



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ARIANE COELHO DONATTI

**ESTUDO DE PROTEASES DEGRADADORAS DE CUTÍCULA  
PRODUZIDAS POR BEAVERIA BASSIANA**

---

Londrina  
2007

**ARIANE COELHO DONATTI**

**ESTUDO DE PROTEASES DEGRADADORAS DE CUTÍCULA  
PRODUZIDAS POR *BEAVERIA BASSIANA***

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

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina  
2007

**ARIANE COELHO DONATTI**

**ESTUDO DE PROTEASES DEGRADADORAS DE CUTÍCULA  
PRODUZIDAS POR *BEAVERIA BASSIANA***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Márcia Cristina Furlanetto – Orientadora

---

---

Londrina, 28 de março de 2007.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais **Cesário** e **Aline** por todo amor e  
apoio durante toda a minha vida

**OFEREÇO:**

Ao meu irmão **Alexandre**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre esteve presente na minha vida.

À **Prof. Dra. Márcia Cristina Furlaneto** por todos estes anos de orientação, sempre com paciência.

Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira** pelas importantes sugestões dadas ao trabalho.

Às professoras **Dra. Geni Varéa Pereira e Dra. Luciana Furlaneto Maia**, membros da banca examinadora, pelas sugestões oferecidas na correção deste trabalho.

Às professoras **Dra. Maria Helena P. Fungaro e Dra. Maria Angélica E. Watanabe** pela disponibilidade de equipamentos de seus laboratórios.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, principalmente ao **Alex** e à **Claci** por toda ajuda.

Aos amigos de laboratório **Ana Flávia, Daniel, Franciele, Leandro, Luiz Gustavo, Marcelo e Viviane** pela aprendizagem e amizade.

A todos os meus amigos de mestrado pela amizade e apoio durante esses dois anos, em especial a **Alessandra, Letícia, Nádia e Raquel**.

Às amigas **Ariane Costa, Flávia Spago, Graziela Romagnoli, Juliana Carneiro e Lígia Ortolan** pela amizade e incentivo durante todo o mestrado.

À **CAPES** que forneceu a bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

DONATTI, Ariane Coelho. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas por *Beauveria bassiana***. 2007. 91f. Dissertação ( Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é considerado um promissor agente de controle microbiano de insetos-praga da agricultura, a exemplo, do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* que ataca plantações economicamente importantes na região Centro-oeste brasileira. *B. bassiana* é capaz de penetrar na cutícula do hospedeiro através de ação mecânica exercida pelo apressório e ação de enzimas degradadoras de cutícula, como as proteases, que são consideradas fatores de virulência. O isolado CG425 de *B. bassiana* apresenta virulência comprovada contra *R. schistocercoides*. A produção de proteases extracelulares, tipo subtilisina (Pr1) e tipo tripsina (Pr2) pelo isolado CG425 foi analisada após crescimento em meio contendo cutícula de *R. schistocercoides* e substrato não cuticular. A produção de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2 foi superior em presença de cutícula, sugerindo que estes tipos proteolíticos são induzidos por componentes cuticulares. Os valores superiores de Pr1 em relação a Pr2 sugerem que o sistema de regulação destas enzimas pode ser distinto. A regulação da produção de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2 foi analisada após cultivo do isolado CG425 na presença de diferentes aminoácidos. Dos aminoácidos testados, apenas a metionina, que é um aminoácido pouco encontrado na cutícula de algumas espécies de gafanhotos, parece ter papel na expressão destes tipos proteolíticos. Transformantes de *B. bassiana* obtidos via transformação por *Agrobacterium tumefaciens* foram analisados quanto a alterações na conidiação, uma vez que a produção de conídios por fungos entomopatogênicos é uma característica importante no contexto de controle microbiano de pragas. Dos 179 transformantes analisados, 14 apresentaram alterações quanto a conidiação, comparativamente ao isolado selvagem. Um dos transformantes com tal alteração foi submetido a análise por TAIL-PCR com vistas à identificação e etiquetagem de seqüências de DNA genômico que flanqueiam a região de T-DNA neste transformante.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*. Protease tipo-subtilisina. Protease tipo-tripsina. *Rhammatocerus schistocercoides*. Mutantes insercionais.

