



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

BRUNO AUGUSTO DIAS

**ESTUDO DE PROTEASES DEGRADADORAS DE
CUTÍCULA PRODUZIDAS PELO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana***

**LONDRINA
2005**

BRUNO AUGUSTO DIAS

**ESTUDO DE PROTEASES DEGRADADORAS DE CUTÍCULA
PRODUZIDAS PELO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
*Beauveria bassiana***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr.^a Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2005

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, sob a orientação da Prof. Dra. Márcia Cristina Furlaneto e contou com o apoio do CNPq, CAPES, Fundação Araucária e PROPPG/UEL.

Dedico:

Aos meus pais **Luiz** e **Paula**, pelo amor, carinho e confiança depositada em mim todos estes anos longe de casa.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Márcia Cristina Furlaneto pelos ensinamentos profissionais e éticos, pela dedicação, paciência e amizade durante todos estes anos de orientação e convivência.

Ao Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves do Departamento de Agronomia da UEL, pela disponibilidade do seu laboratório e de material utilizado neste trabalho.

Ao Dr. Amador Villacorta do Instituto Agronômico do Paraná e à suas estagiárias pela coleta e armazenamento do material cuticular utilizado neste trabalho.

A todos os professores e alunos dos laboratórios ligados ao Projeto Genoma/UEL pelo aprendizado e pelos agradáveis momentos de convivência.

Ao Dr. Sérgio Suzart dos Santos pelos ensinamentos, amizade e longas conversas filosóficas pelos corredores do AHC/UEL.

Aos Membros da banca examinadora, Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta e Dra. Sueli Souza Martinez pela disponibilidade e contribuição.

À Anna Francisca pelo apoio, estímulo, carinho e principalmente pela compreensão durante estes anos difíceis mas ao mesmo tempo maravilhosos e inesquecíveis.

Aos sempre amigos: Ariane, Ariane Donatti, Daiane, Marcelo, Maria Cecília, Camila e Cláudia pela amizade e colaboração. Ao Rubens e ao Ivan por todos esses anos de amizade desde a graduação e por tudo que aprendemos juntos sobre ciência e vida. Conviver com vocês foi um privilégio!

Aos colegas da turma de mestrado: Cíntia, Custódio, Eduardo, Fabiani, Janaína, Maria, Marie, Milena, Pâmela, Patrícia, Rafaela, e Rita pelo apoio mútuo e companheirismo durante essa nossa caminhada científica.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente à Claci pela paciência e amizade.

A todos meus amigos e professores que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

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

Leonardo da Vinci

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

Isaac Newton

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

"... somos, enquanto seres vivos, o associar de moléculas, o passear de íons, a troca de energia."

Luiz Carlos Bruschi

RESUMO

Enzimas degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos desempenham papel importante durante o parasitismo. O isolado brasileiro de *Beauveria bassiana* (CG425), o qual se mostrou virulento à broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), foi analisado quanto à produção de proteases degradadoras de cutícula do tipo subtilisina (Pr1) e tipo tripsina (Pr2) na presença de cutícula da broca. O fungo foi cultivado em meio de sais (MM) ou meio contendo cutícula da broca em condições não tamponadas e tamponadas. Em meio não tamponado suplementado com cutícula de *H. hampei*, o pH das culturas diminuiu e as atividades Pr1 e Pr2 foram detectadas em maior quantidade somente em valores de pH acima de 5,5. Nas culturas tamponadas as atividades Pr1 e Pr2 foram maiores em meio contendo cutícula da broca, quando comparadas com as atividades em meio de sais contendo nitrato como fonte exclusiva de nitrogênio. As atividades tanto de Pr1 quanto Pr2 foram detectadas em maior quantidade no sobrenadante de cultivo. Os resultados sugerem que proteases do tipo-Pr1 e do tipo-Pr2 produzidas pela linhagem CG425 de *B. bassiana* são induzidas por componentes específicos da cutícula da broca, e que o pH de cultivo é determinante na expressão dessas enzimas degradadoras de cutícula. Os resultados também evidenciam a ocorrência de um mecanismo eficiente de secreção de proteínas por esse fungo.

Palavras-chaves: protease tipo-subtilisina, protease tipo-tripsina, *Hypothenemus hampei*, controle biológico

ABSTRACT

A Brazilian isolate of *Beauveria bassiana* (CG425) that shows high virulence against the coffee berry borer (CBB) was examined for the production of cuticle-degrading proteases, subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2). Fungal growth was either in nitrate-medium or in CBB cuticle-containing medium under both buffered and unbuffered conditions. In unbuffered medium supplemented with cuticle, the pH of cultures dropped and Pr1 and Pr2 activities were detected in high amounts only at a pH of 5.5 or higher. In buffered cultures, Pr1 and Pr2 activities were higher in medium supplemented with cuticle compared to activities with nitrate-medium. The Pr1 and Pr2 activities detected were mostly in the culture supernatant. Our data suggest that Pr1 and Pr2 proteases produced by strain CG425 are induced by specific components of CBB cuticle, and that the culture pH is a determinant in the expression of these proteases. Our data also support the occurrence of an efficient mechanism of protein secretion in this fungus. The results obtained in this study extend our knowledge about protease production in *B. bassiana* CG425, opening new avenues for studying the role of secreted proteases in virulence against the coffee berry borer during the infection process.

Keywords: subtilisin-like protease, trypsin-like protease, *Hypothenemus hampei*, biological control

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Situação atual do controle biológico na América Latina (VAN LENTEREN & BUENO, 2003).....	21
Tabela 2. Formulados de conídios de <i>B. bassiana</i> em comercialização (BUTT et al., 2001)	25
Tabela 3. Curva padrão de <i>p</i> -nitroanilina	66
Tabela 4. Determinação da atividade enzimática	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da cutícula de inseto e modo de penetração pelo fungo, reproduzido a partir de Clarkson & Charnley (1996).....	27
Figura 2. Curva padrão de <i>p</i> -nitroanilina	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A BROCA-DO-CAFÉ <i>HYPOTHENEMUS HAMPEI</i>	15
2.2 O CONTROLE BIOLÓGICO POR FUNGOS FILAMENTOSOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	17
2.2.1 <i>Beauveria bassiana</i>	22
2.3 INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA	27
2.3.1 Enzimas degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos.....	29
2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA INTRACELULAR/LIGADA À CÉLULA	35
2.5 INFLUÊNCIA DO PH EXTRACELULAR NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ARTIGO: Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i> in the presence of coffee berry borer cuticle.....	45
3 CONCLUSÕES	61
ANEXOS	62
ANEXO 1	63
1 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	63
1.1 Meio mínimo – MM.....	63
1.2 Meio mínimo de indução – MMI	63
1.3 Solução de cutícula (p/v).....	64
1.4 Tampão Tris-HCl 15mM (pH 8,5)	64
1.5 Tampão de lise.....	64
1.6 Solução de <i>p</i> -nitroanilina.....	65
1.7 Substrato de proteases tipo-subtilisina (Pr1) 1mM.....	65
1.8 Substrato de proteases tipo-tripsina (Pr2) 1mM	65

ANEXO 2	66
2 CURVA PADRÃO PARA DOSAGEM DE <i>P</i> -NITROANILINA	66
ANEXO 3	68
3 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO INTRACELULAR/LIGADA À CÉLULA	68
ANEXO 4	69
4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE SUBSTRATOS SINTÉTICOS.....	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) é considerada uma das principais pragas do cafeeiro, ocorrendo na maioria dos países produtores. Seu controle da broca baseia-se no uso de inseticidas, cujo uso em larga escala tem causado danos à saúde humana e ao ambiente, além de selecionar insetos resistentes (BRUN et al., 1989).

Como alternativa ao controle químico, tem-se o emprego de agentes microbianos de controle, incluindo fungos entomopatogênicos, sendo *Beauveria bassiana* uma das espécies mais promissoras para o controle da broca-do-café (LA ROSA et al., 1997).

Hirose (2000) analisou diversos isolados de *B. bassiana* quanto à virulência à broca-do-café. Esse autor observou grande variação na virulência entre os 61 isolados analisados, sendo que o isolado CG425 foi o mais promissor, apresentando maior taxa de mortalidade total, mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos mortos nos quais ocorreu conidiogênese) e taxa de conidiogênese em relação aos demais isolados testados. Posteriormente, Oliveira et al. (2003) demonstraram que o isolado CG425 apresenta compatibilidade com os inseticidas alfacipermetrina e tiametoxam podendo ser utilizado em associação com estes inseticidas em programas de manejo integrado de pragas (MIP).

Os fungos entomopatogênicos apresentam diversos fatores de virulência incluindo a produção de proteases degradadoras de cutícula, particularmente proteases tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2) (St. LEGER, 1995). 2

Quanto à produção de proteases degradadoras de cutícula por *B. bassiana*, Bidochka & Khachatourians (1988b) descreveram que a síntese de Pr1 é controlada por um circuito múltiplo, sendo reprimida por determinadas fontes de carbono e nitrogênio. Gupta et al. (1992) verificaram que em presença de substrato cuticular a produção de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2 foi superior comparada à produção em substratos não cuticulares.

Até o momento não existe relato da produção de enzimas degradadoras de cutícula por *B. bassiana* na presença de cutícula de *H. hampei*.

1.1 OBJETIVOS

- Analisar a produção de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2 pelo isolado CG425 de *B. bassiana* na presença e ausência de substrato cuticular (cutícula de *H. hampei*).

- Determinar a influência do pH do meio de cultivo sobre a atividade de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A BROCA-DO-CAFÉ *HYPOTHENEMUS HAMPEI*

H. hampei (Ferrari, 1857) (Coleoptera: Scolytidae) conhecida como broca-do-café é considerada uma das principais pragas da cultura, ocorrendo na maioria dos países produtores, e sendo considerada uma das pragas de maior dificuldade de manejo na atualidade (DAMON, 2000). Sua presença acarreta perdas de 10 a 80 % na produção, somando um prejuízo de 500 milhões de dólares por ano (BAKER, 1999).

As lesões causadas pela broca no fruto representam uma porta de entrada para infecções secundárias causadas por fungos e bactérias. Existem relatos de que a própria broca pode carregar alguns desses microrganismos atuando como transmissor desses agentes (DAMON, 2000).

