agrícolas, além de insetos vetores de microrganismos patogênicos ao homem e outros animais (LECLERQUE et al., 2004). Vários formulados a base de *B. bassiana* têm sido usados em escala comercial em diversos países (Tabela 1).

**Tabela 1** – Produtos em comercialização a base de *Beauveria bassiana* para controle de insetos pragas

<b>Produto</b>	<b>Alvo</b>	<b>Produtor</b>
Boverin	Besouro do Colorado	Rússia
Boverol e Boverosil	Besouro do Colorado	República Tcheca
Conidia	Broca do café	Live Systems Technology, Colômbia
CornGuard	Broca do milho europeu	Mycotech, USA
Engerlingspilz	Besouros	Andermatt, Suíça
Mycotrol GH	Gafanhotos	Mycotech, USA
Mycotrol WP e BotaniGard	Mosca branca, afídeos	Mycotech, USA

Produto	Alvo	Produtor
Naturalis-L	Pragas do algodoeiro	Troy Biosciences, USA
Ostrinil	Broca do milho	Natural Plant Protection, França
Proecol	Lagartas	Probiagro, Venezuela

Fonte: BUTT et al. (2001)

Alguns laboratórios vêm mantendo coleções de germoplasma visando a seleção de isolados fúngicos mais eficientes para controlar pragas de interesse, bem como fornecerem isolados para programas de melhoramento genético e caracterização molecular dos genótipos. Recentemente Imai (2003), detectou alta variabilidade genética numa coleção de 55 isolados de *B. bassiana* procedentes de várias regiões do mundo e oriundos de diferentes espécies de insetos. Um outro estudo, com 56 linhagens de *B. bassiana* provenientes de várias localidades do mundo, demonstrou que a relação genética entre estas linhagens está mais associada com a localização geográfica das linhagens, do que com as espécies dos insetos hospedeiros (WANG et al. 2003). Nessa mesma linha de estudo, Bidochka et al. (2002) também demonstraram a relação deste fungo entomopatogênico com a localização geográfica, onde observaram que 3 grupos genéticos distintos de *B. bassiana* estavam associados com 3 habitats diferentes (uma floresta, um habitat agrícola e o ártico canadense), e não com o inseto hospedeiro em que estavam colonizando.

Vários trabalhos têm demonstrado a importância deste entomopatógeno para o controle biológico, como, por exemplo, demonstrado por Bajan et al. (1979), onde todas as 36 linhagens de *B. bassiana* testadas contra larvas da mariposa *Galleria mellonella* mostraram-se patogênicas. A eficácia deste fungo foi também comprovada no controle de pragas da cultura de cereais como *Ostrinia nubilalis*, praga do milho (BING; LEWIS, 1992) e a mariposa *Plutella xylostella* (KANG et al., 2005). *B. bassiana* tem sido também utilizada para o controle de insetos- pragas como a broca *Chilo partellus* (MANIANIA, 1993), a mosca Tsetse, *Glossina morsitans morsitans* (KAAYA; MUNYINYI, 1995), e o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (SILVA, 2001), provocando índices elevados de mortalidade

contra estas pragas. Tem sido utilizada também no controle do ácaro vermelho *Oligonychus yothersi* (OLIVEIRA et al., 2002), praga na cultura de erva-mate, ocasionando mortalidade entre 77-98%, em bioensaios de laboratório.

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera, Scolytidae), é considerada a praga mais importante da cultura do café no Brasil (SOUZA & REIS, 1997) e no mundo (BARRERA et al., 1999). Entre os diversos agentes naturais de controle da broca-do-café, tem-se a *B. bassiana* que foi observada em muitos países atacando *H. hampei* (MURPHY; MOORE 1990). No Brasil, ocorre enzooticamente em diversas regiões do país (ALVES, 1998; FARIA; MAGALHÃES, 2001). Na Colômbia esse fungo tem sido amplamente empregado em plantações de café para o controle deste inseto (REITHINGER et al., 1997; BUTT et al., 2001). Ele é considerado o mais importante agente de controle biológico desta praga (VARELA; MORALES, 1996). Também são relatadas taxas de infecção da broca-do-café em campo por esse fungo variando de 20% a 90% (BUSTILLO, 1995; LECUONA et al. 1996). Recentemente, Neves e Hirose (2005) avaliaram a virulência de 61 isolados de *B. bassiana*, originários de diversos hospedeiros e regiões geográficas, para *H. hampei*, e observaram grande variação entre os isolados. Nesse estudo, o isolado CG425 apresentou maior taxa de mortalidade total, mortalidade confirmada e conidiogênese, em relação aos demais isolados testados.

A linhagem CG425 de *B. bassiana* foi testada também quanto a virulência a *R. schistocercoides* e mostrou alta infectividade e capacidade de esporular internamente no hospedeiro em umidades relativas de 53% e 75%, respectivamente (MAGALHÃES et al., 2000).

A infecção de insetos por *B. bassiana* ocorre normalmente via tegumento, onde o fungo germina em 12 a 18 horas, dependendo da presença de nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio). A penetração tegumentar ocorre devido a ações mecânica (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerotizadas) e enzimática. Decorridas 72 horas da inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado (ALVES, 1998). Em particular, as proteases extracelulares produzidas pelo fungo exercem papel chave na hidrólise da cutícula para penetração do fungo através do exoesqueleto (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990). Uma vez na hemocele, o fungo pode produzir metabólitos tóxicos capazes de causar paralisias (DRESNER, 1950), atuar nos hemócitos (MAZET et al., 1994), destruir o balanço fisiológico normal do sistema hospedeiro (SHARMA et al., 1994), interagir

ou escapar dos mecanismos de defesa do inseto (KHACHATOURIANS, 1996) e, em consequência, proliferar-se utilizando os nutrientes solúveis da hemolinfa (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990).

### **2.3 CONTROLE DO GAFANHOTO *Rhammatocerus schistocercoides***

Dentre todos os insetos-pragas, os gafanhotos (Orthoptera: Acrididae) talvez sejam os mais conspícuos. Eles possuem uma alta taxa reprodutiva e são capazes de responder rapidamente a condições climáticas favoráveis. Muitas espécies podem desenvolver um comportamento agregativo e migratório, levando a formação de grandes enxames (LOMER et al., 2001). Sua dieta tem como base, monocotiledônea economicamente importante como à cana-de-açúcar, arroz, milho e pastagens (COSENZA et al., 1994). No Brasil, vinte e três espécies de gafanhotos causam danos economicamente expressivos à agricultura, mas três merecem destaque: *Schistocerca pallens* (Nordeste e Distrito Federal), *Stiphra robusta* (Nordeste) e *Rhammatocerus schistocercoides* (Mato Grosso, Rondônia e Goiás). Esta última parece ter uma distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo em algumas regiões da América do Sul e Central (EMBRAPA, 1997).

A partir de 1983, populações de *R. schistocercoides* trouxeram sérios problemas às zonas recentemente cultivadas e economicamente valorizadas dos estados do Mato Grosso e Rondônia (LECOQ, 1991). Estas zonas são, essencialmente, regiões de cerrado onde a vegetação natural foi substituída por culturas industriais como a soja principalmente além da cana-de-açúcar, arroz e milho (CARBONELL, 1988).

De 1985 a 1989, 5 milhões de dólares foram gastos para o combate da praga no Mato Grosso, sendo 41% deste montante para pulverizações aéreas e 43% na compra de inseticidas e prestação de serviços (EMBRAPA, 1996).

A hipótese vigente, desde o começo dos problemas acridianos no Mato Grosso, supunha a criação de novos biótopos favoráveis ao gafanhoto, devido ao desmatamento intenso das terras, essencialmente cerrados, e sua transformação em zonas de culturas ou pastagens. Evocava-se, igualmente, um desequilíbrio ecológico que teria provocado uma redução significativa dos inimigos naturais dos

gafanhotos, favorecendo suas populações (BARRIENTOS, 1995). Por outro lado, os agricultores consideravam que os gafanhotos se reproduziam principalmente nas zonas de vegetação natural e, em particular, nas reservas indígenas, onde era impossível realizar tratamentos com inseticidas. A reserva dos índios Parecis era constantemente acusada de ser a responsável pela origem da invasão, a qual teria, em seguida, propagado muito rapidamente em direção ao leste do Estado.

Em 1986, o governo brasileiro deu início a um programa nacional de combate ao *R. schistocercoides*, visando esclarecer alguns assuntos: identificação e sistemática da espécie, histórico das populações de gafanhotos no Brasil, área de distribuição, morfologia, pigmentação, existência ou não de um polimorfismo fasário, biologia, ecologia, determinismo das populações, importância econômica, estratégias e propostas de combate para o controle da praga além de incentivo a pesquisas em curso e a serem desenvolvidas (CURTI; BRITO, 1987; COSENZA et al., 1994; BARRIENTOS, 1995). A EMPRAPA utilizou recursos de monitoramento via satélite para caracterizar o biótopo natural dos gafanhotos brasileiros, o que representou o emprego de uma ferramenta inédita para abordagem de um problema entomológico de tal importância econômica (EMBRAPA, 1996).

O potencial de *B. bassiana* para o controle de gafanhotos já é conhecido desde 1936, quando Schaefer reportou que uma grande nuvem do gafanhoto *Nomadacris septemfasciata* (Seville) foi dizimado por este fungo na África do Sul (JEFFS et al., 1997) e altas taxas de mortalidade foram comprovadas também para a espécie *Melanopus sanguinipes* (INGLIS et al., 1996) e *R. schistocercoides* (MAGALHÃES et al., 2000).