DONATTI, Ariane Coelho. **Study of degrading proteases of cuticula produced by *bassiana Beauveria***. 2007. 91f. Dissertation (Master Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

### ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is considered a promising agent of microbial control of insects considered pests of agriculture, such as, the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides*. This grasshopper attacks economically important plantations in the center-west Brazil. *B. bassiana* is capable to penetrate through cuticle of the host by apressorium formation and production of cuticle-degrading enzymes, such as proteases, that are considered virulence factors. The isolate CG425 of *B. bassiana* presents virulence against *R. schistocercoides*. The production of extracellular proteases, subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) by isolate CG425 was analyzed after growth in medium supplemented with *R. schistocercoides* cuticle and non-cuticular substrate. The production of proteases Pr1 and Pr2 was higher in presence of cuticle, suggesting that these proteases-types are induced for components of the cuticle. The higher values of Pr1 compared to that of Pr2 suggests that the regulation system of these enzymes is distinct. The regulation of proteases production (Pr1 and Pr2) by CG425 was also analyzed in cultures contained different amino acids. Of tested amino acids, only the methionine, that is an amino acid few found in cuticle of some grasshoppers species, seems to have a role in the expression of these proteases. Transformants of *B. bassiana* obtained by the employment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation had been analyzed concerning alterations conidia production, due to the fact that the production of conidia by entomopathogenic fungus is an important feature in the context of microbial control of pests. Of the 179 transformants analyzed, 14 had presented alterations in production of conidia, compared to that of the wild-type strain. One of the transformants with such alteration was submitted to the TAIL-PCR analysis aiming at the identification of genomic DNA sequences spanning the insertion junction of the T-DNA.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*. Subtilisin-like protease. Trypsin-like protease. *Rhammatocerus schistocercoides*. Insertional mutants.



## LISTA DE FIGURAS

### FIGURAS PARTE I

- Figura 1** – Estrutura da cutícula de inseto e modo de penetração pelo fungo, reproduzido a partir de Clarkson & Charnley (1996)..... 18
- Figura 2** – Atividade Pr1 extracelular do isolado CG425 de *B. bassiana* após diferentes tempos de incubação em MM (meio mínimo) e MMI (meio de indução) acrescido de cutícula. Os resultados representam a média de três experimentos independentes ..... 38
- Figura 3** – Atividade Pr2 extracelular do isolado CG425 de *B. bassiana* após diferentes tempos de incubação em MM (meio mínimo) e MMI (meio de indução) acrescido de cutícula. Os resultados representam a média de três experimentos independentes ..... 38
- Figura 4** – Atividade proteolítica sobre o substrato natural azocaseína do isolado CG425 de *Beauveria bassiana* após diferentes tempos de incubação em MM (meio mínimo) e MMI (meio de indução) acrescido de cutícula. Os resultados representam a média de três experimentos independentes ..... 39
- Figura 5** – Atividades do tipo-Pr1 e Pr2 do isolado CG425 de *Beauveria bassiana* após cultivo por 72h em substratos simples (glucose e aminoácidos individuais) e complexos (cutícula e substratos simples). Os resultados representam a média de três experimentos independentes ..... 42
- Figura 6** – Atividade proteolítica sobre o substrato natural azocaseína do isolado CG425 de *B. bassiana* após cultivo por 72h em substratos simples (glucose e aminoácidos individuais) e complexos (cutícula e substratos simples). Os resultados representam a média de três experimentos independentes ..... 43
- Figura 7** – Atividade tipo-Pr1 do isolado CG425 de *B. bassiana* após cultivo por 72h em diferentes concentrações de metionina na ausência e presença de cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides* ..... 45

**Figura 8** – Análise eletroforética das proteínas totais secretadas pelo isolado CG425 de *B. bassiana* na presença de: **1** – cutícula (0,5%), **2** – cutícula (0,5%) + metionina (0,5%), **3** – metionina (0,5%). Foi aplicada 17 µg de proteína de cada amostra. .... 46

## **FIGURAS PARTE II**

**Figura 1** – Microcultivo da linhagem selvagem (CG26) de *Beauveria bassiana* (a) e transformante TP125 (b). Aumento de 40x ..... 69

**Figura 2** – Gel de agarose 0,8% dos produtos da TAIL-PCR do transformante TP125. **1** – primeira reação, **2** – segunda reação, **3** – terceira reação ..... 70

## LISTA DE TABELAS

### TABELAS PARTE I

<b>Tabela 1</b> – Curva padrão para dosagem de proteína total .....	29
<b>Tabela 2</b> – Curva padrão para dosagem de <i>p</i> -nitroanilina.....	30
<b>Tabela 3</b> – Fonte de carbono e aminoácidos adicionados ao cultivo de <i>B. bassiana</i> (CG 425).....	31
<b>Tabela 4</b> – Determinação da atividade enzimática de proteases tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2).....	32
<b>Tabela 5</b> – Determinação da atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína ....	33
<b>Tabela 6</b> – Atividade proteolítica do isolado CG425 de <i>Beauveria bassiana</i> cultivado em meio mínimo (MM) e meio de indução (MMI acrescido de cutícula de <i>Rhammatocerus schistocercoides</i> ).....	38
<b>Tabela 7</b> – Atividade proteolítica do isolado CG425 de <i>Beauveria bassiana</i> após cultivo por 72h em substratos simples (glucose e aminoácidos individuais) e complexos (cutícula e substratos simples) .....	42
<b>Tabela 8</b> – Atividade tipo-Pr1 do isolado CG425 de <i>Beauveria bassiana</i> após cultivo por 72h em diferentes concentrações de metionina, na ausência e presença de cutícula de <i>Rhammatocerus schistocercoides</i> .....	45