Como resultado da infecção pela broca há uma sensível perda de peso do grão, além do aspecto e sabor prejudicados. Em casos de grande contaminação, a perda de peso pode ser superior a 20%, ou seja, mais de 12 quilos por saca de 60 quilos. O grão brocado também é inferiorizado na classificação do tipo do café, que é determinado pelo número de defeitos existentes em amostras. A cada cinco grãos perfurados pela broca, é atribuído um defeito. Outro problema que provoca a redução de produtividade é a queda dos frutos contaminados (COFFEEBREAK, 2004). A ocorrência da broca foi registrada pela primeira vez em 1901 na África (LE PELLEY, 1968). Foi introduzida no Estado de São Paulo na década de 20, de onde se difundiu para outros estados brasileiros (COFFEEBREAK, 2004).

O segmento agroindustrial do café foi responsável por 5% do total das receitas de exportações brasileiras em 1998, somando US\$ 2,6 bilhões de divisas com exportação. Apesar desse resultado favorável, a participação do Brasil no mercado internacional do café tem sido decrescente. Na década de 60 o Brasil deteve 40% do total da produção mundial de café, ao passo que nos anos 90 sua participação estava ao redor de 20% (FARINA & SAES, 1999).

Em função da queda dos preços na última década, vem-se buscando a redução dos custos de produção através de plantio adensado. Essa prática, no entanto, tem facilitado e amplificado o ataque por *H. hampei* (HIROSE, 2000).

O controle da broca é difícil pois a maior parte do seu ciclo de vida ocorre dentro do fruto. O ciclo envolve o depósito de ovos no interior do fruto, e após a maturação dos insetos, as fêmeas inseminadas pelos seus irmãos emergem para depositar seus ovos em outros frutos. As fêmeas depositam, em um só grão de café, de 31 a 119 ovos. Os estágios de maturação são: ovo (4 dias), larva (15 dias) e pupa (7 dias). O ciclo completo leva de 28 a 34 dias, sendo que o macho pode viver de 20 a 87 dias e a fêmeas uma média de 137 dias. Somente as fêmeas possuem asas, no entanto as brocas não são capazes de voar a grandes distâncias, mas segundo Decazy (1989) uma pequena parte da população viaja grandes distâncias a procura de novos frutos, geralmente auxiliadas por correntes de ar. A disseminação da broca ocorre pelo próprio vôo do inseto, transporte passivo (animais, veículos, pessoas, vento, etc) e pela comercialização de café. No Equador observou-se de 30 a 60 km de disseminação anual (SPONAGEL, 1994).

Várias técnicas têm sido descritas para o controle da broca, sendo que a mais comum é o uso de defensivos químicos, mas seu uso em larga escala tem causado diversos problemas, incluindo a seleção de insetos resistentes (BRUN

et al., 1989). Brun et al. (1995) verificaram que uma mutação no gene *Rdl* que codifica um receptor do ácido γ -aminobutírico confere a resistência de *H. hampei* ao inseticida. Em poucas gerações essa mutação pode ser difundida por toda a população devido à ocorrência de haplodiploidia funcional nessa espécie.

Além do controle químico destacam-se técnicas de manejo (coleta de todos os grãos após a safra e erradicação de espécies vegetais que podem ser hospedeiros alternativos da broca) e uso de inimigos naturais da broca como insetos e microrganismos (DAMON, 2000).

2.2 O CONTROLE BIOLÓGICO POR FUNGOS FILAMENTOSOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Para o controle de pragas da agricultura, uma das alternativas ao controle químico baseia-se no emprego de biopesticidas a base de microrganismos entomopatogênicos. Esse processo, conhecido como controle biológico, visa manter as populações em equilíbrio no ambiente, limitando a rápida multiplicação das pragas sem causar danos a outros organismos do ecossistema (FARGUES & REMAUDIERE, 1977). Devido ao ciclo de vida críptico da broca-do-café, agentes biológicos de controle podem ser mais eficientes do que o controle químico.

Os fungos são potencialmente os entomopatógenos mais versáteis, pois diferem da maioria dos outros patógenos, os quais precisam ser ingeridos para iniciar a doença. Os fungos entomopatogênicos usualmente invadem o inseto por penetração da cutícula externa (GOETTEL et al., 1995) e são capazes de infectar artrópodes de vários ambientes e em diferentes idades e estágios (McCOY & MILANI-TIGANO, 1996). Cerca de 80% das doenças em insetos são originadas por

fungos filamentosos, os quais se distribuem em cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. Segundo Alves (1998) a grande variabilidade genética desse grupo possibilita a seleção de linhagens mais eficientes para pragas específicas, podendo atuar de forma seletiva preservando populações de insetos não alvo. Além disso, esses microrganismos apresentam alto potencial de disseminação pelo ambiente. Em geral, o bioinseticida é capaz de permanecer no ambiente e continuar a causar mortalidade nos insetos em gerações subseqüentes, diminuindo oviposição, a viabilidade de ovos e aumentando a sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos. Por esses motivos esses microrganismos vêm sendo utilizados no biocontrole de pragas, bem como de doenças de plantas.

No entanto, existem algumas particularidades no emprego de fungos como agentes de controle microbiano: ação lenta em matar o inseto; cuidados no armazenamento visando a manutenção da viabilidade e virulência e a necessidade de condições ambientais favoráveis para seu emprego (temperatura, umidade, luminosidade e radiação). Além disso, o investimento na pesquisa de microrganismos controladores de pragas é menor quando comparado com os gastos com inseticidas químicos (WHIPPS & LUMSDEN, 1989). O gasto anual com agentes de biocontrole é cerca de 1% do total gasto com defensivos agrícolas, talvez devido ao fato de que os agentes de biocontrole possuem uma estreita distribuição de hospedeiros e algumas vezes apresentam controle insatisfatório. Conseqüentemente, mais atenção tem sido dada a agentes de biocontrole com amplo espectro de hospedeiros e para tecnologias que melhorem a produção, formulação e aplicação desses agentes (BUTT et al., 1999).

Assim como para outros inimigos naturais dos insetos, três estratégias de controle biológico podem ser adotadas empregando fungos

entomopatogênicos: Controle Biológico Clássico (CBC), Controle Aumentativo e Controle Conservativo. O CBC compreende o uso de inimigos naturais contra hospedeiros exóticos que se tornaram pragas em uma área com ausência de controladores nativos. Em geral, o CBC representa um controle econômico e sustentável da praga por longos períodos (SHAH & PELL, 2003).

O controle aumentativo consiste no aumento das populações de inimigos naturais quando estes estão presentes nas populações nativas da praga em pequeno número ou agem de maneira lenta, não conseguindo evitar perdas na safra. Duas são as estratégias utilizadas para esse aumento: a **inoculação** e a **inundação**. Na inoculação o fungo é aplicado no início da colheita, geralmente em pequenas quantidades, visando sua permanência por várias gerações na população da praga (estabelecendo a epizootia). Na inundação o fungo é aplicado em grandes quantidades objetivando o controle a curto prazo. Assim, o fungo é utilizado de maneira similar a um inseticida químico. Os termos micopesticida e micoinseticida têm sido usados para descrever essa abordagem (SHAH & PELL, 2003).

A estratégia conservativa envolve práticas de manejo que promovam e conservem a atividade de inimigos naturais de pragas. Dentre essas práticas estão a redução do uso de pesticidas, a identificação de hospedeiros alternativos para o período entre safras. Além disso, podem ser desenvolvidos “limites de atividade”, que determinem a relação mínima entre o tamanho da população da praga e a do agente controlador, sendo este capaz de promover o controle da praga sem o uso de inseticidas (SHAH & PELL, 2003).

A movimentação mundial no mercado de inimigos naturais foi estimada em 25 milhões de dólares em 1997 e cerca de 50 milhões de dólares em 2000, com crescimento anual de 15% a 20% em anos subsequentes. Atualmente,

mais de 75% da atividade comercial de biocontrole aumentativo concentra-se no Norte da Europa e na América Latina. Mercados emergentes encontram-se na América Latina, África do Sul, mediterrâneo europeu, e Ásia (Japão e Coreia). Atualmente mais de 100 espécies de inimigos naturais estão sendo produzidas por 85 produtores comerciais, sendo: 25 na Europa, 20 na América do Norte, 15 na América Latina, 6 na Austrália e Nova Zelândia e 4 na África do Sul. Na América Latina, além dos produtores comerciais, existem muitas instalações governamentais produtoras de inimigos naturais de pragas (Tabela 1) (VAN LENTEREN & BUENO, 2003).

Apesar de o Brasil não se destacar na comercialização de inimigos naturais, particularmente de parasitóides e predadores, apresenta tradição e potencial na área de patógenos, já que desde a década de 70 comercializa *M. anisopliae* para o controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar e de pastagens, *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gammatalis* e *B. bassiana* para o controle do moleque-da-bananeira (PARRA, 2004). Além disso, a ocorrência da maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já foi relatada no Brasil, sendo que mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1998).

Tabela 1. Situação atual do controle biológico na América Latina (VAN LENTEREN & BUENO, 2003).