Estudos em campo demonstram a virulência contra 30 espécies de gafanhotos, bem como a eficácia do composto diflubenzuron, cujo ingrediente ativo é um inibidor da síntese de quitina. A aplicação de conídios integrados a este produto formulado resultou em maior mortalidade de gafanhotos, mostrando que o produto facilitou a infecção por entomopatógenos (DELGADO et al., 1999).

A cutícula constitui uma barreira físico-química muito eficiente contra a penetração de agentes entomopatogênicos. Ao contrário dos vírus, bactérias e protozoários, que não possuem um mecanismo ativo para a sua penetração, os fungos utilizam mecanismos físicos e enzimáticos para tal. A cutícula possui uma epicutícula delgada de lipídeos e proteínas cobrindo uma procutícula compacta que é composta por microfibrilas de quitina embebidas em proteína. Sua resistência

mecânica deve-se, em grande parte, à sua resistência biológica pela associação destes componentes (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1992; St. LEGER, 1995).

A constituição dos principais componentes da cutícula é variável. Em estudos com a cutícula de gafanhotos, cita-se, por exemplo, *Schistocerca gregaria* que possui a cutícula composta principalmente por proteínas ricas em aminoácidos alanina, glicina e prolina, enquanto fenilalanina foi encontrado em menor proporção (St. LEGER et al., 1996). Já a espécie *Melanoplus sanguinipes* apresenta proteínas covalentemente ligadas ricas em alanina e prolina, sendo que cisteína e metionina estão ausentes na cutícula deste gafanhoto (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1992). Em *Locusta migratoria migratorioides* os principais aminoácidos presentes na cutícula abdominal de fêmeas adultas são glicina, ácido glutâmico, prolina e alanina e que, metionina é o aminoácido presente em menor quantidade (HACKMAN; GOLDBERG, 1987).

## 2.4 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA

A virulência compreende a gravidade dos sintomas da doença no hospedeiro infectado. Nos microrganismos patogênicos, os fatores de virulência estão envolvidos nos vários estágios de desenvolvimento da doença (THOMAS; ELKINTON, 2004). A patogenia é normalmente multifatorial (St. LEGER et al., 1998) e o desenvolvimento da mesma nos insetos é caracterizado por etapas bem definidas: adesão à cutícula do hospedeiro, germinação do conídio, formação do apressório e grampo de penetração, penetração através da cutícula por ação mecânico-enzimática, colonização do corpo do inseto, produção de toxinas, exteriorização, conidiogênese e disseminação (St. LEGER et al., 1991b; ALVES, 1998; CLARKSON et al., 1998).

A penetração do fungo através da cutícula do inseto é facilitada por uma combinação de força mecânica e degradação enzimática. O processo químico depende da ação primária das proteases na hidrólise do componente protéico da cutícula, permitindo a posterior atividade de enzimas quitinolíticas (BIDOCHKA et al., 1997).

A adesão de conídios à cutícula do inseto é o primeiro passo no

estabelecimento da infecção (LECUONA et al., 1991). Ela é dependente da hidrofobicidade da superfície. Em alguns fungos, na extremidade do tubo germinativo, ocorre o apressório. Aqui se inicia o processo de penetração através da cutícula devido à elevada atividade metabólica e produção de enzimas extracelulares (proteases, N-acetilglicosaminidases, lipases e quitinases) (St. LEGER et al., 1998). As enzimas degradadoras de cutícula são os determinantes de virulência mais estudados em fungos entomopatogênicos. Uma vez que as proteínas são os componentes estruturais predominantes da cutícula de insetos (60%), as proteases liberadas durante as primeiras fases de invasão do entomopatógeno e que estão envolvidas na penetração da cutícula, representam então, um importante determinante de virulência (St. LEGER et al., 1988; SMALL; BIDOCHKA, 2005). Diversos estudos têm esclarecido a importância de enzimas proteolíticas no metabolismo fúngico, assim como na patogenia (St. LEGER, 1995; St. LEGER et al., 1996). O efeito destrutivo das proteases pode ser atribuído, pelo menos em parte, à importância estrutural e acessibilidade enzimática dos polímeros de proteína na cutícula. Enquanto as fibrilas de quitina contribuem para a estrutura da cutícula como uma barreira mecânica para a penetração, a interconexão dos polímeros de proteína é vulnerável ao ataque enzimático. Deste modo, as proteases são enzimas modificadoras da cutícula que possibilitam que outras enzimas, principalmente quitinases, tenham acesso ao seu substrato cuticular (St. LEGER, 1995).

Toxinas produzidas por alguns fungos entomopatogênicos têm papel importante na morte do inseto, principalmente se o fungo for capaz de matá-lo mais rapidamente (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). O fungo *B. bassiana*, por exemplo, produz quantidades significativas de toxinas que levam à paralisia muscular e inibição da atividade de hemócitos do hospedeiro (KERSHAW et al., 1999). O patógeno inicia então, um processo de exteriorização à cutícula do cadáver com subsequente produção de estruturas reprodutivas. Os conídios exteriorizados podem ser dispersos pelo vento, chuva e animais, dando início a um novo ciclo de infecção (ALVES, 1998; CLARKSON et al., 1998).

Freimoser et al. (2003) obtiveram bibliotecas de ESTs (Expression Sequences Tags) de duas subfamílias de *Metarhizium anisopliae* quando o fungo se desenvolvia sob condições que maximizavam a secreção de enzimas degradadoras de cutícula. Ambas as subfamílias possuíam ESTs para virtualmente todos os genes já clonados relacionados à patogenicidade e alguns genes que codificam para

potenciais fatores de virulência. As enzimas incluíam proteases, quitinases, fosfolipases, lípases, esterases, fosfatases e enzimas produzindo metabólitos secundários tóxicos. Uma gama diversa de proteases compreendem 36% de todos os ESTs de *M. anisopliae* sf. *anisopliae*.

Posteriormente, Freimoser et al. (2005) analisaram a base molecular do processo de infecção por *Metarhizium anisopliae*. Para tal, utilizaram os microarranjos de cDNA contruídos de uma coleção de clones de ESTs de 837 genes. Foi identificado um amplo espectro de funções biológicas, incluindo a degradação cuticular, na qual se destacam as proteases (ex. subtilisinas). Da mesma forma Wang & St Leger (2005) utilizaram microarranjos incluindo ESTs para verificar as respostas transcricionais de *Metarhizium anisopliae* sf *acidum*, um patógeno específico de gafanhoto, sob cutícula deste hospedeiro e outros substratos cuticulares inespecíficos. Deste estudo, foi observado que os perfis transcricionais obtidos a partir de cutícula de escaravelho e do gafanhoto eram muito similares, apesar da complexidade natural dos componentes da cutícula destes insetos.

#### **2.4.1 Regulação da produção de proteases**

Vários pesquisadores têm dedicado esforços para compreender os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de determinantes de virulência em fungos entomopatogênicos. Dentro deste contexto, os estudos têm sido focados, principalmente, no fungo *Metarhizium anisopliae*. O complexo de enzimas que este fungo secreta durante a penetração e colonização tem sido objeto de vários estudos, uma vez que estas enzimas estão primariamente envolvidas no estágio necrotrófico da patogênese (WALTON, 1996).

A regulação de genes que codificam enzimas degradadoras de cutícula é complexa, usualmente envolvendo uma combinação de indução pelo substrato cuticular e repressão por carbono e nitrogênio (St. LEGER et al., 1998).

Duas proteases alcalinas foram caracterizadas a partir do sobrenadante de cultivo na espécie *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, uma com atividade tipo-subtilisina, designada Pr1 e outra com atividade tipo-tripsina, designada Pr2. Através do emprego de inibidores enzimáticos demonstrou-se que

ambas possuem resíduos de serina e histidina no sítio ativo. A Pr1 apresenta alta atividade sobre cutícula de gafanhoto e elastina, enquanto que a Pr2 hidrolisa caseína e substratos sintéticos contendo arginina ou lisina, mas não apresentou atividade sobre cutícula ou elastina (St. LEGER et al., 1987a). Proteases do tipo Pr1 e Pr2 também foram observadas em sobrenadante de cultivo de *B. bassiana* (St. LEGER et al., 1987b).

Tripsina e subtilisina são cineticamente muito similares hidrolisando peptídeos e substratos ésteres sintéticos. Seus picos de atividade são próximos aos pHs 7 e 8, decaindo em pH baixo (FERSHT, 1977). 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).

As subtilisinas têm sido intensivamente estudadas nas interações fungo-inseto (St. LEGER; SCREEN, 2001). Já as tripsinas são as proteases mais abundantes secretadas por muitos ascomicetos patógenos de plantas (St. LEGER et al., 1997).