### TABELAS PARTE II

<b>Tabela 1</b> – Primers utilizados na TAIL-PCR .....	67
<b>Tabela 2</b> – Condições a serem utilizadas no protocolo de PCR assimétrica (TAIL-PCR).....	68
<b>Tabela 3</b> – Produção de conídios da linhagem selvagem e dos agro-transformantes de <i>B.</i> <i>bassiana</i> . Os resultados representam a média de dois experimentos .....	69

## SUMÁRIO

<b>PARTE I - Regulação da produção de proteases degradadoras de cutícula (Pr1 e Pr2) pelo isolado CG425 de <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 Objetivos.....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 Controle microbiano de gafanhotos por <i>Beauveria bassiana</i> .....	166
2.2 Processo de infecção e fatores de virulência .....	188
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1 Isolado Fúngico .....	26
3.2 Meios de Cultura e Soluções .....	26
3.2.1 Meio mínimo solidificado - MM (Pontecorvo et al., 1953) .....	26
3.2.2 Meio completo solidificado - MC (Pontecorvo et al., 1953).....	27
3.2.3 Solução de vitaminas adicionada ao MC.....	27
3.2.4 Suspensão de cutícula (p/v) .....	28
3.2.5 Reagente de Bradford (Bradford, 1976).....	28
3.2.6 Substrato de protease tipo subtilisina (Pr1) 1mM .....	28
3.2.7 Substrato de protease tipo tripsina (Pr2) 1mM.....	29
3.3 Curva Padrão para a Dosagem de Proteínas Totais.....	29
3.4 Curva Padrão para Dosagem de <i>p</i> -nitroanilina.....	30
3.5 Análise da produção de proteases.....	30
3.5.1 Atividade proteolítica em cultura líquida.....	32
3.5.2 Preparo das frações enzimáticas .....	32
3.5.3 Atividades enzimáticas sobre substratos sintéticos .....	33
3.5.4 Atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína .....	34
3.5.5 Dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976) .....	34
3.5.6 Análise das proteínas totais secretadas em SDS-PAGE.....	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
4.1 Atividade proteolítica em presença e ausência de substrato cuticular .....	35
4.2 Atividade proteolítica em presença de aminoácidos distintos.....	40
4.3 Atividade proteolítica em diferentes concentrações de metionina.....	44
4.4 Análise das proteínas totais secretadas em SDS-PAGE.....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

<b>PARTE II - Seleção de agro-transformantes de <i>Beauveria bassiana</i> quanto a produção de conídios</b> .....	54
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	55
1.1 Objetivos.....	56
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	57
2.1 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> como ferramenta no estudo de mutagênese insercional .....	57
2.2 Agro-transformação de <i>Beauveria bassiana</i> .....	59
2.3 Thermal Asymmetric Interlaced – Polymerase Chain Reaction (TAIL – PCR) .....	59
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	63
3.1 Material biológico .....	63
3.2 Soluções.....	63
3.2.1 Tampão de extração de DNA .....	63
3.2.2 Clorofil .....	63
3.2.3 Clorofane .....	64
3.2.4 Tampão de corrida TEB (10X).....	64
3.3 Determinação de conidiação.....	64
3.4 Microcultivo .....	65
3.5 Análise estatística .....	64
3.6 Extração de DNA (Azevedo et al., 2000).....	66
3.7 Quantificação de DNA .....	66
3.8 Análise molecular dos transformantes por PCR assimétrica (TAIL-PCR).....	67
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	69
4.1 Análise da Conidiação.....	69
4.2 Análise de Microcultivo .....	70
4.3 Análise por TAIL-PCR.....	70
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	75
<b>ARTIGO - Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i> in the presence of <i>Rhammatocerus schistocercoides</i> cuticle</b> .....	76

## **PARTE I**

**Regulação da produção de proteases degradadoras de cutícula (Pr1 e Pr2)  
pelo isolado CG425 de *Beauveria bassiana***

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, muitas espécies de gafanhotos são consideradas pragas da agricultura em quase todo o planeta. Na região centro-oeste do Brasil, a espécie *Rhammatocerus schistocercoides* representa uma praga de plantas nativas e cultivadas nesta região. O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* tem se mostrado um promissor agente microbiano para o controle de gafanhotos. O isolado brasileiro denominado CG425 de *B. bassiana* foi virulento e capaz de esporular internamente no gafanhoto *R. schistocercoides* (MAGALHÃES et al., 2000).