País	Principais pragas	Controle clássico	Aumentativo (hectares)
Brasil	Cigarrinhas da cana-de-açúcar e de pastagens, lagarta-da-soja e moleque-da-bananeira	+	+(1.320.000)
Argentina	Broca da cana-de-açúcar	+	+/-(<100)
Bolívia	Broca da cana-de-açúcar	+/-	+/-(?)
Chile	Lagartas e moscas domésticas	+	+(50.000)
Colômbia	Pragas de algodão, soja, sorgo e cana-de-açúcar	+	+(800.000)
Costa Rica	Pragas de algodão e cana-de-açúcar	+	+(milhares)
Cuba	Broca da cana-de-açúcar e lepidópteros	+	+(700.00)
Equador	Broca do café e da cana-de-açúcar	+	+(?)
Guatemala	Pragas do algodão	+/-	+(20.000)
Honduras	Pragas da cana-de-açúcar	+	+/-(?)
México	Pragas do milho, soja, cana-de-açúcar, citrus e outras culturas	+	+(1.500.000)
Nicarágua	Pragas do milho, algodão e soja	+	+/-(?)
Panamá	Broca da cana-de-açúcar	+	+(4.500)
Paraguai	Lagarta da soja	?	+(100.000)
Peru	Pragas da cana-de-açúcar, arroz, citrus e milho	+	+(>1.300)
Uruguai	Broca da cana-de-açúcar	+	+/-(<100)
Venezuela	Broca da cana-de-açúcar, pragas de milho e sorgo	+	+(>16.000)
Número de países com biocontrole clássico e aumentativo		16	17

+ Aplicado no campo; +/- Aplicação experimental ou numa área pequena

Os principais fungos entomopatogênicos pertencem aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Aschersonia*, *Paecilomyces* e *Entomophthora* (AZEVEDO, 1998; FARIA & MAGALHÃES, 2001), sendo que o gênero *Metarhizium* compreende o grupo mais bem estudado, particularmente a espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

O gênero *Beauveria* pertence à divisão Deuteromycota, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae. Não apresenta ciclo sexual conhecido, reproduzindo-se por simples divisão mitótica de estruturas diferenciadas, os conidióforos, que originam conídios (DALZOTO, 2004). Esse gênero parasita um grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos (ALVES, 1998).

2.2.1 *Beauveria bassiana*

A espécie *Beauveria bassiana* foi primeiramente descrita por Bassi, em 1835, como causadora da “moscardina”, uma doença que atingia o bicho-da-seda. Em 1838 Giuseppe Balsamo Crivelli denominou-a como *Botrytis bassiana*, 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).

A espécie *B. bassiana* é de distribuição cosmopolita e pode ser encontrada infectando insetos e em amostras de solo. Há uma série de relatos que demonstram a eficiência dessa espécie contra insetos-pragas, bem como insetos vetores de doenças.

Luz et al. (1998) analisaram a patogenicidade de várias linhagens de *B. bassiana* a ninfas no 3º instar de *Triatoma infestans* (Hemiptera), inseto vetor da

Doença de Chagas, e verificaram que *T. infestans* é susceptível a infecções fúngicas em uma umidade relativa próxima à saturação.

Bajan et al. (1979) testaram 36 linhagens de *B. bassiana* contra larvas da mariposa *Galleria mellonella*, sendo que todas as linhagens analisadas mostraram-se patogênicas.

Brownbridge et al. (2001) relataram que a linhagem GHA de *B. bassiana* mostrou-se infectiva a *Bemisia argentifolii*, a mosca branca, mesmo após sucessivas passagens *in vitro*, sugerindo que os fatores genéticos que controlam a patogenicidade são estáveis, favorecendo a utilização em campo.

O potencial de *B. bassiana* para o controle de gafanhotos já é conhecido desde 1936. Nessa época foi relatado que um grande enxame do gafanhoto *Nomadacris septemfasciata* (Seville) foi dizimado pelo fungo na África do Sul (JEFFS et al., 1997).

Inglis et al. (1996) testaram a eficácia de quatro isolados de *B. bassiana* contra ninfas de *Melanopus sanguinipes*, importante praga na América do Norte. Os autores demonstraram que inóculo de conídios formulados em óleo foram mais eficazes do que formulações em água. Posteriormente verificou-se a suscetibilidade da oviposição pelas fêmeas do gafanhoto à presença de *B. bassiana* no solo (INGLIS et al., 1998).

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

No Brasil, *Rhammatocerus schistocercoides* é uma das espécies de gafanhoto mais danosas à agricultura, atacando plantações e pastagens nativas no estado do Mato Grosso. A linhagem CG425 de *B. bassiana* foi testada quanto à 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).

Vários formulados à base de *B. bassiana* vêm sendo utilizados em escala comercial em alguns países, representando a maioria dos formulados registrados à base de fungos no mercado americano (De NARDO & CAPALBO, 1998). A Tabela 2 mostra os formulados a base de *B. bassiana* em comercialização.

Segundo Murphy & Moore (1990), *B. bassiana* foi observada em muitos países atacando a broca-do-café, sendo que na Colômbia esse fungo é considerado o mais importante agente de controle biológico desta praga (VARELA & MORALES, 1996). Nesse país, a AgrEvo comercializa a formulação “Conidia WG” de *B. bassiana* para controle da broca, onde vem sendo tratada uma área de 10.000 ha (ALVES, 1998). Diversos autores vêm demonstrando o potencial de *B. bassiana* como agente microbiano de controle bem como sua capacidade infectiva (JIMÉNEZ-GÓMEZ, 1992; GONZÁLES-GARCIA et al. 1993; BUSTILLO, 1995; La ROSA et al., 1997).

Tabela 2. Formulados de conídios de *B. bassiana* em comercialização (BUTT et al., 2001, modificado).

Produto	Alvo	Produtor
Boveril	broca-do-café, ortézia, ácaros de cítricos e pragas do morango	Itaforte Bioprodutos, Brasil
Boverin	Besouro do Colorado	Antiga URSS
Boverol e Boverosil	Besouro do Colorado	Antiga Tchecoslováquia
ComGuard	Broca-do-milho europeu	Mycotech, EUA
Conidia	Broca-do-café	Live Systems Technology, Colômbia
Engerlingspilz	Besouros	Andermatt, Suíça
Mycotrol GH	Gafanhotos	Mycotech, EUA
Mycotrol WP & BotaniGard	Mosca-branca, afideos	Mycotech, EUA
Naturalis-L	Pragas do algodoeiro	Troy Biosciences, EUA
Ostrinil	Broca-do-milho	Natural Plant Protection, França
Proecol	Lagarta	Probiagro, Venezuela

Lecuona et al. (1986) observaram elevados índices de mortalidade (acima de 60%) de adultos de *H. hampei* infectados com *B. bassiana*. Varela & Morales (1996) analisaram seis isolados de *B. bassiana* contra a broca sendo que todos apresentaram alta eficiência em bioensaio.

No Brasil, *B. bassiana* ocorre enzooticamente em diversas regiões (FARIA & MAGALHÃES, 2001). Robbs & Bittencourt (1998) descreveram um alto índice de ataque (até 100%) de *B. bassiana* a adultos da broca-do-café na zona de cafeicultura capixaba.

Através de bioensaio, Hirose (2000) avaliou a virulência de 61 isolados de *B. bassiana*, originários de diversos hospedeiros e regiões geográficas, para a broca-do-café. Segundo esse autor, foi observada grande variação na

virulência dos isolados testados, sendo que 11 isolados apresentaram mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos mortos nos quais ocorreu conidiogênese) acima de 60%. Neste estudo, o isolado CG425 apresentou maior taxa de mortalidade total, mortalidade confirmada e conidiogênese, em relação aos demais isolados testados.

Segundo Alves (1998) a infecção 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 (Figura 1) ocorre devido a uma ação mecânica (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerotizadas) e enzimática, resultante da produção de enzimas (proteases e quitinases) que facilitam a penetração. Decorridas 72 horas da inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado. Sobre o inseto morto ocorre formação de grande quantidade de conidióforos e conídios, e dentro dele, formam-se estruturas fúngicas e produção de toxinas na forma de cristais. Além da presença das toxinas, a morte do hospedeiro ocorre devido a alterações patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestório e outros danos físicos devido ao crescimento vegetativo do fungo. Um processo de infecção semelhante foi descrito para *M. anisopliae var anisopliae* (St. LEGER et al., 1991a).

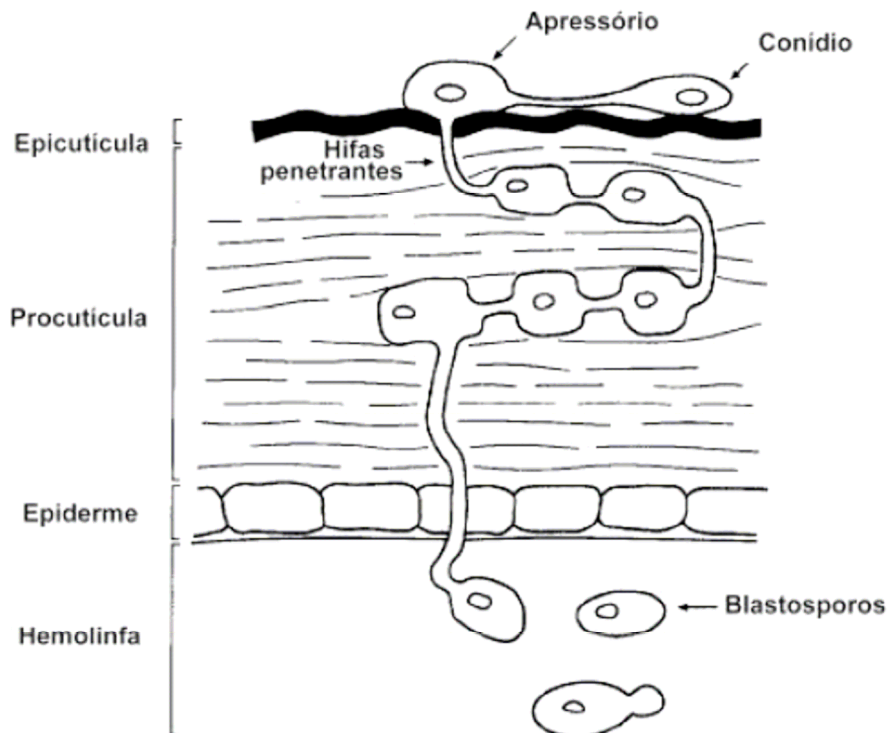


Figura 1. Estrutura da cutícula de inseto e modo de penetração pelo fungo, reproduzido a partir de Clarkson & Chamley (1996).

2.3 INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA

Vários fatores de virulência estão envolvidos na colonização de insetos por fungos entomopatogênicos. Segundo Lecuona et al. (1991) a adesão dos conídios à cutícula do inseto é o primeiro passo no estabelecimento da infecção. Outro determinante de patogenicidade é a capacidade de germinação dos conídios. Heale et al. (1989) observaram que o isolado mais patogênico de *Verticillium lecanii* para afídios (*Macrosiphoniella sanborni*) apresentou taxa de germinação relativamente alta comparada à dos isolados de virulência moderada.