A produção de Pr1 e Pr2 apresenta um padrão diferencial de expressão em relação ao pH do ambiente. Independente do meio conter substrato indutível, ambas as enzimas só foram produzidas no pH que elas atuam (pH 8), embora o nível de produção tenha aumentado quando induzida por componentes da cutícula. No processo de penetração do fungo *M. anisopliae* no hospedeiro, o pH dos extratos cuticulares da barata aumentou de 6,3 para 7,7, corroborando com o valor de regulação pelo pH na produção de Pr1 e Pr2. Ainda durante o crescimento deste fungo em culturas líquidas contendo cutícula, houve um aumento do pH devido a liberação de produtos amoniacais derivados da degradação das proteínas cuticulares. Foi concluído que o pH do meio é o fator preponderante para a produção de proteases, já que o fungo testado produz muitas categorias de proteases somente em valores de pH em que elas atuam eficientemente (St. LEGER et al., 1998).

Para *M. anisopliae*, a adição de glucose ou alanina durante a germinação do conídio reprime a formação do apressório e a expressão de protease tipo Pr1, sugerindo a ocorrência de regulação coordenada por repressão catabólica (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). O mesmo foi verificado para Pr2 (St. LEGER et al., 1987a, b; PATERSON et al., 1994b).

Num outro estudo com *M. anisopliae*, as subtilisinas foram agrupadas em quatro grupos: subtilisinas da classe I (Pr1C), que são similares às bacterianas e 3 grupos de subtilisinas de classe II (tipo-proteinase K): subfamília 1 de subtilisinas extracelulares (Pr1A, Pr1B, Pr1G, Pr1I e Pr1K); subfamília 2 de subtilisinas extracelulares (Pr1D, Pr1E, Pr1F e Pr1J) e uma subtilisina endocelular (Pr1H). A subfamília 1 contém genes com 2 a 3 íntrons e 4 sítios de cisteínas conservados, já a subfamília 2 contém genes com até 2 íntrons (sendo ausentes em Pr1E e Pr1F) e nenhum sítio de cisteína conservado. Análises filogenéticas com outros gêneros fúngicos mostraram que a subdivisão de subtilisinas tipo-proteinase K em 3 subfamílias ocorreu antes da especiação da maioria das linhagens, sendo que em *M. anisopliae* a diversificação continuou através de eventos de duplicação gênica após a separação das duas variedades (var. *acridum* e var. *anisopliae*) (BAGGA et al., 2004).

A comparação por homologia de seqüências indica que há diferenças nas funções das subtilisinas, como na especificidade de substratos, estabilidade alcalina e propriedades de adsorção à cutícula. Muito provavelmente, as diferentes subtilisinas podem participar de diversos processos na patogenicidade, aumentando a adaptação e o número de hospedeiros, ou ainda, permitir a aquisição de novos nichos ecológicos. A maior especialização (menos habitats e patogenicidade reduzida) de *M. anisopliae* var. *acridum* é coerente com o número reduzido de subtilisinas, sugerindo a perda da plasticidade patogênica desta espécie. Por outro lado o fungo *M. anisopliae* var. *anisopliae* possui maior variedade de subtilisinas e também de hospedeiros (BAGGA et al., 2004).

Quanto às enzimas degradadoras de cutícula produzidas por *B. bassiana*, foi caracterizado uma protease extracelular alcalina do tipo-serino (Pr1) a qual apresentou alta atividade contra a cutícula de insetos (JOSHI et al., 1995). Proteases do tipo Pr1 e Pr2 produzidas por *B. bassiana* diferem imunologicamente das produzidas por *M. anisopliae* apesar de apresentarem similaridade quanto ao grau de especificidade pelo substrato (SHIMIZU et al., 1993). Foi demonstrado que na presença do inibidor de Pr1 durante a infecção de insetos reduz a capacidade do fungo em causar a sua mortalidade. Além disso, foi observado também que na ausência de Pr1 não ocorria penetração do fungo através da cutícula do inseto (St. LEGER et al., 1988). O papel da Pr1 na degradação localizada de proteínas cuticulares foi corroborado pelo fato de que esta enzima foi a principal protease

produzida por estruturas como apressório e tubos germinativos, durante a infecção (St. LEGER et al., 1989).

Estudos têm sido realizados para avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na atividade da subtilisina de *B. bassiana*. Para isso, foram utilizados vários meios de cultura diferentes suplementados com carbono provenientes tanto de fontes simples quanto complexas e observaram que a subtilisina foi secretada em todos eles, embora em quantidades diferentes e também foi detectada uma maior atividade da subtilisina em meio suplementado com cutícula de inseto a 1 % (CAMPOS et al., 2005).

Nesse mesmo estudo, as maiores atividades proteolíticas foram observadas quando o fungo era crescido na presença do substrato cuticular, enquanto o aminoácido alanina, que é um dos principais componentes da cutícula do carrapato, inibiu a secreção de proteases (CAMPOS et al., 2005). Em outro estudo, a ausência de alanina sempre resultou em baixa frequência de germinação e crescimento da hifa de *B. bassiana*, demonstrando que, embora o fungo não tenha requerimentos específicos de aminoácidos individuais, alguns são preferencialmente utilizados para seu desenvolvimento. Foi observado também que dos diversos aminoácidos testados, três são necessários para uma boa germinação e crescimento, embora tenha sido observada germinação em menor extensão quando alanina, histidina ou fenilalanina foram testadas individualmente (SMITH; GRULA, 1981).

Ao estudar a produção de proteases extracelulares pelo isolado CG425 de *B. bassiana*, em meio de cultura na presença e ausência de cutícula de *R. schistocercoides*, foram detectadas proteases tipo subtilisina (Pr1) e tripsina (Pr2). Níveis significativos de Pr1 foram observados após 48 de incubação em presença de substrato cuticular. Os resultados obtidos sugerem que a produção de ambas proteases é induzida por componentes cuticulares, mas que estas possuem sistemas de regulação distintos (DONATTI, 2004). Segundo estes autores o aminoácido metionina parece ter ação regulatória na produção de proteases do tipo-Pr1, uma vez que tanto a indução quanto a repressão foi dependente da concentração deste aminoácido no meio de cultivo (DONATTI et al., 2008). Scully e Bidochka (2006), usando um mutante de *Aspergillus flavus* com um requerimento para metionina, mostraram o papel da nutrição no envolvimento das relações patógeno-hospedeiro.

O isolado CG425 foi também avaliado quanto a produção de proteases tipo Pr1 e Pr2, em presença de cutícula de *H. hampei*. A produção destes tipos proteolíticos foi analisada em meio de sais (nitrato como fonte de nitrogênio) e em meio contendo cutícula, tanto em condições tamponadas quanto não tamponadas.

Os resultados obtidos evidenciaram que a produção destes tipos proteolíticos é induzida por componentes presentes na cutícula do inseto e que o pH do meio de cultivo é um fator determinante para a sua expressão (DIAS, 2005).

Diversos trabalhos relatam a clonagem e sequenciamento de genes que codificam proteases degradadoras de cutícula. Foi clonado um gene que codifica para 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, da mesma forma que para Pr1A e Pr1B de *M. anisopliae*. Deste estudo concluiu-se que a Pr1 produzida por *B. bassiana* desempenha papel na degradação de cutícula, semelhante ao observado para *M. anisopliae* (JOSHI et al., 1995).

Joshi et al. (1994) isolaram um RNAm a partir de *B. bassiana* crescida em 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 encontram-se no 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).

Num estudo de polimorfismo do gene da subtilisina A de *B. bassiana*, através da análise de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos preditos detectou-se 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 subdividem os isolados brasileiros de *B. bassiana* em três grupos (RIBEIRO, 2005). 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 Pr1A descritos para *M. anisopliae*.

O gene Pr1A de *M. anisopliae* é constituído de 1371 bases. Wang et al., (2005) analisaram a seqüência de nucleotídeos de uma porção deste gene em 23 linhagens desta espécie e observaram que este gene contém 3 introns inseridos de forma conservada nas diferentes linhagens analisadas. Os introns 1 (76 pb) e 2 (59 pb) possuem o mesmo tamanho em todas as linhagens analisadas, enquanto que para o intron 3 foram observadas dois diferentes tamanhos, 68 e 72 pb. Segundo Ribeiro (2005), o gene Pr1 de *B. bassiana* também 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, tal como observado 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*.

O conhecimento dos aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na produção de proteases e quitinases por fungos entomopatogênicos têm progredido nos últimos anos, mas ainda não se tem uma compreensão global do seu papel na patogenia. A função exata de cada enzima degradadora de cutícula, bem como de suas diferentes isoformas na patogenicidade pode ser acessada pela disrupção gênica através de mutagênese. Um aumento na compreensão destes fatores de virulência pode finalmente direcionar a geração de linhagens geneticamente construídas mais adaptadas para o controle de insetos-praga (St. LEGER et al., 1998).

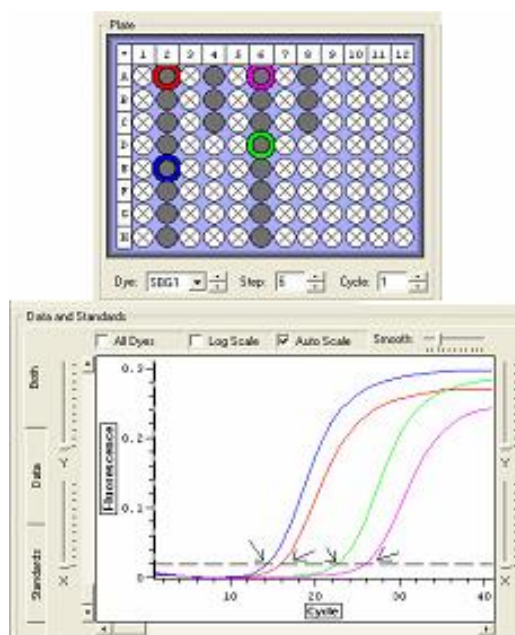
## 2.5 RT-PCR EM TEMPO REAL

A análise da expressão gênica é altamente importante em muitos campos da pesquisa biológica. Espera-se que com a compreensão dos padrões de expressão gênica será possível uma visão mais aprofundada das complexas redes regulatórias que irá provavelmente conduzir à identificação de genes relevantes para novos processos biológicos, ou implicações em doenças (VANDESOMPELE et al., 2002).