Os fungos entomopatogênicos apresentam vários determinantes de entomopatogenicidade, incluindo a produção de enzimas degradadoras de cutícula, tais como, proteases e quitinases. Em *Metarhizium anisopliae* as proteases degradadoras de cutícula mais amplamente estudadas são as proteases do tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2) (St. LEGER, 1995).

Quanto a proteases produzidas por *B. bassiana*, Bidochka e Khachatourians (1987) identificaram a produção de uma protease extracelular após crescimento em meio contendo gelatina como única fonte de carbono e nitrogênio. Esta protease apresentou atividade de endopeptidase e sua inibição por fluoreto de fenilmetil-sulfonil (PMSF) indicou tratar-se de uma serino protease.

Posteriormente, Urtz e Rice (2000) purificaram e caracterizaram uma protease extracelular a qual foi denominada BBP (*Beauveria bassiana* protease), e uma protease tipo-subtilisina (Pr1). Segundo os autores, BBP foi caracterizada como uma serino-protease com atividade tipo quimotripsina e apresentou ponto isoelétrico e massa menores que Pr1. As duas proteases apresentaram igual atividade degradadora de cutícula, embora Pr1 seja sintetizada anteriormente a BBP.

A regulação destas proteases é complexa, envolvendo indução pelo substrato e repressão por carbono e nitrogênio. Campos et al. (2005) observaram que as maiores atividades proteolíticas de *B. bassiana* foram observadas quando o fungo foi cultivado na presença de substrato cuticular, enquanto o aminoácido alanina, um dos principais componentes da cutícula de carrapato, inibiu a secreção de proteases.

O estudo da produção e regulação de proteases por *B. bassiana* CG425 torna-se importante visando sua futura utilização no controle biológico de insetos-praga, particularmente de gafanhotos.

## 1.1 OBJETIVOS

- Avaliar a produção de proteases extracelulares do tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2) pelo isolado CG425 de *Beauveria bassiana*, em presença e ausência de cutícula do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides*;
- Analisar a regulação da produção de proteases do tipo-Pr1 e tipo-Pr2 na presença de substratos simples (glucose e aminoácidos) e complexos (cutícula suplementada com glucose e aminoácidos).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CONTROLE MICROBIANO DE GAFANHOTOS POR *BEAUVERIA BASSIANA*

Os insetos considerados praga da agricultura há muito tempo causam grandes prejuízos por atacarem lavouras economicamente importantes. O controle desses insetos normalmente é feito pelo emprego de agrotóxicos (controle químico) utilizando inseticidas que causam grandes danos ao meio ambiente e podem contaminar o agricultor. Além disso, este tipo de controle causa a seleção de insetos resistentes fazendo com que uma quantidade cada vez maior de inseticida seja empregada, elevando os custos da produção.

Na tentativa de reduzir o emprego de inseticidas, tem-se estudado a utilização de microrganismos que são patógenos naturais desses insetos. Este tipo de controle apresenta algumas vantagens como a especificidade, não prejudicando insetos considerados ecologicamente importantes, além de diminuir o desenvolvimento de resistência. O controle microbiano também não causa danos ao ambiente e é mais duradouro, já que o fungo permanece mais tempo no ambiente. Por outro lado, há algumas desvantagens, como a 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, como temperatura, umidade, luminosidade e radiação (ALVES, 1998a).

Dentre os microrganismos, os fungos são considerados os mais promissores para o controle de insetos, já que é o único grupo microbiano capaz de invadir o inseto pela cutícula externa (GOETTEL et al., 1995), enquanto os demais patógenos precisam ser ingeridos para iniciar a doença. Devido a este mecanismo de infecção especializado, alguns fungos podem infectar os hospedeiros em diferentes estágios de desenvolvimento (McCOY e MILANI-TIGANO, 1996).

Cerca de 80% das doenças em insetos são originadas por fungos entomopatogênicos, os quais se distribuem em cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. Os principais gêneros são *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Nomurea*, *Verticilium* e *Entomophthora* (ALVES, 1998b). Segundo este autor, 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 alvos. Além disso, estes microrganismos apresentam alto potencial de disseminação pelo ambiente. Em geral, o

bioinseticida é capaz de permanecer no ambiente e continuar a mortalidade dos insetos em gerações subseqüentes, diminuindo oviposição, a viabilidade de ovos e aumentando a sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos.