Após a germinação, os conídios diferenciam-se numa estrutura de infecção denominada apressório, que representa uma adaptação por concentrar

energia física e química em uma área muito pequena, promovendo penetração eficiente. St. Leger et al. (1991b) verificaram que a formação do apressório é influenciada pela topografia da cutícula e estudos bioquímicos revelaram o envolvimento de mensageiros intracelulares secundários (Ca^{2+} e cAMP) na formação dessa estrutura.

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). *B. bassiana* e *M. anisopliae* produzem quantidades significativas de toxinas em seus hospedeiros. Beauvericina, beauverolides, bassianolide e isarolides são exemplo de toxinas isoladas de insetos infectados por *B. bassiana* (ELSWORTH, 1977). Destruxinas (DTXs) e citochalasinias provêm de hospedeiros infectados com *M. anisopliae*. Dentre os diversos compostos tóxicos isolados de insetos infectados, somente as DTXs têm papel definido na infecção. De acordo com Clarkson & Charnley (1996) as DTXs provocam efeitos diversos em vários tecidos de insetos. Em lepdópteros essas toxinas despolarizam a membrana muscular através de ativação de canais de Ca^{2+} . Em baixas concentrações a ação pode ser reversível, dependendo da capacidade de destoxificação do hospedeiro, o que reflete a susceptibilidade de uma dada espécie de inseto às destruxinas.

2.3.1 Enzimas degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos

Enzimas degradadoras de cutícula são os fatores de virulência mais bem estudados em fungos entomopatogênicos. A cutícula do inseto é composta pela epicutícula e pela procutícula (Figura 1). A epicutícula é uma fina camada de proteínas recobertas de lipídios e esteróis. A procutícula é uma camada espessa composta por uma matriz de microfibrilas de quitina (polímero de N-acetilglicosamina) circundadas por proteína, sendo que essa composição é que confere rigidez ao exoesqueleto do inseto. Esse tegumento constitui uma barreira físico-química altamente eficiente contra a penetração de muitos agentes entomopatogênicos. Observações ultraestruturais sugerem que a degradação enzimática de componentes da cutícula é um importante meio de penetração (ZACHARUK, 1970; MURRIN & NOLAN, 1987), além de servir como fonte de nutrientes aos patógenos.

Durante a penetração através do tegumento, o patógeno está exposto a diferentes condições ambientais. Segundo St. Leger (1993), o fungo responde a essas mudanças ambientais iniciando processos bioquímicos adaptativos e diferenciações em estruturas morfológicas específicas. Por exemplo, os tubos germinativos desenvolvem-se em apressório na superfície da cutícula; já na epicutícula ocorre a formação de projeções de infecção; na procutícula ocorre formação de hifas e, por fim, de blastosporos na hemocele.

As proteínas são componentes estruturais predominantes da cutícula de insetos (60%) e as proteases liberadas durante as primeiras fases de invasão do entomopatógeno estão envolvidas na penetração da cutícula e constituem um

importante fator de virulência (St. LEGER et al., 1988). A quitina, que compreende 30% da cutícula, é envolvida por subunidades de proteínas; desta maneira o pré-tratamento da cutícula com proteases aumenta consideravelmente a atividade subsequente de quitinases (SAMSINAKOVA et al., 1971; St. LEGER et al., 1986).

St. Leger et al. (1987a) caracterizaram duas proteases alcalinas a partir do sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, uma com atividade tipo-subtilisina, designada Pr1 e a 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. Segundo esses autores, no entanto, Pr1 apresentou alta atividade sobre cutícula de gafanhoto e elastina, enquanto que a Pr2 hidrolisou caseína e substratos sintéticos contendo arginina ou lisina, mas não apresentou atividade sobre cutícula ou elastina.

O papel de Pr1 na degradação de proteínas cuticulares foi descrito por St. Leger et al. (1988). Estes autores verificaram que durante a infecção de *Manduca sexta* por *M. anisopliae* var. *anisopliae*, a presença de inibidor de Pr1 ou anticorpos IgG (específico para Pr1) reduziu a taxa de mortalidade do inseto. Observou-se também que não ocorreu penetração do fungo através da cutícula, embora tenha ocorrido germinação e formação de apressórios na superfície cuticular. O papel de Pr1 na degradação localizada de proteínas cuticulares foi corroborado pelo fato de que esta enzima foi a principal protease produzida por estruturas infectivas (apressório e tubos germinativos) durante a infecção (St. LEGER et al., 1989).

Com relação ao papel de Pr2 no parasitismo, Paterson et al. (1994) relataram que esta enzima estaria envolvida na ativação ou indução de Pr1 em *M. anisopliae*. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que, em cultivo, a produção de

Pr2 ocorre anteriormente à de Pr1 na presença de cutícula de *Schistocerca gregaria* (GILLESPIE et al., 1998). Segundo St. Leger et al. (1996) Pr2 foi secretada por estruturas de infecção (apressório) na superfície da cutícula de *M. sexta* e pela hifa penetrante, sugerindo que esta enzima deve ter um papel complementar ao de Pr1 na degradação de proteínas cuticulares.

PINTO et al. (2002) analisaram a produção de Pr1 e Pr2 extracelulares a partir de sete isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* após crescimento em meio contendo cutícula do gafanhoto *R. schistocercoides* e em substratos não cuticulares. Esses autores observaram a ocorrência de variabilidade natural entre os isolados quanto à produção das proteases analisadas, sendo que o substrato influenciou sua expressão. Os maiores valores de atividade enzimática foram observados em meio contendo cutícula, sendo que Pr1 foi produzida em maior quantidade quando comparada a Pr2. Esses dados permitem sugerir que Pr1 desempenha papel importante na degradação de proteínas cuticulares, sendo provavelmente um determinante de patogenicidade, semelhante ao observado para *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

St. Leger et al. (1987b) também observaram a presença de Pr1 e Pr2 em sobrenadantes de cultivo de *B. bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Nomuraea rileyi* e *Aschersonia aleyrodis*. Segundo os autores, as enzimas do tipo-Pr1 produzidas pelos fungos apresentaram similaridade quanto à especificidade pelo substrato, porém, anticorpos contra protease de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ME1) reagiram somente com proteases produzidas por isolados de mesma espécie, não ocorrendo reação com as proteases produzidas pelas demais espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Shimizu et al. (1993). Esses autores verificaram que proteases produzidas por isolados de *B. bassiana* e de *B. brongniartii* foram

imunologicamente idênticas, enquanto que proteases de *B. bassiana* diferiram imunologicamente daquelas produzidas por *M. anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus*, apesar de apresentarem alto grau de similaridade quanto à especificidade pelo substrato.

GUPTA et al. (1994) demonstraram a existência de correlação entre os níveis de enzimas degradadoras de cutícula (quitinases e proteases tipo-Pr1) produzidas por diferentes linhagens de *B. bassiana* e a virulência para *Galleria mellonella* e *Trichoplusia ni*. Os autores observaram que altos níveis destas enzimas parecem estar relacionados ao menor tempo de mortalidade destes hospedeiros.

Recentemente, URTZ & RICE (2000) descreveram uma protease extracelular de *B. bassiana* designada BBP (*B. bassiana* protease) do tipo serino-protease com atividade quimotripsina. Segundo os autores, essa protease tem atividade degradadora de cutícula semelhante à observada para proteases tipo-subtilisina (Pr1), embora em cultivo líquido, na presença de substrato cuticular, a produção de BBP tenha ocorrido anteriormente a de Pr1.

Diversos trabalhos relatam a clonagem e sequenciamento de genes que codificam proteases degradadoras de cutícula. St. Leger et al. (1992) isolaram e caracterizaram o cDNA de Pr1 de *M. anisopliae*. A análise da seqüência revelou que a estrutura primária da Pr1 é muito similar a serino-endopeptidases da subclasse das subtilisinas e que os resíduos de serina, histidina e aspartato do sítio ativo das subtilisinas estão presentes. Joshi et al. (1997) utilizaram a técnica de RT-DD-PCR para identificar genes diferentemente expressos por *M. anisopliae* na presença de cutícula. O gene que codifica para uma protease tipo-subtilisina obtido pelos autores foi denominado *pr1B* (para diferenciar do primeiro gene encontrado que passou a ser denominado *pr1A*). A análise da seqüência de aminoácidos revelou que Pr1B

apresenta similaridade de 54% com Pr1A e uma análise de cariótipo mostrou que os genes *pr1A* e *pr1B* estão em cromossomos distintos.

Joshi et al. (1995) clonaram um gene que codifica para Pr1 de *B. bassiana* a partir de 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 importante papel na degradação de cutícula, semelhante ao observado para *M. anisopliae*.

Freimoser et al. (2003) realizaram estudo de ESTs (*expressed sequence tags*) de duas variedades de *M. anisopliae* (var. *anisopliae* e var. *acridum*). As bibliotecas de cDNA foram geradas a partir de cultivo visando maximizar a produção de enzimas degradadoras de cutícula. Nesse estudo foram encontradas seqüências relacionadas a diversos fatores de virulência em ambas as variedades, dentre as quais diversas subtilisinas (11 para *M. anisopliae* var. *anisopliae* e 3 para *M. anisopliae* var. *acridum*), sendo que 7 destas subtilisinas não haviam sido relatadas anteriormente (Pr1C, Pr1D, Pr1G, Pr1H, Pr1I, Pr1J, e Pr1G-K).

Bagga et al. (2004) analisaram a diversificação evolutiva das subtilisinas de *M. anisopliae* (var. *acridum* e var. *anisopliae*). Esse estudo agrupou as subtilisinas em 4 “clusters”: subtilisinas de classe I (Pr1C), que é similar às bacterianas e 3 “clusters” 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). 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*).

A regulação dos genes que codificam enzimas degradadoras de cutícula é complexa, usualmente envolvendo uma combinação de indução pelo substrato e repressão por carbono e nitrogênio (St. LEGER, 1993). Clarkson & Charnley, (1996) relataram que a adição de glicose ou alanina durante a germinação do conídio de *M. anisopliae* in vitro reprime a formação do apressório e a expressão de protease tipo-Pr1, sugerindo a ocorrência de regulação coordenada por repressão catabólica. O mesmo foi confirmado para Pr2, ocorrendo repressão catabólica na presença de glicose ou aminoácidos (St. LEGER et al., 1987a e b; PATERSON et al., 1993).