Duas metodologias recentemente desenvolvidas para medição da abundância de transcritos ganharam mais popularidade e são freqüentemente aplicadas: (i) Os microarranjos, que são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos (RNAm na forma de cDNA ou DNA genômico) provenientes de amostras biológicas, as quais são postas para hibridar com o DNA fixado no *array* (hibridação por complementariedade de bases). A detecção é possível, pois, as amostras são marcadas com fluorocromos. A alta performance desta técnica é devido à determinação da expressão diferencial de milhares de genes num único experimento (SCHENA et al., 1995); (ii) A PCR em tempo real, que fornece a medição simultânea da expressão gênica em muitas amostras diferentes para um limitado número de genes, e é especialmente adequada quando um número reduzido de células está disponível (FINK et al., 1998; HEID et al., 1996; HIGUCHI et al., 1993). Ambas as técnicas tem vantagens, por gerarem resultados rapidamente devido ao alto grau de mecanização, comparados com os métodos convencionais de quantificações, como as análises de northern-blots e a RT-PCR. No entanto, semelhantemente às tecnologias tradicionais, estas metodologias requerem o mesmo cuidado na normalização dos dados, afim de se quantificar o RNAm de interesse (VANDESOMPELE et al., 2002).

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* ( $C_T$ ). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera

um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representa a quantidade de produto amplificado (<http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp>, acesso em 2007) (Figura 2).



**Figura 2** – Curvas de fluorescência de amostras com quantidades de cDNA diferentes, demonstrado pelos Cts distintos, indicados pelas setas.

Atualmente quatro são os tipos de fluoróforos utilizados para o PCR em tempo real, os quais possibilitam a detecção dos produtos de PCR devido a geração de um sinal fluorescente. São eles: TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Molecular Beacons, Scorpions® e SYBR® Green (Molecular Probes) (<http://www.ambion.com/techlib/basics/rtqpcr/> - RT-PCR *the Basics* – acesso em 2007)

Um dos compostos mais utilizados é *SYBR® Green*. Ele se liga na dupla-fita do DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens deste são, seu baixo custo, a facilidade no uso e sensibilidade. As desvantagens é que ele irá se ligar a qualquer dupla-fita do DNA na reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos da reação, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. Para reação de PCR, o *SYBR® Green* apresenta-se eficiente,

demonstrando falsos background inespecíficos somente nos últimos ciclos de uma reação com excesso de ciclos (<http://www.ambion.com/techlib/tn/81/813.html>, acesso em 2007).

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o *SYBR® Green*. As moléculas não ligadas do *SYBR® Green* apresentam fluorescência fraca produzindo sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do *SYBR® Green* podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase as moléculas do *SYBR® Green* vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do *SYBR® Green* são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (VITZTHUM et al., 1999).

O RT-PCR em tempo real pode apresentar duas etapas, as quais separam a reação de transcrição reversa, da análise de PCR em tempo real, permitindo diferentes resultados e análises de PCR em tempo real sobre diluições de uma amostra de cDNA simples. Esta metodologia torna-se importante na medida em que se evidencia que o processo da PCR em tempo real possui notoriamente uma variação entre as reações, e, portanto, em sua eficiência, que pode ser altamente variável, a medida que se parte de quantidades de cDNA aleatórias resultantes da RT-PCR. As diluições até uma concentração específica semelhantes asseguram que as reações na PCR em tempo realizadas obtenham uma eficiência aumentada e mais homogênea que promovem a obtenção de melhores resultados. Entretanto os protocolos destas duas etapas permitem o aumento da ocorrência de contaminação das amostras de RNA e também de cDNA o que poderia comprometer as análises através da PCR em tempo real (WONG; MEDRANO, 2005).

A escolha do método de quantificação depende da seqüência alvo, da quantidade esperada de RNAm presente na amostra, o grau de precisão solicitado e se a quantificação necessita ser relativa ou absoluta (FREEMAN et al., 1999). Geralmente dois tipos de quantificações são possíveis na PCR em tempo real: (i) uma quantificação absoluta que se baseia numa curva de calibração interna

ou externa (MORRISON et al., 1998; PFAFFL, 2001). Este método determina o número de cópias do ácido nucléico de interesse, interpolando os dados da PCR numa curva padrão (KENNETH; SCHMITTGEN, 2001); (ii) uma quantificação relativa que se baseia numa expressão relativa de gene alvo versus um gene de referência. Para investigar as mudanças fisiológicas na expressão gênica, a quantificação relativa é adequada para maioria dos propósitos (PFAFFL, 2001). Os genes de controle interno são mais freqüentemente usados para normalizar a fração de RNAm. Este controle interno, freqüentemente referido como gene *housekeeping*. Estes genes estão presentes em todos os tipos celulares nucleados e são necessários para sobrevivência básica da célula (MARTEN et al., 1994; FOSS et al., 1998; THELLIN et al., 1999). Os principais genes de referência utilizados para PCR em tempo real são: GAPDH, albuminas, actinas, tubulinas, ciclophilinas, RNAr 18S e RNAr 28S (THELLIN et al., 1999).

Recentemente alguns trabalhos demonstram a importância da PCR em tempo real para fungos filamentosos. Lopes-Errasquín (2006) desenvolveram uma análise específica utilizando a RT-PCR em tempo real para quantificar o nível de expressão de dois genes do cluster (*fum1* e *fum19*) da via biossintética da fumonisina em *Fusarium verticillioides*. O nível de expressão de ambos os genes foram comparados com a quantidade de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), medida por HPLC, produzida por diversas linhagens de *F. verticillioides* em cultura líquida. Os resultados indicaram uma boa correlação entre os níveis de expressão desses genes e a produção de fumonisina B<sub>1</sub>. Esta análise demonstrou-se vantajosa, pois houve uma detecção e caracterização rápidas e específicas da habilidade em potencial das linhagens de *F. verticillioides* para produzirem fumonisinas.

Mayer et al. (2003) utilizaram a PCR em tempo real para detectar linhagens de *Aspergillus flavus* produtoras de aflatoxina em milho, pimenta e pimentão. O número de cópias do gene que faz parte da via biossintética desta toxina (*nor-1*) foi comparado com os dados de cfu obtidos do mesmo grupo de amostras. No geral, uma boa correlação entre o número de cópias deste gene e os dados de cfu foram observados.

Schmidt et al. (2004) utilizaram a PCR em tempo real com o objetivo de detectar e quantificar o DNA de *Aspergillus ochraceus* produtores de ocratoxinas em café e comparar os resultados com o conteúdo de ocratoxina A presentes em 30 amostras de café naturalmente contaminadas. Uma correlação positiva entre o

conteúdo de ocratoxina A e a quantidade de DNA foi verificado.

Tartar et al. (2005) estudaram a expressão diferencial dos genes de uma quitina sintase (CHS) e de uma glucana sintase (FKS) correlacionado com a formação de uma parede celular fina modificada produzidas *in-vivo* por células de *Beauveria bassiana*. As reações de RT-PCR demonstraram que estes dois genes de *Beauveria bassiana* são menos expressos *in-vivo* em comparação com análises *in-vitro*. Estas análises indicaram que estas células *in vivo* disparam modificações fenotípicas, incluindo ajustes da parede celular, e mecanismos moleculares controlados que incluem a regulação da expressão gênica a níveis transcricionais.

### 3 REFERÊNCIAS

AINSWORTH, G. C. Introduction and keys to higher taxa. In: Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., Sussman, A. S. (eds.). **The fungi: an advanced treatise**. New York: Academic Press, vol. IVA, 1973.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, 2ª edição, 1998.

ALVES, B. S. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, B. S. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 21-37, 1998a.

ALVES, B. S. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, B. S. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 289-381, 1998b.

AMBION – THE RNA COMPANY. Real-time PCR Goes Prime Time. Disponível em <<http://www.ambion.com/techlib/tn/81/813.html>>. Acesso em 25 de junho de 2007, 16:35 hrs.

AZEVEDO, J. L.; MESSIAS, C. L. Aspectos genéticos de controle biológico de insetos por fungos. In: AZEVEDO, J. L. (coord.) **Genética de Microorganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética**. Piracicaba: FEALQ, p. 111-114, 1985.

ANDALO, V.; MOINO, A.; SANTA-CECILIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with chemical pesticides for the control of the coffee root mealybug *Dysmicoccus texensis* tinsley (Hemíptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 463-467, 2004.

BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S. E.; St. LEGER, R. J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 324, p. 159-169, 2004.

BAJAN, C.; KALALOVA, S.; KMITOWA, K.; SAMSINAKOVA, A.; WOJCIECHOWSKA, M. The relationship between infectious activities of entomophagous fungi and their production of enzymes. **Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences**, v. 27 (11), p. 963-968, 1979.