O gênero *Beauveria* compreende diversas espécies, sendo *Beauveria bassiana* a mais empregada como agente de controle microbiano (BUTT et al., 2001). *B. bassiana* pertence a divisão Ascomycota, ordem Hypocrealean (CHO et al., 2006). Esta espécie apresenta uma forma de vida única, sendo saprófita facultativo, ou ainda ocorrendo na forma endofítica em milho (BING; LEWIS, 1992), além de seu potencial patogênico. *B. bassiana* produz pelo menos três estruturas reprodutivas, sendo estas, conídio aéreo, blastósporos *in vitro* e conídios submersos, as quais apresentam diferentes propriedades morfológicas e bioquímicas (THOMAS et al., 1987; JEFFS et al., 1999). Os conídios aéreos são produzidos em células conidiogênicas a partir de hifas e micélio em superfícies sólidas (HEGEDUS et al., 1992), sendo normalmente empregados como agente infeccioso em práticas de controle biológico. Os blastósporos *in vitro* representam um estado vegetativo produzido em meios ricos em nutrientes e são liberados a partir da hifa em crescimento (BIDOCHKA et al., 1987). Já a produção de conídios submersos representa uma adaptação a condições de estresse nutricional (BIDOCHKA et al., 1987).

*B. bassiana* apresenta ampla distribuição geográfica e é parasita natural de um grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos além de ácaros. Em condições de laboratório pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que no campo ocorre de forma enzoótica e epizoótica em coleópteros, lepidópteros e hemípteros, e em ocorrências enzoóticas sobre dípteros, himenópteros e ortópteros (ALVES, 1998b).

O potencial de *B. bassiana* para o controle de gafanhotos já é conhecido desde 1936, quando Schaefer reportou que uma grande nuvem do gafanhoto *Nomadacris septemfasciata* (Seville) foi dizimada por este fungo na África do Sul (SHAEFER, 1936 apud JEFFS et al., 1997).

Em estudos de campo, Johnson e Goettel (1993) demonstraram pela primeira vez um controle efetivo do gafanhoto migratório *Melanoplus sanguinipes* por *B. bassiana*. Segundo estes autores, a razão de colonização foi de 70% após dois dias de aplicação dos conídios. Em contraste, Inglis et al. (1997) observaram baixa eficácia de *B. bassiana* (linhagens GHA92 e GHA94) contra *M. sanguinipes*. Segundo os autores, as condições ambientais foram determinantes nos resultados obtidos.

Posteriormente, Delgado et al. (1999) demonstraram a virulência de *B. bassiana* contra 30 espécies de gafanhotos em campo. Segundo estes autores, a aplicação

integrada de conídios de *B. bassiana* e um formulado químico (diflubenzuron) resultou em maior mortalidade de gafanhotos, pois o emprego do inseticida facilitou a infecção pelo fungo. Estes resultados reforçam a possibilidade de utilização de *B. bassiana* em programas de manejo integrado de pragas (MIP).

Em 1999 um produto comercial a base de conídios de *B. bassiana*, denominado “Mycotrol” foi registrado nos Estados Unidos, e desde então tem sido empregado em campo para o controle de uma grande variedade de insetos-praga, incluindo gafanhotos. Segundo Wraight et al. (2001), a viabilidade e infectividade dos conídios deste formulado permanecem inalteradas mesmo após longos períodos de estocagem.

No Brasil, uma das espécies de gafanhoto mais danosas à agricultura é *Rhammatocerus schistocercoides* que ataca plantações e pastagens nativas no Estado do Mato Grosso. A linhagem CG425 de *B. bassiana* foi testada contra este gafanhoto, mostrando alta virulência e capacidade de esporular internamente no inseto em condições de alta umidade relativa, o que mostra seu potencial no controle desta praga (MAGALHÃES et al., 2000).

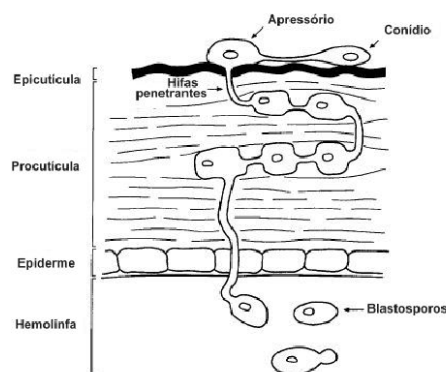
## 2.2 PROCESSO DE INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA

Existem vários fatores de patogenidade envolvidos no controle de insetos por fungos, tornando este mecanismo multifatorial (ALVES, 1998a; CLARKSON et al., 1998; St LEGER et al., 1991).

A cutícula dos insetos forma uma barreira contra organismos que não possuem um mecanismo ativo para a sua penetração (vírus, bactérias e protozoários). Como já mencionado, somente fungos entomopatogênicos podem invadir seus hospedeiros através da cutícula, rompendo esta barreira por mecanismos enzimáticos e/ou químicos. A cutícula compreende uma delgada epicutícula de lipídios e proteínas cobrindo uma compacta procutícula que é composta por microfibrilas de quitina embebidas em proteína. Sua resistência mecânica deve-se, em grande parte, a sua resistência biológica pela associação destes componentes (St. LEGER, 1995).

Segundo Alves (1998b) 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. Como as proteínas são os maiores componentes da cutícula do inseto, acredita-se que proteases extracelulares produzidas por *B. bassiana* tenham um papel fundamental na hidrólise da cutícula e entrada do fungo na hemocele do hospedeiro. 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 internamente, 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., 1991).