Screen et al. (1997) sequenciaram a região promotora de um gene que codifica a protease tipo-Pr1 de *M. anisopliae* e verificaram a presença de locais de ligação de proteínas CREA. Essas proteínas foram primeiramente identificadas em *Aspergillus nidulans* e são repressoras catabólicas de carbono. Através de técnica de PCR esses autores identificaram o gene *crr1*, o qual codifica uma proteína de ligação que apresenta alto grau de homologia com a proteína CREA de *Aspergillus*.

Bidochka & Khachatourians (1987) purificaram e caracterizaram uma serino-protease de *B. bassiana* produzida em meio contendo gelatina como fonte única de carbono e nitrogênio. O resultado de várias análises revelou tratar-se de uma endopeptidase de 35 KDa com atividade ótima em pH 8,5 e a temperatura de 37°C, sendo capaz de hidrolisar elastina, caseína e gelatina. Os autores verificaram que essa protease teve sua síntese reprimida quando ao meio contendo gelatina foi

adicionada também N-acetil-glicosamina (BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1988a). Embora não seja citado nos trabalhos desses autores, esta protease deve corresponder à proteases tipo-Pr1 de *M. anisopliae*.

Os mesmos autores verificaram que *B. bassiana* sintetiza e secreta proteases somente em presença de proteína exógena, sendo esta a principal fonte de nitrogênio e carbono (BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1988b). Segundo os autores, além do substrato, o valor de pH do meio de cultivo influenciou a produção, estabilidade e atividade de proteases produzidas por este fungo. O crescimento de *B. bassiana* foi diferenciado em diversos valores de pH (5,5 ou 8,5), embora na presença de substrato protéico tenha havido produção de proteases em todas as condições testadas. A atividade proteolítica em Azocoll foi máxima em pH 8,5 com drástica diminuição em valores de pH abaixo de 7 e acima de 9. A atividade enzimática permaneceu estável por 24 horas em pH na faixa de 5 a 12 e instável em valores de pH inferiores a 5.

2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA INTRACELULAR/LIGADA À CÉLULA

Os estudos da produção de proteases por fungos entomopatogênicos têm se concentrado em atividades extracelulares. São escassos os relatos de atividade proteolítica intracelular. St. Leger et al. (1996) observaram imunocitoquimicamente, através de anticorpos marcados com partículas de ouro, duas isoformas de Pr2 em cortes finos de cutícula de *Manduca sexta* infectada por *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Ambas as isoformas foram secretadas por estruturas

de infecção (apressórios) na superfície da cutícula e estavam localizadas principalmente na parede celular do fungo, tendo pouca distribuição intracelular.

Tiago et al. (2002) compararam a atividade Pr1 e Pr2 nas frações secretada e intracelular em *M. anisopliae* var. *acridum* na presença e ausência de cutícula de *Schistocerca pallens* e verificaram que as enzimas são eficientemente secretadas pelo fungo, ocorrendo baixa ou nenhuma atividade intracelular/ligada à célula.

2.5 INFLUÊNCIA DO PH EXTRACELULAR NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Mais recentemente, St. Leger et al. (1998) avaliaram a produção de Pr1 e Pr2 por *M. anisopliae* var. *anisopliae* em meio de sais (meio mínimo) e meio contendo substrato cuticular em função de diferentes valores de pH (3 a 8). Segundo os autores a produção dessas proteases foi observada nos dois meios testados, exceto em cultivos cujo pH era 3. As maiores atividades proteolíticas ocorreram em meio contendo cutícula, de forma dependente do pH do meio de cultivo. O maior nível de Pr2 foi detectado em valores de pH entre 6 e 8, sendo que seu ótimo foi em pH 8. Da mesma forma, o maior nível de expressão de Pr1 foi observado em valores de pH próximos a sua atividade ótima (pH 8). Os autores concluíram 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. Segundo os autores, a observação *in vitro* da expressão de Pr1 e Pr2, sugere que o pH fisiológico no local de infecção seja alcalino, podendo ser um sinal fisiológico que dispara a produção desses fatores de virulência.

St. LEGER et al. (1999) analisaram a capacidade de *M. anisopliae* var. *anisopliae* em regular o pH do ambiente empregando linhagens mutantes com alteração na produção de ácido oxálico. Os autores verificaram que a linhagem selvagem eleva o pH do meio devido à produção de amônia, havendo em seguida produção de proteases tipo-subtilisina (Pr1), sendo estas detectadas somente em pH alcalino. Em contraste, mutantes que apresentam uma produção maior de ácido tiveram produção de proteases reduzida devido à acidificação do meio. Os autores sugerem que a alcalinização pela produção de amônia tem caráter adaptativo, facilitando a utilização dos nutrientes proteínicos, e que esta produção representa um fator de virulência que era até então desconsiderado.

Um sistema de regulação da expressão gênica pelo pH extracelular em fungos foi primeiramente identificado em *A. nidulans*. Esse sistema consiste nos produtos dos genes *pacC* e *palA*, B, C, F, H e I. *pacC* codifica um fator de transcrição “dedo de zinco” e os genes *pal* codificam fatores relacionados com a transcrição de “sensores” do pH ambiental (percepção do pH extracelular). Sistemas homólogos ao de *A. nidulans* também foram identificados em outros fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida albicans* (DENISON, 2000). Ainda não existem relatos em fungos entomopatogênicos, mas pode se esperar a ocorrência de um sistema similar de regulação.

Vários trabalhos citados nos itens anteriores ressaltam o papel das proteases no processo de infecção de insetos e a importância de se compreender a regulação da produção dessas enzimas. Portanto o estudo da regulação da produção dessas proteases pelo isolado CG425 de *B. bassiana* poderá auxiliar no entendimento dos fatores envolvidos na relação parasita-hospedeiro com a broca-do-café, dentro de um contexto mais abrangente: o controle biológico.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, G. C. 1973. 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
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In:_____. **Controle Microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p.289-381.
- AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: MELO, I. L.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMPRAPA, 1998. v.1, p.69-96.
- BAGGA, S., HU, G., SCREEN, S., 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, n.11, p.963-968, 1979.
- BAKER, P. S. 1999. The coffee berry borer in Colombia. Final report of the DFID-Cenicafé - CABI Bioscience IPM for coffee project. Chinchiná (Colombia), **DFID - Cenicafé**. 154 pp.
- BIDOCHKA, M. J., KHACHATOURIANS, G. G. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, n.7, p.1679-84, 1987.
- BIDOCHKA, M. J., KHACHATOURIANS, G. G. N-acetil-d-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, p.2699-2704, 1988a
- BIDOCHKA, M. J., KHACHATOURIANS, G. G. Regulation of Extracellular Protease in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**. v.12, p.161-168, 1988b.
- BROWNBRIDGE, M., COSTA, S., JARONSKI, S. T. Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.77, p.280-283, 2001.
- BRUN, L. O., MARCILLAUD, C., GAUDICHON, V., SCUKLING, D. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Journal of Economic Entomology**. v.82, p.1311-1316, 1989.
- BRUN, L. O., STUART, J., GAUDICHON, V., ARONSTEIN, K., FRENCH-CONSTANT, R. H. Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.92, p.9861-65, 1995.

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

BUTT, T. M., HARRIS, J., POWELL, K. The European Scene – opportunities for biopesticides. In: MENN, J., HALL, F. R. (Eds). **Biopesticides: Use and Delivery**. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, 1999, p-23-44.

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

CLARKSON, J. M., CHARNLEY, A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**. v.4, n.5, p.197-203, 1996.
COFFEEBREAK, 2004. Disponível em <http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=4&ID=22>. Acesso em 02 de julho de 2004.

DALZOTO, P. R. **Parameiose e caracterização de RNAs dupla fita no deutomiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. 2004. 107 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**. v.90 n.6 p.453-65, 2000

DECAZY, B. (1989). Le scolyte du fruit du caféier, *Hypothenemus hampei*: considérations sur la lutte intégrée contre ce ravageur. **ASIC**, 13 Colloque, Paipa. p. 655-665.

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.

De NARDO, E. A. B., CAPALBO, D. M. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: **Controle Biológico**. MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L., 1998, p.231-262.

DENISON, S. H. pH regulation of gene expression in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.29, p.61-71, 2000.

ELSWORTH, J. F., GROVE, J. F. (1977). Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* Bals. Part1. Beauverolides H and I. **Journal of American Chemical Society** [Perkin 1] 3: 270-3.

FARGUES, J., REMAUDIERE, G. Considerations on the especificity of entomopathogenic fungi. **Mycopathologia**, v.62, n.1, p.31-37, 1977.

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

FARINA, E. M. M., SAES, M. S. M. **O Agribusiness do café no Brasil**. São Paulo: Editora Milkbizz, 1999. 230 pgs.

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.49, p.239-247, 2003.

GILLESPIE, J. P., BATEMAN, R., CHARNLEY, A. K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locusts, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.128-137, 1998.

GOETTEL, M. S., JOHNSON, D. L., INGLIS, G. D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Canadian Journal of Botany**, v.73 (Suppl. 1): S71-S75, 1995.

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

GUPTA, S. C., LEATHERS, T. D., EL-SAYED, G. N., IGNOFFO, C. M. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoolusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.64, p.13-17, 1994.

HEALE, J. B., ISAAC, J. E., CHANDLER, D. Prospects for strain improvement im entomopathogenic fungi. **Pesticide Science**, v.26, p.79-92,1989.

HIROSE, E. **Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Virulentos à broca-do-café *Hypothenemus hampei***. 2000. Dissertação (Título de Mestre em Agronomia) Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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.

INGLIS, G. D., JOHNSON, D. L., KAWCHUK, L. M., GOETTEL, M. S. Effect of soil texture and soil sterilization on susceptibility of ovopositing grasshoppers to *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.73-81, 1998.

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, n.2, p.383-390, 1997.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, J. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. **Cenicafé**, v.43, p.84-98. 1992.