BARRERA J. F.; MOORE D.; ABRAHAM Y. J.; MURPHY S. T.; PRIOR C. Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in Mexico and possibilities for further action. **Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases**, v. 4, p. 391–396, 1990.

BAKER, P. S. The coffee berry borer in Colombia. Final report of the DFID-Cenicafé – CABI Bioscience IPM for coffee project. **DFID – Cenicafé**. Chinchiná (Colombia), 1999. 154 p.

BARRIENTOS, L. L. The present state of the locusts and grasshopper problem in Brazil. **Journal of Orthoptera Research**, v. 4, p. 61-64, 1995.

BIDOCHKA, M. J.; PFEIFER, T. A.; KHACHATOURIANS, G. G. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. **Mycopathologia**, v. 99, p. 77–83, 1987.

BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanopus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 56, p. 362-370, 1990.

BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 165-173, 1992.

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.; MENZIES, F. V.; KAMP, A. M. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Archives of Microbiology**, v. 178, p. 531-537, 2002.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: The influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Huebner). **Biocontrol Science and Technology**, v. 2 (1), p. 39-47, 1992.

BUSTILLO, A. E. Utilización del control biológico clásico em um programa de manejo integrado: el caso de la broca Del café *Hypothenemus hampei*, en Colômbia. In: **Manejo Integrado de Plagas: Curso Internacional**. Instituto Agropecuario, Santa Fé de Bogotá, Colômbia, p. 143-148, 1995.

BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Eds.). **Fungi as biocontrol agents**, CABI Publishing, Wallingford, Oxford, USA, 2001.

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

CARBONELL, C. S. *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906), especie perjudicial para la agricultura en la region centro oeste de Brasil (Orthoptera, Acrididae, Gomphocerinae), **Boletim do Museo Nacional de Rio de Janeiro, Zoologia**, v. 318, p. 1-17, 1988.

CHAMPLIN, F. R.; GRULA, E. A. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37 (6), p. 1122-1126, 1979.

CHO, E.-M.; LIU, L.; FARMERIE, W.; KEYHANI, N.O. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, in vitro blastospores and submerged conidia. **Microbiology**, v. 152, p. 2843-2854, 2006a.

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

CLARKSON, J. M.; SCREEN, S.; BAILEY, A.; COBB, B.; CHARNLEY, K. Fungal pathogenesis in insects. In: **Molecular variability of fungal pathogens**. CAB International, 1998.

COSENZA, G. W.; RIBEIRO, J. G. B.; CARVALHO, J. S. **Programa Nacional de controle de Gafanhotos. Manual Técnico**. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. EMBRAPA-SP, Brasília, DF, 1994. 34p.

CURTI, J. B.; BRITO, J. S. National Program of locust control. **Ministério da Agricultura/SDSV**, Brasília, 1987.

DELGADO, F. X.; BRITTON, J. H.; ONSAGER, J. A.; SWEARINGEN, W. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savanna grasshopper complex (Orthoptera) in Mali. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 34-39, 1999.

DHARMARAJ, S. RT-PCR: The basics. Disponível em <<http://www.ambion.com/techlib/basics/rtpcr/>>. Acesso em 25 de julho 2007, 19:43 hrs.

DIAS, B. A. Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Tese (Mestrado em Microbiologia)**- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2005. 73p.

DONATTI, A. C. Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)** - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2004. 46p.

DONATTI, A. C.; FURLANETO-MAIA, 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, 2008.

DRESNER, E. The toxic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on insects. **Journal of the New York Entomology Society**, v. 58, p. 269-278, 1950.

EMBRAPA. **Relatório final do projeto Meio ambiente e gafanhotos-pragas no Brasil**. 1996. Disponível em: <<http://www.gafanhotos.cnpm.embrapa.br>>. Acesso em 03 de agosto de 2007, 22:50 hrs.

EMBRAPA. **Meio ambiente e gafanhotos pragas no Brasil**. 1997. Disponível em: <<http://www.nma.embrapa.br/projetos/gafa-mt/ind.html>>. Acesso em 07 de setembro de 2007, 11:43 hrs.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento**, n. 22, p. 18-21, 2001.

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

FINK, L.; SEEGER, W.; ERMERT, L.; HANZE, J.; STAHL, U.; GRIMMINGER, F.; KUMMER, W.; BOHLE, R.M. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. **Nature Medicine**, v. 4. p. 1329-1333, 1998.

FOSS, D. L.; BAARSCH, M. J.; MURTAUGH, M. P. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$  – actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. **Animal Biotechnology**, v. 9, p. 67-78, 1998.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, v. 26, p. 112-122, 1999.

FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; St. LEGER, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239-247, 2003.

FREIMOSER, F. M.; HU, G.; St. LEGER, R. J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. **Microbiology**, v. 151, p. 361-371, 2005.

HACKMAN R. H.; GOLDBERG. M. Comparative study of some expanding arthropod cuticles; the relation between composition, structure and function. **Journal of insect physiology**, v. 33, p. 39-50, 1987.

HEGEDUS, D. D.; BIDOCHKA, M. J.; MIRANPURI, G. S.; KHACHATOURIANS, G. G. A comparison of the virulence, stability, and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 785–789, 1992.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnonology**, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

IMAI, E. Y. Caracterização Molecular dos isolados de *Beauveria bassiana* mantidos na Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Universidade Estadual de Londrina.

**Monografia de Conclusão de Curso.** Universidade Estadual de Londrina, 2003. 58p.

INGLIS, G. D.; JOHNSON, D. L.; GOETTEL, M. S. An oil-bait bioassay method used to test the efficacy of *Beauveria bassiana* against grasshoppers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 312-315, 1996.

JEFFS, L. B.; FENG, M. G.; FALKOWSKY, J. E.; KHACHATOURIANS, G. G. Infection of the migratory grasshopper (Orthoptera: Acrididae) by ingestion of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Economic Entomology**, v. 90 (2), p. 383-390, 1997.

JEFFS, L. B.; XAVIER, I. J.; MATAI, R. E.; KHACHATOURIANS, G. G. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 45, p. 936-948, 1999.

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.

KAAYA, G. P.; MUNYINYI I, D. Biocontrol potentials of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies, *Glossina spp.* At developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, p. 237-241, 1995.

KANG, S. W.; LEE, S. H.; YOON, C. S.; KIM, S. W. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 135-139, 2005.

KENNETH, J. L.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C}$  Method. **Applied Biosystems**, v. 25, p. 402-408, 2001.

KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 213-223, 1999.

KHACHATOURIANS, G. G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: HOWARD, D. E.; MILLER, J. D. (Ed.). **The Mycota VI. Human and relationships**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p. 331-363, 1996.

LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHUTZ, A.; CHEN, S.; MITINA, G. V.; ZIMMERMANN, G.; SCHAIRER, H. U. Abrobacterium-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, v. 45, p. 111-119, 2004.

LECOQ, M. Gafanhotos do Brasil. Natureza do problema e bibliografia. Montpellier (France), **Embrapa-NMA and Cirad-Prifas**, 1991. 158p.

LECUONA, R. E.; RIBA, G.; CASSIER, P.; CLEMENT, J. L. I. Alternation of insect epicuticula hidrocarbon during infection with *Beauveria bassiana* or *B. Brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 10-18, 1991.

LECUONA, R. E.; MILANI, M. S.; DIAS, B. M. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25 (2), p. 299-307, 1996.

LOMER, C. J.; BATEMAN, R. P.; JOHNSON, D. L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. B. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 667-702, 2001.

LÓPES-ERRASQUÍN E.; VÁZQUEZ C.; JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ-JAÉN M. T. Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of fum1 and fum19 genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 1, p. 1-6, 2006.

LUZ, C.; TIGANO M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93 (6), p. 839-846, 1998.

- MAGALHÃES, B. P.; GOETTEL, M. S.; FRAZÃO, H. S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 162-164, 2000.
- MANIANIA, N. K. Effectiveness of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. For the control of the stem borer *Chilo partellus* in maize in Kenya. **Crop Protect**, v. 12, p. 601-604, 1993.
- MARTEN, N. W.; BURKE, E. J.; HAYDEN, J.M.; STRAUS, D. S. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. **FASEB Journal**, v. 8, p. 538-544, 1994.
- MAZET, I.; HUANG, S. Y.; BOUCIAS, D. G. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected Spodoptera exigua larvae. **Experientia**, v. 50 (2), p. 142-147, 1994.
- MAYER, Z.; BAGNARA, A.; FARBER, P.; GEISEN, R. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 143-151, 2003.
- MORRISON, T.; WEIS, J. J.; WITTWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, p. 954-962, 1998.
- MUGNAI, L.; BRIDGE, P. D.; EVANS, H. C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**, v. 92 (2), p. 199-209, 1989.
- MURPHY, S. T.; MORRE D. Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), previous programmer and possibilities for the future. **Biocontrol News and Information**, v. 11, p. 107-117, 1990.
- NCI-FREDERICK. What is Real-Time Quantitative PCR? Disponível em: <<http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp>> Acesso em 22 de maio de 2007, 10:30 hrs.
- 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 (1), p. 77-82, 2005.

OLIVEIRA, R. C.; ALVES, L. F. A.; NEVES, P. M. O. J. Suscetibilidade de *Oligonychus yothersi* (Acari: Tetranychidae) ao fungo *Beauveria bassiana*. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 187-189, 2002.