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

A composição da cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria* foi estudada por St. Leger e colaboradores (1986) que verificaram que esta é composta principalmente por proteínas ricas em aminoácidos alanina, glicina e prolina, enquanto fenilalanina foi o aminoácido encontrado em menor proporção. Hackman e Goldberg (1987) ao estudar a cutícula abdominal de fêmeas adultas do gafanhoto *Locusta migratoria migratorioides* verificaram que os principais aminoácidos presentes são glicina, ácido glutâmico, prolina e alanina e que, metionina é o aminoácido presente em menor quantidade. Já o gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* apresenta proteínas covalentemente ligadas ricas em alanina e prolina, sendo que cisteína e metionina estavam ausentes na cutícula deste gafanhoto (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1992).

Os fungos entomopatogênicos apresentam vários determinantes de entomopatogenicidade, incluindo a produção de proteases degradadoras de cutícula, dentre as quais, proteases do tipo-subtilisina (Pr1) e do tipo-tripsina (Pr2). Proteases do tipo subtilisina produzidas por *Metarhizium anisopliae* representam o melhor modelo de determinante de patogenicidade em fungos entomopatogênicos (St. LEGER, 1995).

As proteases do tipo-subtilisina e tipo-tripsina fazem parte do grupo das serino proteases por possuírem um resíduo serina no sítio ativo. Tripsina e subtilisina são cineticamente muito similares hidrolisando peptídeos e substratos ésteres sintéticos. Seus picos de atividade são próximos aos valores de pH 7 e 8, decaindo em pH mais ácido (FERSHT, 1977). A maior diferença entre as serino proteases é a especificidade, sendo a tripsina específica para peptídeos e ésteres dos aminoácidos lisina e arginina e a subtilisina específica para a fração hidrofóbica de cadeias de fenilalanina, tirosina e triptofano (FERSHT, 1977).

Proteases do tipo Pr1 e Pr2 já foram detectadas em sobrenadante de cultivo de diversas espécies entomopatogênicas, incluindo *B. bassiana* (St. LEGER et al., 1987b). Segundo os autores, as enzimas do tipo Pr1 produzidas pelos fungos analisados apresentaram similaridades quanto à especificidade pelo substrato, porém, anticorpos contra proteases de *M. anisopliae* var. *anisopliae* reagiram somente com proteases produzidas por isolados da mesma espécie, não ocorrendo reação com as proteases produzidas pelas demais espécies analisadas.

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. (1994a) relataram que esta enzima estaria envolvida na ativação ou indução de Pr1 em *M. anisopliae*. 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 proteases extracelulares (Pr1 e Pr2) a partir de sete isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* após crescimento em meio contendo cutícula de *R. schistocercoides* e substratos não cuticulares. Estes autores observaram a ocorrência de variabilidade natural entre os isolados quanto a 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.

Um dos primeiros trabalhos sobre a produção de proteases degradadoras de cutícula por *B. bassiana* foi realizado por Bidochka e Khachatourians (1987) que identificaram a produção de uma protease extracelular pela linhagem GK2016 quando esta foi crescida em um meio contendo gelatina como única fonte de carbono e nitrogênio. Esta protease possui aproximadamente 35 kDa e apresentou atividade ótima em pH 8,5 e a 37° C, sendo rapidamente inativada a 50°C. Estes autores demonstraram a atividade endopeptidase da protease, já que hidrolisou elastina, caseína e gelatina, mas foi pouco ativa em soro albumina bovina e colágeno. A inibição por fluoreto de fenilmetil-sulfonil (PMSF) indicou a presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima.

Posteriormente, a comparação de uma linhagem selvagem de *B. bassiana* com uma linhagem mutante, deficiente na produção de protease, confirmou a importância das proteases como fator de virulência para esta espécie, já que a linhagem mutante apresentou um decréscimo no grau de virulência contra o gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990).

Urtz e Rice (2000) purificaram e caracterizaram uma protease extracelular de *B. bassiana*, a qual foi denominada BBP (*Beauveria bassiana* protease). Esta enzima foi produzida nos estágios tardios do crescimento fúngico em meio contendo gelatina, sendo inibida por PMSF e quimostatina. Segundo os autores, BBP é uma serino-protease com atividade tipo quimotripsina e especificidade pelo substrato meosuc-ala-ala-pro-met-*p*-nitroanilina. A BBP apresentou estabilidade a 25°C e valor de pH ótimo alcalino (7,5 - 9,5). Neste mesmo trabalho foi também purificada uma protease tipo subtilisina (Pr1), a qual foi caracterizada baseando-se no ponto isoelétrico, seqüência amino-terminal, especificidade pelo substrato (suc-ala-ala-pro-phe-*p*-nitroanilina) e habilidade em degradar cutícula. Uma análise comparativa entre as duas revelou que BBP tem um ponto isoelétrico inferior (pI 7,5) quando comparado com o da Pr1 (pI  $\geq$  10) e apresenta um peso molecular menor. No entanto, as duas proteases têm igual atividade degradadora de cutícula, embora Pr1 seja sintetizada anteriormente a BBP.