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.

JOSHI, L., St LEGER, R. J., ROBERTS, D.W. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1b) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using differential display – RT – PCR. **Gene**, v.97, p.1-8, 1997.

LA ROSA, W., ALATORRE, R., TRUJILLO, J., BARRERA, J. F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.1534-1538. 1997.

LECUONA, R. et al. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., à broca do café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1987) (Coleoptera:Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.15, p.21-27, 1986.

LECUONA, R., RIBA, G., CASSIER, P., CLEMENT, J. L. I. Alterations of insect epicuticular hydrocarbon during infection with *Beauveria Bassiana* or *B. brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.10-18, 1991.

LE PELLEY, R. H. **Las plagas del cafeto**. Barcelona: Editorial Labor S.A., 1968. 693 pp.

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, n.6, p.839-846, 1998.

MAGALHÃES, B. P., GOETTEL, M. S., FRAZÃO, H. S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.162-164, 2000.

McCOY, C. W., MILANI-TIGANO, M. S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.87-93, 1996.

MUGNAI, L., BRIDGE, P.D., EVANS, H.C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**. v.92 (2), p.199-209, 1989.

MURRIN, F., NOLAN, R. A. Ultrastructure of the infection of spruce budworm larvae by the fungus *Entomophaga aulicae*. **Canadian Journal of Botany**. v.65, 1694-1706, 1987.

MURPHY, S.T.; MOORE, 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.

OLIVEIRA, C. N., NEVES, P. M. O. J., KAWAZOE, L. S. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.663-667, 2003.

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

PATERSON, I. C., CHARNLEY, A. K., CLARKSON, J. M. Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**. v.109, p.323-328, 1993.

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, 1994.

PINTO, F. G. S., FUNGARO, M. H. P., FERREIRA, J. M., INGLIS, M. C. V, FURLANETO, M. C. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.2, 231-234, 2002.

ROBBS, C.F., BITTENCOURT, A.M. Controle Biológico de Insetos. **Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento**, n.06, p.10-12, 1998.

SAMSINAKOVA, A., MISIKOVA, S.,LEOPOLD, J. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater max moth (*Galleria mellonella*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, p.322-330, 1971.

SCREEN, S., BAILEY, A., CHARNLEY, K., COOPER, R., CLARKSON, J. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme Pr1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. **Current Genetics**. v.31, p.511-518, 1997

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

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.

SPONAGEL, K. W. (1994) **La broca del café *Hypothenemus hampei* em plantaciones de café robusta em la Amazonia Ecuatoriana**. 191 pp. Giessen, Germany, Wissenschaftlicher, Fachverlag.

St. LEGER, R. J. **Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by the deuteromycete fungal pathogens**. In: Parasites and pathogens of insects. vol.2. New York: Academic Press, Inc., 1993. p.211-219.

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

St. LEGER, R. J. St., CHARNLEY, A. K., COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *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.123-131, 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., FRANK, D. C., ROBERTS, D. W., STAPLES, R. C. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry**, v.204, p.991-1001, 1992.

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

St. LEGER, R. J., JOSHL, L., BIDOCHKA, M. J., RIZZO, N. W., ROBERTS, D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, p.1257-1264, 1996.

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

St. LEGER, R. J., NELSON, J. O., SCREEN, S. E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiology**, v.145, p.2691-2699, 1999

St LEGER, R. J., ROBERTS, D. W., STAPLES, R. C. A model to explain differentiation of appressoria by germings of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.57, p.299-310, 1991b.

TIAGO, P. V., FUNGARO, M. H. P., FURLANETO, M. C. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. **Letters in Applied Microbiology**. v.34, p.91-94, 2002

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

VAN LENTEREN, J. C., BUENO, V. H. P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **Biocontrol**. v. 48, p. 123-139, 2003.

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.

WHIPPS, J. M LUMSDEN, R. D. **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1989.

ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.15, p.372-396, 1970.

Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle

B.A. Dias¹, M.H.P. Fungaro¹, P.M.O.J. Neves² and M.C. Furlaneto¹

¹ Centro de Ciências Biológicas and ² Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, Brazil.

Beauveria bassiana proteases

Correspondence to: M.C. Furlaneto, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, UEL. P.O. Box 6001, 86051-990 Londrina -PR, Brazil. (e-mail: mcfurlan@sercomtel.com.br)

ABSTRACT

Aims: A Brazilian isolate of *Beauveria bassiana* (CG425) that shows high virulence against the coffee berry borer (CBB) was examined for the production of cuticle-degrading proteases, subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2). **Methods and Results:** Fungal growth was either in nitrate-medium or in CBB cuticle-containing medium under both buffered and unbuffered conditions. In unbuffered medium supplemented with cuticle, the pH of cultures dropped and Pr1 and Pr2 activities were detected in high amounts only at a pH of 5.5 or higher. In buffered cultures, Pr1 and Pr2 activities were higher in medium supplemented with cuticle compared to activities with nitrate-medium. The Pr1 and Pr2 activities detected were mostly in the culture supernatant. **Conclusions:** Our data suggest that Pr1 and Pr2 proteases produced by strain CG425 are induced by specific components of CBB cuticle, and that the culture pH is a determinant in the expression of these proteases. Our data also support the occurrence of an efficient mechanism of protein secretion in this fungus. **Significance and Impact of the Study:** The results obtained in this study extend our knowledge about protease production in *B. bassiana* CG425, opening new avenues for studying the role of secreted proteases in virulence against the coffee berry borer during the infection process.

Keywords: subtilisin-like protease, trypsin-like protease, *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*

INTRODUCTION

The coffee berry borer (CBB) *Hypothenemus hampei* (Ferrari) is considered the most important coffee pest throughout the world. It is present in most coffee producing countries (Le Pelley 1968). CBB lives the greatest part of its life cycle inside the coffee berry, which involves egg laying followed by the emergence of adult females from the berry. The control of CBB still depends largely on the application of synthetic insecticides with concomitant damage to the environment. Due to its cryptic lifestyle, the use of biocontrol agents could be an effective alternative to chemical control.

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin is the most prevalent fungus attacking CBB populations in African countries where this insect originated, as well as in those countries where the borer has spread, including Brazil (Villacorta 1984; Benassi 1995; Bustillo *et al.* 1998). Currently, commercial products based on *B. bassiana* are available for CBB control (Reithinger *et al.* 1997; Butt *et al.* 2001). Recently, it was shown that the Brazilian strain CG425 of *B. bassiana* was the most virulent against the coffee berry borer among 60 strains tested. Furthermore, this strain showed compatibility with chemical insecticides used in the coffee crop, allowing the development of an integrated pest management program strategy for the crop with reduction in the amount of insecticides applied (Oliveira *et al.* 2003).

Entomopathogenic fungi exhibit many attributes that determine virulence toward their hosts, including the production of derivatives enzymes. Fungal proteases are believed to play an important role in cuticle penetration (St Leger 1995). 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). A trypsin-like enzyme (Pr2) belonging to the serine protease group also occurs during the early stages of cuticle colonisation suggesting that it has some role in degrading extracellular proteins complementary to that of Pr1 (St. Leger *et al.* 1996).

A Pr1 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). Gupta *et al.* (1994) found that a high level of Pr1-like proteases produced by *B. bassiana* appeared to be related to early onset of mortality in the larvae of the wax moth (*G. mellonella*). According to these authors, trypsin-like proteases did not show a discernible trend. Furthermore, the Pr1 gene from *B. bassiana* which resembles the *M. anisopliae* Pr1 was cloned and sequenced (Joshi *et al.* 1995), indicating that similar proteases may be widespread among entomopathogenic fungi.

The synthesis of extracellular *B. bassiana* Pr1 is controlled by a multiple regulatory circuit in which certain carbon sources together with a nitrogen source repress its synthesis. Its is also controlled by the levels of N-acetyl-D-glucosamine in the culture medium (Bidochka and Khachatourians 1988 a,b, respectively). Gupta *et al.* (1992) showed that the production of Pr1 and Pr2 proteases is enhanced when *B. bassiana* is grown on insect cuticle.

In this study, we examined for the first time the production of Pr1 and Pr2 proteases by *B. bassiana* in the presence of *H. hampei* cuticle either in unbuffered or in buffered cultures, extending our knowledge about protease production by this fungus.

MATERIALS AND METHODS

Organism and culture 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 composed of minimal medium (MM; Pontecorvo *et al.* 1953) containing nitrate as nitrogen source. For enzyme production, conidia were added to 20 ml of liquid MM and MM+cut at a concentration of $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ and grown in submerged culture (180 rpm) at 28°C for up to 168 h. These media were left unbuffered (initial pH 6.8). The MM+cut medium corresponded to MM lacking nitrogen source amended with 0.5% (w/v) insect cuticle prepared from adult *Hypothenemus hampei* using an aqueous solution of 1 % (w/v) potassium tetraborate. The cuticle extract was added to previously sterilised (121°C for 15 min) MM lacking nitrogen source and autoclaved for 5 min at 115 °C.

In another set of induction experiments, both MM and MM+cut were buffered using a universal buffer (100 mmol l⁻¹ citric acid, 100 mmol l⁻¹ boric acid and 100 mmol l⁻¹ KH₂PO₄), pH 8.0.

All experiments were repeated three times, and the results represent mean values ± SD.

Preparation of enzyme fractions

Following growth, mycelium was harvested by centrifugation at 8000 g for 15 min and washed in ice-cold 25 mmol l⁻¹ Tris-sodium phosphate buffer, pH 8.5. Weighed mycelium was ground to a fine powder in liquid nitrogen, resuspended in lysis buffer (1g ml⁻¹ of 25 mmol l⁻¹ Tris-phosphate, pH 8.5, 10 % (v/v) glycerol and 1 mmol l⁻¹ EDTA) and centrifuged at 12000 g for 15 min. The supernatant recovered represented the cell bound soluble fraction. Culture filtrates were stored at -20 °C and used as the extracellular secreted fraction. Both fractions were assayed for protease activity.