PARRA, J. R. P. Controlando pragas com inimigos naturais. **Ciência Hoje**, v. 35 (210), p. 18-23, 2004.

PATERSON, I. 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, 1994a.

PATERSON, I. C.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M.; CLARKSON, J. M. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p. 3153-3159, 1994b.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R.; CADENA, H.; ALEXANDER, B. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against phlebotomine sand flies in colombian coffee plantations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 131-135, 1997.

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.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LATGÉ, J. P. Atlas of entomopathogenic fungi. **Springer-Verlag**, 1988. 187p.

SCHEHA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467-470, 1995.

SCHMIDT, H.; BANNIER, M.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 464-469, 2004.

SCULLY, L. S.; BIDOCHKA, M. J. A cysteine/methionine auxotroph of the opportunistic fungus *Aspergillus flavus* is associated with host-range restriction: a model for emerging diseases. **Microbiology**, v. 152, p. 223-232, 2006.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P.; TAJAK, R. C. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 32 (3), p. 168-171, 1994.

SHIMIZU, S.; TSUCHITANI, Y.; MATSUMOTO, T. Serology and substrate specificity of extracellular proteases from four species of entomopathogenic hyphomycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 192-195, 1993.

SILVA, C. A. D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 243-247, 2001.

SMALL, C. L.; BIDOCHKA, M. J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 109, p. 307-313, 2005.

SMITH, R. J.; GRULA, E. A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 222-230, 1981.

SOUZA, J. C.; REIS P. R. Broca-do-café – histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. **Epamig. Boletim Técnico**, 50, 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte, 1997. 40p.

St. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the intomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, p. 221-232, 1987a.

St. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 258, p. 121-131, 1987b.

St. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 285-293, 1988.

St. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 253-262, 1989.

St. LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168-179, 1991b.

St. LEGER, R. J. The role of cuticle degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1119-1125, 1995.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, W. D. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, p. 6349-6354, 1996.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, v. 143, p. 1983-1992, 1997.

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

St. LEGER, R. J.; SCREEN, S. E. Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds. **Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**, p. 219-238, 2001.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. San Diego, Academic Press, 1993. 666p.

TARTAR, A.; ALEXANRA M. S.; DANCIA, W. S.; DRION, G. B. Differential expression of chitin syntase (CHS) and glucan syntase (FKS) genes correlates with the formation of a modified, thinner cell wall in *in vivo*-produced *Beauveria bassiana* cells. **Mycopathologia**, v. 160, p. 303-314, 2005.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 291-295, 1999.

THOMAS, K. C.; KHACHATOURIANS, G. G.; INGLEDEW, W. M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal Microbiology**, v. 33, p. 12–20, 1987.

THOMAS, S. R.; ELKINTON, J. S. Pathogenicity and Virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 146-151, 2004.

VANDEDOMPELE J.; DE PAEPE A.; SPELEMAN F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR Green I real-time RT-PCR. **Analytical Biochemistry**, v. 303 (1), p. 95-98, 2002.

VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 147-152, 1996.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, v. 276 (1), p. 59-64, 1999.

WALTON, J. D. Host-selective toxins: agents of compatibility. **Plant Cell**, v. 8, p. 1723- 1733, 1996.

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

WANG, C.; St. LEGER, R. J. Developmental and Transcriptional Responses to Host and Nonhost Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukariotic Cell**, v. 4, p. 937-947, 2005.

WANG, C.; BUTT, T. M.; St. LEGER, R. J. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, v. 151, p. 3223-3236, 2005.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39 (1), p. 75-85, 2005.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**ARTIGO:** Regulation of Pr1-like protease production by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using real-time RT-PCR assay

L.B. Ferrari, D. Favero and M.C. Furlaneto

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Londrina -PR, Brazil.

**Correspondence** Marcia Cristina Furlaneto. Universidade Estadual de Londrina. Department of Microbiology, Londrina -PR, Brazil. P.O. Box 6001, 86051-990. Tel.: +55(43)33715736; Fax: +55(43)33714207; e-mail: [furlaneto@uel.br](mailto:furlaneto@uel.br)

Regulation of Pr1-protease from *B. bassiana*

**Abstract**

**Aims:** To analyze the production and regulation of Pr1-like protease from a native isolate of *Beauveria bassiana* (CG425) which is a fungus of interest for the control of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides*.

**Methods and Results:** We analysed the production of Pr1-like protease during fungus growth in either in nitrate-medium or in cuticle-containing medium. An enhancing effect of cuticle on Pr1 production was observed. Real-time PCR assay revealed that the relative expression level of *Pr1Bb* in 12 h post-incubation in cuticle-containing medium was approximately 32-fold greater than in nitrate-containing medium. In minimal medium containing methionine (0.5 %) a high level of Pr1 was also observed. In this culture condition the transcript levels of *Pr1Bb* was approximately 6-fold greater than in nitrate-containing medium. Moreover, in medium supplemented with grasshopper cuticle, the addition of methionine at a concentration of 0.75 % repressed protease production and *Pr1Bb* expression.

**Conclusions:** The results obtained have demonstrated that *Pr1Bb* gene is regulated by *R. schistocercoides* cuticle components and by the amino-acid methionine.

**Significance and impact of the study:** In this study, we showed for the first time the transcription levels of *B. bassiana Pr1* gene in the presence of *R. schistocercoides* cuticle, extending our knowledge about regulation of Pr1 production in this fungus.

## Introduction

Grasshoppers are one of the major pests of agricultural crops worldwide. Outbreaks of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn) in Central-Brazil has been considered a long-standing phenomenon, both in terms of their extend and nature (Lecoq and Pierozzi, 1995). Control strategies for grasshoppers rely to a large extent on the use of chemical insecticides. However, increased concern as to their impact on the environment and human health has directed research towards the development of alternative control strategies for the control of grasshoppers (Lomer *et al.* 2001). Environmentally sustainable approaches to grasshopper control may be possible through the use of biopesticides based on entomopathogenic fungi. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin has been described as one of the promising fungal species for development as a biological control agent for grasshoppers, some isolates of which have been commercialized (Bidochka *et al.* 1997; Butt *et al.* 2001).

In a survey for fungal pathogens of grasshoppers, Moreira *et al.* (1996) found an isolate of *B. bassiana* (CG425), which has been successfully demonstrated to elicit high mortality in *R. schistocercoides* (Magalhães *et al.* 1997).

Entomopathogenic fungi invade their hosts through the external skeleton (cuticle). This is a complex, composite structure with a high-protein content. Thus, particular attention has been focused on the role of proteases in the penetration process (reviewed in Charnley 2003).

The best known determinant of fungal entomopathogenicity is based on subtilisin-like serine protease (designated Pr1) of *Metarhizium anisopliae*, where its role in host invasion has been clearly demonstrated (St. Leger *et al.* 1988). This enzyme is adapted to extensively degrade insect cuticular protein (St. Leger *et al.* 1987) and has been ultrastructurally located in the host cuticle during the early stages of

penetration (Goettel *et al.* 1989).

Pr1-like protease from *B. bassiana* also appears to be a virulence factor given its ability to degrade insect cuticle (Bidochka and Khachatourians 1994) and considering that a protease-defective mutant was found to have decreased virulence against the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes* (Bidochka and Khachatourians 1990). Furthermore, the *Pr1*-like genes from two isolates of *B. bassiana*, which resembles the *M. anisopliae Pr1*, have been cloned and sequenced (Joshi *et al.* 1995; Kim *et al.* 1999), indicating that similar proteases may be widespread among entomopathogenic fungi.

The regulation of extracellular protease synthesis in *B. bassiana* is consistent with a multiple control model which include carbon and nitrogen derepression (Bidochka and Khachatourians 1988a,b). Recently, Donatti *et al.* (2008) described an enhancing effect of *R. schistocercoides* cuticle on Pr1 production by *B. bassiana* suggesting that Pr1-like protease may be specifically induced by a cuticular component (s). Furthermore, these authors described that the amino acid methionine seems to play a regulatory role on Pr1 secretion by *B. bassiana*, since both induction and repression seems to be dependent on the concentration of the amino acid present in the culture medium.

Knowledge of how proteases production is regulated could be relevant to understanding the mechanisms of fungal pathogenesis. To help understand the role of proteases in *R. schistocercoides* cuticle penetration, it is desirable to determine how their synthesis is regulated in *B. bassiana*. Therefore, this study aims to analyze the production and regulation of Pr1-like protease from *B. bassiana* CG425 in the presence of *R. schistocercoides* cuticle, extending our knowledge about protease production by this fungus.

## Materials and Methods

### Organism and growth conditions

*Beauveria bassiana* CG425 was obtained as a liquid nitrogen-stored stock culture from the Cenargen/Embrapa-Brazil collection of entomopathogenic fungi, Brasília – DF.

Conidia were obtained by harvesting sporulated cultures grown on agar plates of complete medium (Pontecorvo *et al.* 1953). Fifty ml of complete medium in 250 ml conical flasks was inoculated with  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  and incubated at 28 °C in an orbital shaker (180 rpm) for 24 h. Following growth, 15 ml samples were harvested and washed twice by centrifugation (8000 **g** for 10 min) and inoculated into minimal medium containing nitrate as sole nitrogen source (MM; 6 g  $\text{NaNO}_3$ , 1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g KCl, 1 mg  $\text{FeSO}_4$ , 1 mg  $\text{ZnSO}_4$ , 10 g glucose, and 15 g agar in 1000 mL of distilled water), and MM supplemented with 0.5 % (w/v) insect cuticle (MM+cut), prepared from adult *Rhammatocerus schistocercoides* using an aqueous solution of 1 % (w/v) potassium tetraborate (Andersen 1980). Following growth for up 96 h mycelium was harvested by centrifugation at 8000 **g** for 10 min. The supernatants (extracellular fraction) obtained were stored at -20 °C and assayed for protease activity.