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. Clarkson e Charnley (1996) relataram que a adição de glucose 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 glucose ou aminoácidos (St. LEGER et al., 1987a, b; PATERSON et al., 1994b).

Recentemente, Campos et al. (2005) estudaram a produção de proteases por *B. bassiana* em presença de cutícula do carrapato *Boophilus microplus* e de diferentes aminoácidos. Segundo estes autores, as maiores atividades proteolíticas foram observadas quando o fungo foi crescido na presença de substrato cuticular, enquanto o aminoácido alanina, que é um dos principais componentes da cutícula do carrapato, inibiu a secreção de proteases.

A composição de aminoácidos das proteínas presentes na cutícula do hospedeiro pode influenciar o desenvolvimento do fungo e o processo de infecção. Smith e Gula (1981) estudaram a influência de diversos aminoácidos na germinação e crescimento de *B. bassiana* e observaram que no mínimo três dos aminoácidos testados foram necessários para uma boa germinação e crescimento, embora tenha sido observada germinação em menor extensão quando alanina, histidina ou fenilalanina foram testadas individualmente. A ausência de alanina sempre resultou em baixa frequência de germinação e crescimento da hifa, demonstrando que, embora o fungo não tenha requerimentos específicos de aminoácidos individuais, alguns são preferencialmente utilizados para o seu desenvolvimento.

Bidochka e Khachatourins (1994) testaram a adsorção de proteases de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Verticillium lecanii* à cutícula de *Galleria mellonella* na presença de cinco aminoácidos individualmente. Estes autores observaram redução na adsorção de proteases na presença de lisina ou ácido glutâmico, enquanto que na presença de alanina, prolina ou tirosina não houve alteração na adsorção, quando comparada à cutícula.

A produção de Pr1 e Pr2 também apresenta um padrão diferencial de expressão em relação ao pH do ambiente (St. LEGER et al., 1998). Independente do meio conter substrato indutível, ambas as enzimas só foram produzidas no pH ótimo de atividade (pH 8,0), embora o nível de produção tenha aumentado quando induzida por componentes da cutícula. No processo de penetração do fungo no hospedeiro, o pH da cutícula aumentou de 6,3 para 7,7, corroborando com o valor de regulação pelo pH na produção de Pr1 e Pr2. 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.

Dias (2005) observou que a produção de proteases do tipo Pr1 e Pr2 pelo isolado CG425 de *B. bassiana* em presença de cutícula de *Hypothenemus hampei* (broca do café) foi induzida por componentes da cutícula e que o pH do meio de cultivo foi determinante na expressão destas enzimas. Este autor avaliou a produção de Pr1 e Pr2 em meio de sais (nitrato como fonte de nitrogênio) e meio contendo substrato cuticular tanto em condições tamponantes quanto não tamponantes. Em meio não tamponado contendo cutícula, os valores de pH das culturas variaram em função do tempo de cultivo. A atividade enzimática foi detectada somente em valores de pH superiores a 5,5. Já nos experimentos em que o meio foi tamponado, a atividade de ambas proteases ocorreu em todos os tempos testados, sendo superior em meio contendo substrato cuticular comparada com a detectada em meio contendo fonte inorgânica de nitrogênio.

Muitos trabalhos têm descrito o emprego de técnicas moleculares no estudo de determinantes de patogenicidade, particularmente de proteases degradadoras de cutícula, em fungos entomopatogênicos. St. Leger et al. (1992) isolaram e caracterizaram o cDNA (DNA complementar) que codifica 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 estavam presentes.

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 do 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*.

Joshi et al. (1997) utilizaram a técnica de RT-DD-PCR (Reverse transcription differential display PCR) para identificar genes diferencialmente expressos por *M. anisopliae* na presença de cutícula. O gene que codifica 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.



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 várias subtilisinas (11 para *M. anisopliae* var. *anisopliae* e 3 para *M. anisopliae* var. *acridum*), sendo que 7 destas 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 grupos: subtilisinas da classe I (Pr1C), que são similares às bacterianas e 3 grupos de subtilisinas de classe II (tipo-proteinase K): subfamília 1 de subtilisinas extracelulares (Pr1A, Pr1B, Pr1G, Pr1I e Pr1K); subfamília 2 de subtilisinas extracelulares (Pr1D, Pr1E, Pr1F e Pr1J) e uma subtilisina endocelular (Pr1H). 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*).