Enzyme assays

In this paper, subtilisin-like activity and trypsin-like activity of *B. bassiana* are referred to as Pr1 and Pr2, respectively. Pr1 and Pr2 activities were assayed using succinyl- (alanine)₂-proline-phenylalanine-*p*-nitroanilide and benzoyl-phenylalanine-valine-arginine-*p*-nitroanilide as substrates, respectively. Each assay

consisted of 0.05 ml substrate (1 mmol l^{-1}), 0.85 ml 15 mmol l^{-1} Tris-HCl buffer (pH 8.5) and 0.1 ml crude enzyme. The mixture was incubated for 1 h 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. Activities were expressed as $\text{nmol } p\text{-nitroanilide ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Assays were performed in duplicate for each sample.

RESULTS

In this study, we determined the production of Pr1 and Pr2 proteases by *B. bassiana* CG425 in liquid culture, either in the presence or absence of coffee berry borer (*H. hampei*). In unbuffered medium containing nitrate as sole nitrogen source, the culture pH values ranged from 5.9 to 7.9 at different incubation times and the levels of Pr1 and Pr2 proteases were high at all incubation periods analysed (Tables 1 and 2). The pH of cultures dropped below 5.0 in unbuffered medium supplemented with cuticle, and Pr1 and Pr2 activities were detected in highest amounts in the late stage of growth when the culture pH reached 5.5 (Tables 1 and 2).

In buffered cultures (pH 7.5 in culture supernatants), Pr1-like proteases were also detected in the absence of *H. hampei* cuticle. However, in contrast to that observed in unbuffered cultures at its highest level, Pr1 activity was approximately 3-fold higher in mineral medium containing ground cuticle than in mineral medium containing nitrate as sole nitrogen source (Table1). In the former, protease production was high at 72 h and remained constant up to 168 h. Increased

protease production was observed in nitrate-medium starting at 120 h. Similarly, Pr2-like activity was higher in medium supplemented with cuticle at all incubation times compared to activities on non-cuticular substrate (Table 2).

These data suggest that Pr1 and Pr2 proteases produced by strain CG425 are induced by protein components of coffee berry borer cuticle, and that the culture pH is a determinant in the expression of these protease types.

We also analysed protease activity on agar plates containing mineral medium lacking nitrogen source amended with either gelatin or casein at 0.2% (w/v) at pH 6.8 and 8.5. Protease activity was determined by the ability to produce clear zones around the colony due to the hydrolysis of the substrate. Activities were measured as the ratio of diameter of the clear zone plus colony to that of the colony. Protease activity in gelatin-containing medium was 3.56 ± 0.22 and 3.25 ± 1.08 in cultures at pH 6.8 and 8.5, respectively. In casein-containing medium, protease activity was 1.87 ± 0.31 and 2.2 ± 0.08 in cultures at 6.8 and 8.5, respectively. Unlike in liquid cultures, the plate clearing assay for protease determination did not reveal the effect of culture pH on protease activity.

As shown in Fig. 1 and 2, Pr1 activities were higher than Pr2 activities in buffered media containing cuticle, although both types of proteases were detected after 48 h of growth, suggesting that these types of proteases are not coordinately expressed in this fungal strain.

We also analysed the distribution of Pr1 and Pr2 in both secreted and cell bound fractions after growth in unbuffered media, to increase our knowledge about protease secretion by this fungus. The Pr1 activities detected were mostly in the culture supernatant in either mineral medium or cuticle-containing medium. The percentage of Pr1 protease in the supernatant was 98-100% in mineral medium and

70 - 82% in cuticle-containing medium. The predominance of secreted Pr2 was also observed, even in nitrate-containing medium (up to 99%), suggesting the occurrence of an efficient mechanism of protein secretion by this fungus.

DISCUSSION

Fungal pathogenesis is a complex and multi-factorial phenomenon, with particular virulence factors coming into play at various stages of infection and death. The extracellular protease of *B. bassiana* has been implicated as a component of the insect infection process (Bidochka and Khachatourians 1990), and in this study we report on the regulation of Pr1 and Pr2 protease production by the isolate CG425 in liquid culture, as a function of nitrogen source and pH.

The detection of high levels of Pr1 and Pr2 proteases only in the late stages of growth in unbuffered medium containing *H. hampei* suggests that low culture pH had an effect on protease levels. In an earlier study, Bidochka and Khachatourians (1988a) described that an extracellular protease produced by *B. bassiana* in gelatin-containing medium was unstable at pH levels below 5. The decrease in pH in *B. bassiana* culture supernatants may have been due to the accumulation of metabolic acids such as oxalic acid in the medium as reported by Cordon and Schwartz (1962). Our finding of a drop in pH only in medium supplemented with coffee berry borer cuticle needs further investigation, particularly as it relates to fungal utilisation of this substrate and to the process of insect infection.

In experiments where the pH of the culture supernatant was kept at 7.5, the addition of *H. hampei* cuticle to the medium had a positive effect on both

types of protease (Pr1 and Pr2) activity. In the presence of cuticle, the production of these proteases seemed to be derepressed when the external pH is alkaline (Tables 1 and 2). These data suggest that both proteases are induced by specific components of the cuticle, and that their detection occurs at pH levels close to its pH optimum. *B. bassiana* Pr1 protease activity is maximum at pH 8.5 (Bidochka and Khachatourians 1987). St. Leger *et al.* (1998) described that *M. anisopliae* produces extracellular proteases only at the pH at which they are active. According to these authors, there is evidence for a concerted action of pH and presence of cuticle on enzyme induction in *M. anisopliae*. In contrast, a subtilisin-type serine protease produced by *Aspergillus niger* is expressed at equally high levels at pH 3 and 8 (Jarai and Buxton 1994).

Furthermore, the production of Pr1 and Pr2 by strain CG425 in cuticle-containing medium does not seem to be coordinately expressed, since both were detected after 48 h of growth, similar to that observed for *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Tiago *et al.* 2002).

In this study, both protease types were detected in medium lacking a protein source (mineral medium) in both unbuffered and buffered cultures. Similar results were obtained by Gupta *et al.* (1992). In contrast, Bidochka and Khachatourians (1988a) reported that *B. bassiana* strain GK2016 did not produce protease in the absence of exogenous protein.

The main focus of most studies on cuticle-degrading enzymes produced by entomopathogenic fungi has been on extracellular activities. In this study, we analysed the protease activities in secreted and cell bound fractions. The high percentage of secreted proteases observed for both protease types (Pr1 and Pr2) suggests the occurrence of an efficient mechanism of protein secretion in this

fungus. Tiago *et al.* (2002) also described a high percentage of secreted proteases from *M. anisopliae* var. *acridum* in cuticle-containing medium. Enzyme secretion by entomopathogenic fungi may be involved in the degradation of cuticular polymers during pathogenesis, assisting in the penetration of the insect exoskeleton and providing nutrients for fungal growth (Goettel *et al.* 1989). However, there is evidence suggesting that certain *M. anisopliae* extracellular enzymes remain, in part, associated with the cell surface, which could be of benefit to the fungus as products of the enzyme action would be more readily absorbed (St Leger *et al.* 1991).

The study of the regulation of virulence factors in entomopathogenic fungus is of particular importance because pathogenic specialisation may operate by way of regulatory controls that allow their expression. Furthermore, studies of the timing of the production of proteases and other factors in the presence of cuticular substrates could provide information about the role of the accumulated hydrolytic enzymes during pathogenesis. The results presented in this study increase our knowledge about protease production in *B. bassiana* CG425, opening new avenues for the study of the role of secreted proteases in virulence against the coffee berry borer during the infection process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) -Brazil. The authors thank Dr. Amador Villacorta for providing the coffee borer and Dr. Albert Leyva for reading the manuscript.

REFERENCES

- Benassi, V.L.R.M. (1995) Levantamento dos inimigos naturais da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) no norte do Espírito Santo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **24**, 635-638.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1987) Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 1679-1684.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1988a) Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology* **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*. *Applied and Environmental Microbiology* **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*. *Journal of Invertebrate Pathology* **56**, 362-370.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1994) Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 7-13.
- Bustillo, A.E., Cárdenas, R., Villalba, D., Benavides, P., Orozco, J. and Posada, F.J. (1998) Manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) em Colombia. Chinchina, Cenicafé, 134p.
- Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N. (2001) Introduction - Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* ed. Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N. pp. 1-8. Oxon: CABI Publishing.
- Cordon, T.C. and Schwartz, J.H. (1962) The fungus *Beauveria tenella*. *Science* **138**, 1265-1266.
- 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. *Journal of General Microbiology* **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*. *Experimental Mycology* **16**, 132-137.

- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N. and Ignoffo, C.M. (1994) Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* **64**, 13-17.
- Jarai, G. and Buxton, F. (1994) Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Current Genetics* **26**, 238-244.
- Joshi, L., St. Leger, R.J. and Bidochka, M.J. (1995) Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* **125**, 211-218.
- Le Pelley, R.H. (1968) Pests of coffee. Longmans, Green and Co. Ltd., London, 590p.
- Oliveira, C.N., Neves, P.M.O.J. and Kawazoe, L.S. (2003) Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola* **60**, 663-667.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemons, L.M., MacDonald, K.D. and Bufton, A.W.J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* **5**, 141-238.
- Reithinger, R.; Davies, C.R.; Cadena, H. and Alexander, B. (1997) Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against phlebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. *Journal of Invertebrate Pathology* **70**, 131-135.
- 47 St Leger, R.J. (1995) The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany* **73**, S1119-S1125 (Suppl. 1).
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. (1987) Characterization of cuticle degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **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*. *Journal of Invertebrate Pathology* **52**, 285-293.
- St Leger, R.J., Goettel, M., Roberts, D.W. and Staples, R.C. (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**, 168-179.
- St Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 709-713.
- St Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W. and Roberts, D.W. (1996) Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1257-1264.

- 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. *Letters in Applied Microbiology* **34**, 91-94.
- Villacorta, A. (1984) Ocorrência de *Beauveria* sp infectando a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) em lavouras no Estado do Paraná. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **13**, 177-178.

Table 1. Subtilisin-like (Pr1) activity in culture supernatants from *Beauveria bassiana* CG425 grown on unbuffered and buffered medium containing either nitrate or insect cuticle (0.5%) as nitrogen source.