An additional experiment was performed to determine the effect of methionine on the protease activity. The amino-acid methionine at different concentrations was added to MM and MM+cut together with the fungal inoculum and at each 24 h of growth. Following growth for up 96 h the mycelium was harvested by centrifugation at 8000 **g** for 10 min. All experiments were repeated three times, and the results represent mean values  $\pm$  SD.

## Enzyme assay

Subtilisin-like (Pr1) activity of *B. bassiana* was assayed using succinyl-(alanine)<sub>2</sub>-proline-phenylalanine-*p*-nitroanilide as substrate (Urtz and Rice, 2000). Each assay consisted of 0.05 ml substrate (1 mmol l<sup>-1</sup>), 0.85 ml 15 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl buffer (pH 8.5) and 0.1 ml crude enzyme. The mixture was incubated for 30 min at 28 °C and the reaction was terminated by adding 0.25 ml of 30% acetic acid and left to stand for 15 min in ice, after which samples were centrifuged at 1250 g for 5 min at 4 °C. The supernatants were read at 410 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of the enzyme able to release one nanomol of nitroanilide (NA) per second per ml (nanokatol) under the assay conditions. Assays were performed in duplicate for each sample.

## RNA extraction and cDNA synthesis

*B. bassiana* was precultured in complete liquid medium and grown in submerged culture (180 rpm) at 28 °C for 24 h. The resultant cultures were harvested and washed with sterile distilled water and a mycelia was added to either MM and MM+cut following incubation for up to 24 h. Mycelia were harvested and frozen immediately at -20 °C until the RNA was extracted. In another set of experiments harvested mycelia was added to MM+methionine (0.5 %) and MM+cut+methionine (0.75 %). To extract the RNA the mycelia were ground in liquid nitrogen in a pre-cooled mortar and pestle. Total RNA was extracted with Trizol (Life Technologies), according to manufacturer's instruction. The integrity and quantity of RNA was determined by agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometric measurement (Shimadzu, Japan). Reverse transcription was carried out using 1 µg total RNA and reverse transcriptase (RT M-ML V, Invitrogen) following the manufacturer's instructions for oligo-dT priming (Invitrogen Life Technologies). Sequences deposited in the GenBank database were used for specific primer design. The primer set had the following nucleotide sequences: *PR1BbF*, 5'- GCGTCAAGGTGCTCGAAG -3' and *PR1BbR* 5'- TGGAGCGGCGGTCTCAGACG -3' and *tub1*, 5' TTCCGTGGTTCCCTCTCCC-3' and 5'-ACGCAGGCAGGTGGTGATG-3' (coding for

*Beauveria bassiana*  $\beta$ -tubulin gene) was employed as endogenous control (normalizer).

#### Quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR)

To quantify cDNA generated by reverse transcription from target RNA, quantitative real-time PCR was carried out in a PTC-200 DNA Engine Cycler with a Chromo4 fluorescence detector system (MJ Research). The 20  $\mu$ l reaction was performed by using the Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies), *Pr1Bb-F* (2.5  $\mu$ M) and *Pr1Bb-R* (2.5  $\mu$ M) primers, and 2.0  $\mu$ l of cDNA. The mixture was subjected to the following amplification program: 2 min at 50 °C; 5 min at 95 °C; 40 cycles at 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, following final extension at 72 °C for 10 min. Samples were analyzed in duplicate and normalized to the internal  $\beta$ -tubulin (*tub1*) control levels. Melting curve analysis was performed for each sample to assure that a single product was produced in each reaction and was determined in 0.5 °C steps from 50 – 98 °C with a dwell time of 2 s.

#### Data analysis

To determine the relative quantification of the target gene in comparison to a reference gene Q-RT-PCR data was analyzed using Pfaffl method (Pfaffl, 2001). PCR specificity and product detection was checked post amplification by examining the temperature-dependent melting curves of the PCR products. Data analysis  
Generation of quantitative data by real-time PCR is based on the number of cycles needed for amplification generated fluorescence to reach a specific threshold of detection (the Ct value). The relative expression ratio (R) of the target gene was

calculated based on *E* and CP deviation of the target sample versus a control, and expressed in comparison to a reference gene (endogenous control).

## Results

Production of Pr1 protease in the presence of *R. schistocercoides* cuticle

Previous to the analysis of the production of Pr1-like protease by *B. bassiana* CG425 in the presence of *R. schistocercoides* cuticle, we analyzed if this fungal strain produces a single celled vegetative state called blastospores which are released from growing hyphae. From 48 h incubation in liquid cultures we observed high amounts of blastospores when conidia were used as inoculum. Based in the fact that the blastospores EST collection contained few hydrolases (Cho *et al.* 2006) and also to avoid low yield of fungal biomass we attempted to obtain a culture with less differentiation in blastospores. Thus, the experiments were conducted using 24 h old mycelia as started inoculum which resulted in absence of blastospores differentiation.

*B. bassiana* produced Pr1 in minimal medium containing ground *R. schistocercoides* whole body cuticle. Production of Pr1 increased from the time of incubation to 24 h following inoculation and then the rate of accumulation leveled off. The enhancing effect of cuticle on Pr1 production suggests that this protease-type may be specifically induced by a cuticular component (s). However, Pr1-like proteases are also produced by carbon and nitrogen derepression alone indicating a substantial basal level of Pr1 (Fig. 1).

In order to analyse the inducible effect of cuticle components on Pr1 production, quantitative analysis of the relative transcript levels of *Pr1Bb* was performed using real-time PCR. The same cDNA was used for real-time PCR to monitor the fold induction of *Pr1Bb* as function of nitrogen source. The reference and target used were *tub1* ( $\beta$ -

tubulin) and *Pr1Bb* genes, where the primers were designed to amplify 223 and 297-bp fragments, respectively. As shown in Fig. 2 in cuticle-containing medium the *Pr1Bb* had varied relative expression throughout all the incubation periods analysed. The relative expression level of *Pr1Bb* in 12 h post-incubation in cuticle-containing medium was approximately 32-fold greater than in nitrate-containing medium (minimal medium). Longer incubation periods resulted in decrease of expression.

#### Effect of the amino-acids methionine in Pr1-protease production

In previous report we described that the amino-acid methionine may play a role on Pr1 secretion by *B. bassiana*, since both induction and repression seems to be dependent on the concentration of the amino acid present in the culture medium (Donatti *et al.* 2008).

In order to confirm this feature we analysed the time course of Pr1 production in medium containing methionine (0.25 % and 0.5 %) as only carbon source (Table 1). The lowest methionine concentration tested resulted in a basal level of activity, for all incubation periods tested. However from 48 h incubation, methionine at concentration of 0.5 % resulted in Pr1 production similar to that observed in cuticle-containing medium. The addition of methionine in cuticle containing medium was also analysed. Production of Pr1 compared to that seen with cuticle was observed at intervals beginning 48 h after inoculation in medium supplemented with 0.5 % methionine. Moreover, in medium supplemented with grasshopper cuticle, the addition of methionine at a concentration of 0.75 % repressed protease production (Table 1).

In medium supplemented with methionine (0.5 %) the highest transcript levels of *Pr1Bb* occurred in 12 h post-incubation being approximately 6-fold greater than in

nitrate-containing medium (Fig. 3a). As shown in Fig. 3b, the addition of methionine at concentration of 0.75 % to minimal medium supplemented with cuticle resulted in a much less levels of *Pr1Bb* transcription.

## Discussion

Insect cuticle contains many different proteins, which vary between types of insect (Dombrovsky *et al.* 2003). Thus, fungal virulence or specificity could depend in part on having proteases with high activity for host-specific cuticular proteins. Like most fungal pathogens, *B. bassiana* might use a combination of enzymes to penetrate the cuticle and access the nutrient-rich host haemocoel.

This is the first report on induction *B. bassiana Pr1* gene by cuticle of the grasshopper *R. schistocercoides*. According to previous reports, proteases produced by different strains of *B. bassiana* were maximally expressed during growth on wax moth (*Galleria mellonella*) cuticle (Gupta *et al.* 1992) and *Boophilus microplus* (Campos *et al.* 2005). For *M. anisopliae*, limitation of carbon and nitrogen sources in culture supplemented with acridid cuticle derepressed protease production. Since all proteins contain carbon and nitrogen this finding is consistent with the idea that a major function of the extracellular proteases is to make nutrients available from the cuticle (St. Leger *et al.* 1988).

The employment of mycelia as starting inoculum did not affect the inducible effect of cuticle components on Pr1 production by *B. bassiana* since similar yields were observed in a previous study (Donatti *et al.* 2008). In contrast, for *M. anisopliae* low levels of enzyme activity were detected when pre-grown mycelium was used to investigate the induction of Pr1 proteases in the presence of grasshopper (*Shistocerca pallens*) cuticle (Tiago *et al.* 2002).