Incubation (h)	Unbuffered medium				Buffered medium ^a	
	MM		MM+cut		MM	MM+cut
	pH ^b	Activity ^c	pH ^b	Activity ^c	Activity ^c	Activity ^c
48	5.9	0.51±0.01	4.9	0	0	0.04±0.03
72	7.0	0.66±0.14	4.9	0	0	0.99±0.15
96	7.9	0.88±0.17	4.9	0	0	1.05±0.03
120	7.9	0.82±0.13	5.5	0.40±0.23	0.32±0.16	1.01±0.06
144	7.5	0.79±0.03	6.0	0.58±0.03	0.38±0.13	1.17±0.04
168	7.5	0.80±0.04	6.2	0.65±0.09	0.71±0.01	1.14±0.12

^a pH 7.5 for culture supernatant, ^b pH of the culture supernatant, ^c Pr1 activity expressed in nmol *p*-nitroanilide h⁻¹ ml⁻¹. Each result is the mean of three experiments ± standard error of the mean.

Table 2. Trypsin-like (Pr2) activity in culture supernatants from *Beauveria bassiana* CG425 grown on unbuffered and buffered medium containing either nitrate or insect cuticle (0.5%) as nitrogen source.

	Unbuffered medium				Buffered medium ^a	
	MM		MM+cut		MM	MM+cut
Incubation (h)	pH ^b	Activity ^c	pH ^b	Activity ^c	Activity ^c	Activity ^c
48	5.9	0.64±0.05	4.9	0.01±0	0	0.08±0.06
72	7.0	0.70±0.04	4.9	0.04±0.03	0	0.23±0.22
96	7.9	0.69±0.02	4.9	0.01±0	0.06±0.03	0.71±0.05
120	7.9	0.70±0.01	5.5	0.30±0.28	0.22±0.12	0.64±0.04
144	7.5	0.68±0.10	6.0	0.44±0.08	0.33±0.16	0.77±0.02
168	7.5	0.70±0.03	6.2	0.51±0.02	0.42±0.13	0.81±0.03

^a pH 7.5 for culture supernatant, ^b pH of culture supernatant; ^c Pr2 activity expressed in nmol *p* nitroanilide h⁻¹ ml⁻¹. Each result is the mean of three experiments ± standard error of the mean.

3 CONCLUSÕES

1. A produção de proteases tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2) produzidas pelo isolado CG425 de *B. bassiana* parece ser induzida por componentes cuticulares de *H. hampei*.
2. O valor de pH do sobrenadante de cultivo parece ter um papel determinante na expressão de proteases tipo-subtilisina e tipo-tripsina pelo isolado CG425 de *B. bassiana*.
3. A expressão de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2 foi detectada a partir de 48h de cultivo, o que sugere a ocorrência de expressão não coordenada entre essas proteases.
4. Ambas as proteases foram eficientemente secretadas pelo isolado CG425 de *B. bassiana*, tanto na presença quanto na ausência de substrato cuticular.

ANEXOS

ANEXO 1

1 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

1.1 Meio Mínimo - MM (PONTECORVO et al., 1953)

NaNO ₃	6g
KH ₂ PO ₄	1,5g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO ₄	0,001g
Glicose	10g
Água destilada	1000mL
Agar	15g

O pH deste meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% e em seguida autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Para obtenção de MM solidificado foram adicionadas 15g de ágar por litro de meio.

1.2 Meio Mínimo de indução - MMI

O meio MMI compreende o MM sem NaNO₃

1.3 Solução de cutícula (p/v)

Foram utilizados insetos adultos da espécie *Hypothenemus hampei* cedidos pelo laboratório de controle biológico do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) de Londrina, PR. Os insetos foram secos em estufa a 80°C e macerados em cadinho. O pó resultante foi armazenado a -20°C. A cutícula foi ressuspensa em solução de tetraborato de sódio 1% e submetida a vapor fluente por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionada ao MMI em uma concentração final de 0,5% (p/v).

1.4 Tampão Tris-HCl 15mM (pH 8,5)

Trisma-base	0,363g
Água destilada	100mL

O pH foi corrigido para 8,5 com HCl concentrado. O volume final da solução foi completado para 200mL com água destilada e autoclavado a 121°C por 20 min.

1.5 Tampão de lise

Trisma-base.....	1,81g
Glicerol.....	20 mL
EDTA.....	5,84 mg

H₂O q.s.p.....200 mL

O pH foi ajustado para 8,5 com HCl concentrado antes da adição de EDTA e de Glicerol.

1.6 Solução de *p*-nitroanilina (concentração de 250µg/mL)

p-nitroanilina.....5mg

Água destilada estéril20mL

1.7 Substrato de Proteases Tipo-Subtilisina (Pr1) 1mM

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilina.....0,0125g

Água destilada estéril (q.s.p.).....20mL

O substrato foi dissolvido com DMSO (o suficiente para dissolver), em seguida o volume completado para 20mL com água destilada estéril.

1.8 Substrato de Proteases Tipo-Tripsina (Pr2) 1mM

N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilina.....0,0136g

Água destilada estéril (q.s.p.).....20mL

O substrato foi dissolvido com DMSO (o suficiente para dissolver), em seguida o volume completado para 20mL com água destilada estéril.

ANEXO 2

2 CURVA PADRÃO PARA DOSAGEM DE *p*-NITROANILINA

A curva padrão para determinação das atividades enzimáticas (Pr1 e Pr2) foi realizada utilizando diferentes concentrações de *p*-nitroanilina como descrito na Tabela 3. Após homogeneização, a leitura espectrofotométrica foi realizada a 410nm, sendo os resultados utilizados para a construção da curva padrão de *p*-nitroanilina (Figura 2).

Tabela 3. Curva padrão de *p*-nitroanilina

Tubos	<i>p</i> -nitroanilina*(μ L)	Água destilada (μ L)	Concentração de <i>p</i> -nitroanilina (μ g/mL)
1	0	1000	0
2	20	980	0,2
3	50	950	0,5
4	100	900	1,0
5	200	800	2,0
6	300	700	3,0
7	400	600	4,0
8	500	500	5,0
9	600	400	6,0
10	800	200	8,0
11	1000	0	10,0

*Solução de *p*-nitroanilina 10 μ g/mL

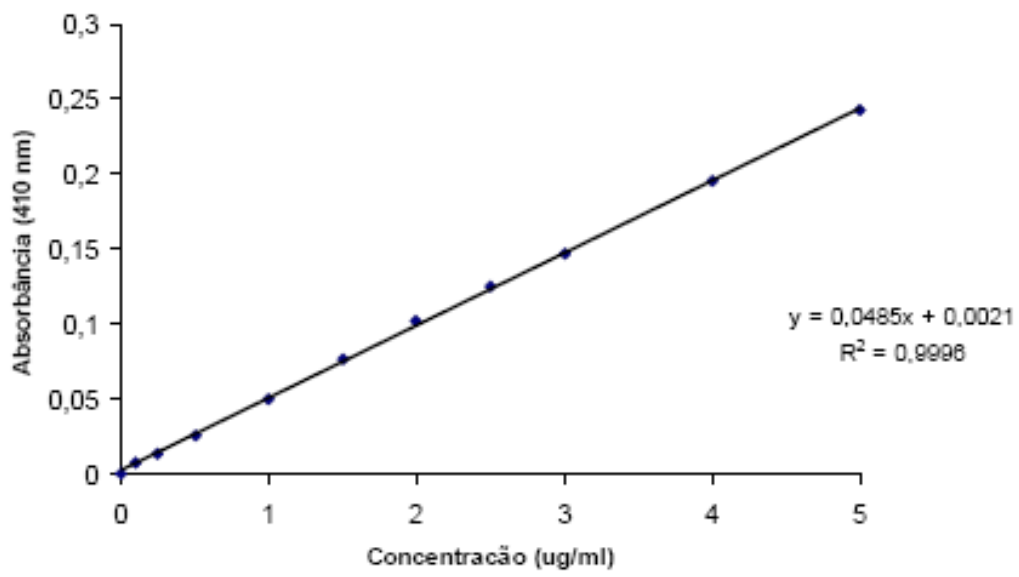


Figura 2. Curva padrão de *p*-nitroanilina.

ANEXO 3

3 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO INTRACELULAR/LIGADA À CÉLULA

Após o crescimento fúngico em cultivo líquido, o micélio foi separado do sobrenadante por centrifugação a 8000 xg. Na presença de nitrogênio líquido, 1 g de micélio foi macerado até formar um pó bem fino. Em seguida foi adicionado 1 mL de tampão de lise (Item 1.5). Após homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12.000 xg por 15 minutos e o sobrenadante mantido a -20°C. Este sobrenadante foi utilizado como fração enzimática intracelular/ligada à célula nos ensaios de atividade proteolítica (proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2).

ANEXO 4

4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE SUBSTRATOS SINTÉTICOS

Atividades tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2) foram determinadas utilizando substratos sintéticos específicos: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilina e N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilina. As reações enzimáticas foram realizadas por uma modificação do método de St. Leger et al. (1987).

O método utilizado para a determinação enzimática baseia-se na hidrólise destes substratos com a liberação de *p*-nitroanilina, que absorve no comprimento de onda de 410 nm.

A determinação da atividade enzimática dos sobrenadantes de cultivo (fração secretada) e fração intracelular/ligada à célula foi realizada utilizando tubos em duplicata (Tabela 4).

Tabela 4. Determinação da atividade enzimática

Tubos	Tris-HCl 15mM pH 8,5	H ₂ O	Substrato 1mM	Sobrenadante
C-	0,85mL	0	0,05mL	0,1mL*
Branco	0,85mL	0,1mL	0,05mL	0
Teste	0,85mL	0	0,05mL	0,1mL

*Sobrenadante aquecido a 98°C por 5 minutos

C- Controle negativo

Após a incubação em banho-maria a 28°C por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 0,25mL de ácido acético 30% e os tubos foram mantidos em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga e centrifugadas por 5 minutos a 1250xg. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e após 10 minutos de repouso foi realizada a leitura espectrofotométrica a 410 nm.

REFERÊNCIAS

PONTECORVO, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MACDONALD, K. D., BUFTON, A. W.. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v. 5, p.141-148, 1953.

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