In this study a substantial basal level of Pr1 by carbon and nitrogen derepression was observed. Similar results were previously found for *M. anisopliae* (St Leger *et al.* 1992) and *B. bassiana* (Donatti *et al.* 2008).

Currently there are few reports on expression of genes related to proteases production in entomopathogenic fungi. For *M. anisopliae* it has been shown that *Pr1* was only expressed during conidiogenesis and the late stages of pathogenesis, showing that this gene is upregulated (Fang and Bidochka 2006). Pathan *et al.* (2007) showed a differential expression of a subtilisin-like protease Pr1H after growth of *B. bassiana* on different insect cuticles using the RNA fingerprinting technique (cDNA-AFLP).

Although the amino-acid methionine is either absent or occurs at low levels in grasshopper cuticle (Hackman and Goldberg 1987; Bidochka and Khachatourians 1994) it seems to play a regulatory role on Pr1 production by *B. bassiana* (Donatti *et al.* 2008), being confirmed in the present study (Table 1). Based in this fact, the level of *Pr1Bb* transcripts were analysed in either presence and absence of this amino- acid. In medium supplemented with methionine high level of *Pr1* transcription was observed (Fig. 3a) although to a lesser extend compared to that observed in cuticle- containing medium (Fig. 2). Otherwise, in presence of cuticle, the addition of methionine at 0.75 % (the highest concentration tested) resulted in low levels of transcripts, suggesting its repression. The results presented in this study increase our knowledge about protease production and regulation in *B. bassiana* CG425, opening new avenues for the study of the role of secreted proteases in virulence against grasshopper during the infection process.

## Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UEL - Brazil. L.B.F. is fellowship-holder of CAPES.

## References

- Andersen, S.O. (1980) Cuticular sclerotization. In: Miller TA (ed) *Cuticle Techniques in Arthropods*. New York: Springer-Verlag, pp. 185-217
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1988a) Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp Mycol* **13**, 161- 168.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1988b) N-acetyl-D-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Env Microbiol* **54**, 2699-2704.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1990) Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J Invertebr Pathol* **56**, 362-370.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1994) Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *J Invertebr Pathol* **63**, 7-13.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J. and Roberts DW (1997) Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: An overview. *Mem Entomol Soc Can* **171**, 213-224.
- Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N. (2001) Introduction - Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Oxon: CABI Publishing; pp. 1-8.

- Campos, R.A., Arruda, W., Boldo, J.T., Silva, M.V., Barros, N.M., Azevedo, J.L., Schrank, A. and Vainstein, M.H. (2005) *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr Microbiol* **50**, 257-261.
- Charnley, A.K. (2003) Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Adv Bot Res* **40**, 241-321.
- Cho, E.M., Liu, L., Farmerie W. and Keyhani, N.O. (2006) EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, in vitro blastospores and submerged conidia. *Microbiology* **152**, 2843-2854.
- Dombrovsky A., Huet, H., Zhang, H., Chejanovsky, N. and Raccah, B. (2003) Comparison of newly isolated cuticular protein genes from six aphid species. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 709-715.
- Donatti, A.C., Furlaneto-Maia, L., Fungaro, M.H.P. and Furlaneto, M.C. (2008) production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. *Curr Microbiol* **56**, 256-260.
- Fang, W. and Bidochka, M.J. (2006) Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycol Res* **110**, 1165-1171.
- Goettel, M.S., St. Leger, R.J., Rizzo, N.W., Staples, R.C. and Roberts, D.W. (1989) Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* during penetration of host cuticle. *J Gen Microbiol* **135**, 2223-2239.

- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N. and Ignoffo, C.M. (1992) Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Exp Mycol* **16**, 132-137.
- Hackman, R.H. and Goldberg, M. (1987) Comparative study of some expanding arthropod cuticles: the relation between composition, structure and function. *J Insect Physiol* **33**, 39-50.
- Joshi, L., St. Leger, R.J. and Bidochka, M.J. (1995) Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol Lett* **125**, 211-218.
- Kim, H.K., Hoe, H.S., Suh, D.S., Kang, S.C., Hwang, C. and Kwon, S.T. (1999). Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. *Biotechnol Lett* **101**, 257-265.
- Lecoq, M. and Pierozzi, I. (1995) *Rhammatocerus schistocercoides* locust outbreaks in Mato-Grosso (Brazil) a long-standing phenomenon. *Int J Sust Dev World Ecol* **2**, 45-53.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J. and Thomas, M. (2001) Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol* **46**, 667-702.
- Magalhães, B.P., Faria, M., Tigano, M.S. and Sobral, B.W.S. (1997) Characterization and virulence of a Brazilian isolate of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes). *Mem Entomol Soc Can* **171**, 313-321.
- Moreira, M.A.B., Magalhães, B.P., Valadares, M.C. and Chagas, M.C.M. (1996) Occurrence of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera:Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brazil. *An Soc Entomol Bras* **25**, 359-361.

- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, 2003-2007.
- Pathan, A.A.K., Devi, K.U., Vogel, H. and Reineke, A. (2007) 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 Genet Biol* **44**, 1231-1241.
- Pontecorvo, G. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141-239.
- St Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. (1987) Characterization of cuticle- degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys* **253**, 221-232.
- St. Leger, R.J., Durrands, P.K., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. (1988) Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J Inv Pathol* 285-293.
- St Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W. and Staples, R.C. (1992) Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur J Biochem* **204**, 991-1001.
- Tiago, P.V., Fungaro, M.H.P. and Furlaneto, M.C. (2002) Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. *Lett Appl Microbiol* **34**, 91-94.
- Urtz, B.E. and Rice, W.C. (2000) Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. *Mycol Res* **104**, 180-186.

**Table 1** Effect of methionine on production of subtilisin-like (Pr1) protease from *Beauveria bassiana* CG425. The results are means of three independent experiments, with two replicates for each enzymatic assay.

Incubatio n (h)	Media				
	MM+ cut <sup>1</sup>	MM+ met <sup>2</sup> (0.25%)	MM+ met <sup>2</sup> (0.5%)	MM+ cut +met <sup>2</sup> (0.5%)	MM+cut+ met <sup>2</sup> (0.75%)
12	0.039±0.001 <sup>3</sup>	0.023±0.001	0.027±0.001	0.015±0.0	0.006±0.0
24	0.299±0.0	0.026±0.001	0.033±0.0	0.020±0.001	0.015±0.0
48	0.300±0.0	0.038±0.001	0.284±0.002	0.295±0.003	0.040±0.03
72	0.305±0.001	0.029±0.001	0.283±0.001	0.304±0.002	0.032±0.0
96	0.303±0.0	0.028±0.0	0.296±0.001	0.230±0.006	0.206±0.0

<sup>1</sup> MM+cut – minimal medium supplemented with *R. schistocercoides* cuticle (0.5%)

<sup>2</sup> met –amino-acid methionine

<sup>3</sup>Activity expressed as U (amount of the enzyme able to release one nanomol of nitroanilide (NA) per second per ml)

## Figure legends

**Figure 1** Subtilisin-like (Pr1) activities in culture supernatants from *Beauveria bassiana* CG425. Values are the means of three replicates. The results are means of three independent experiments, with two replicates for each enzymatic assay. Activities are represented as units; bars represent the standard error. MM – minimal médium, MM +cut - MM plus *R. schistocercoides* cuticle (0.5%).

**Figure 2** Relative transcript levels of *Pr1Bb* in cuticle-containing medium by real-time PCR. The relative levels of *Pr1Bb* mRNA in each of the sample was normalized using the  $C_t$  obtained for the tubulin gene. The values represent the number of times the gene is expressed in presence of cuticle (0.5%) compared with the sample grown in nitrate-containing medium. The results are averages of three repetitions.

**Figure 3** Relative transcript levels of *Pr1Bb* in cuticle-containing medium by real-time PCR. The relative levels of *Pr1Bb* mRNA in each of the sample was normalized using the  $C_t$  obtained for the tubulin gene. The values represent the number of times the gene is expressed in minimal medium supplemented with methionine (0.5%) (a) and in minimal medium supplemented with cuticle (0.5%) plus methionine (0.75%) (b) compared with the sample grown in minimal medium (nitrate-containing medium). The results are averages of two repetitions.

Figure 1

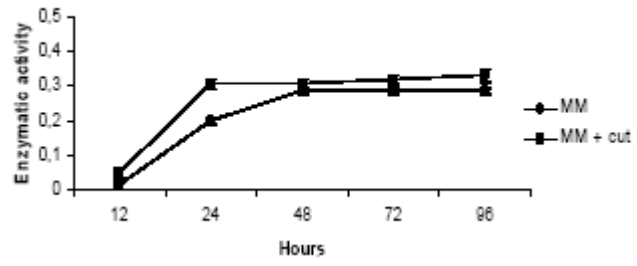


Figure 2

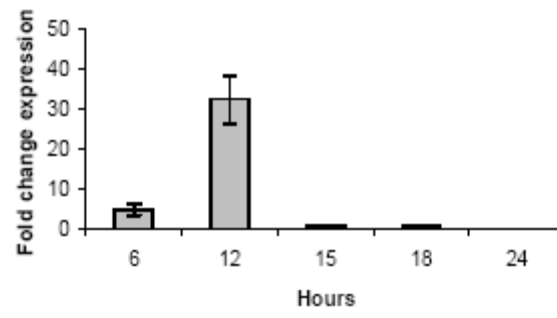


Figure 3