As várias isoformas de Pr1 podem ter divergido independentemente, especializando-se em diferentes funções. Presumidamente, as diferentes subtilisinas podem participar de diferentes processos na patogenicidade, aumentar a adaptação e o número de hospedeiros, ou ainda, permitir a aquisição de novos nichos ecológicos. Por exemplo, a espécie *M. anisopliae* var. *acridum* ocupa menos habitats e infecta um menor número de insetos que *M. anisopliae* var. *anisopliae*. A maior especialização de *M. anisopliae* var. *acridum* é coerente com o número reduzido de subtilisinas, sugerindo a perda da plasticidade patogênica desta espécie. *M. anisopliae* var. *anisopliae*, por outro lado, possui maior variedade de subtilisinas e também de hospedeiros (BAGGA et al., 2004).

A comparação de alinhamentos e taxas de similaridades das isoformas de Pr1, dentro da mesma linhagem e entre linhagens de *M. anisopliae*, mostrou que aminoácidos envolvidos na catálise das subtilisinas passaram por fortes pressões seletivas, enquanto as demais seqüências divergiram de forma neutra. Isto sugere que cada Pr1 contribui diferentemente no desenvolvimento da patogenicidade. Além disso, a comparação por homologia de seqüências indica que há diferenças nas funções das subtilisinas, como especificidade de substratos, estabilidade alcalina e propriedades de adsorção à cutícula.

Muito provavelmente, cada isoforma de Pr1 constitui um determinante de patogenicidade (BAGGA et al., 2004).

Até o momento não existem relatos da produção de proteases degradadoras de cutícula pelo isolado CG425 de *B. bassiana* em presença de cutícula do gafanhoto *R. schistocercoides*. O estudo da regulação da produção de proteases por este isolado aumentará nosso conhecimento sobre o mecanismo de infecção do hospedeiro, dando subsídios quanto à utilização do fungo em campo para controle de insetos-praga.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ISOLADO FÚNGICO

Foi utilizado o isolado CG425 de *Beauveria bassiana* proveniente do banco de fungos entomopatogênicos do CENARGEN/EMBRAPA – DF. Este isolado foi obtido a partir de cadáver do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* no estado do Mato Grosso.

#### 3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

##### 3.2.1 Meio mínimo solidificado - MM (Pontecorvo et al., 1953)

NaNO <sub>3</sub> .....	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,001 g
ZnSO <sub>4</sub> .....	0,001 g
Glucose.....	10 g
Água destilada.....	1000 mL
Agar.....	15 g

O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% e em seguida foi esterilizado sob calor úmido a 121°C por 20 minutos.

### 3.2.2 Meio completo solidificado - MC (Pontecorvo et al., 1953)

MM solidificado acrescido de:

Extrato de levedura.....	0,5 g
Peptona.....	2,0 g
Caseína hidrolisada.....	1,5 g
Solução de vitaminas.....	1,0 mL

O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% e em seguida foi esterilizado sob calor úmido a 121°C por 20 minutos.

### 3.2.3 Solução de vitaminas adicionada ao MC

Ácido nicotínico.....	100 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico.....	10 mg
Tiamina.....	50 mg
Biotina.....	0,2 mg
Piridoxina.....	50 mg
Riboflavina.....	100 mg
Água destilada e esterilizada.....	100 mL

A solução foi mantida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e após resfriamento foi mantida a 4°C.

### 3.2.4 Suspensão de cutícula (p/v)

Para a obtenção de cutícula foram utilizados insetos adultos de *R. schistocercoides*. Estes insetos foram secos em estufa a 80°C por 24 horas e, posteriormente, foram dissecados a fim de separar os exoesqueletos que foram macerados com o auxílio de um cadinho e pistilo. O pó resultante foi armazenado em freezer a -20°C. Para uso, foi preparada uma suspensão de cutícula 0,5% em solução de tetraborato de potássio (1%) que foi submetida a vapor fluente por 30 minutos. Em seguida, a suspensão de cutícula foi adicionada ao meio mínimo previamente esterilizado, sendo novamente submetido a vapor fluente por 15 minutos.

### 3.2.5 Reagente de Bradford (Bradford, 1976)

Foram dissolvidos 100 mg de Comassie Brilliant Blue G 250 (SIGMA) em 50 mL de etanol 95%. Em seguida, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v). A solução resultante foi diluída para um volume de 1 L e filtrada em papel de filtro Whatman. A concentração final dos reagentes na solução foi: Comassie Brillhant Blue G 250 0,01% (p/v), etanol 4,7% (p/v), ácido fosfórico 8,5% (p/v).

### 3.2.6 Substrato de protease tipo subtilisina (Pr1) 1mM

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilina (SIGMA).....	12,5 mg
Água destilada estéril (q.s.p.).....	20 mL

### 3.2.7 Substrato de protease tipo tripsina (Pr2) 1mM

N-Benzoyl-Phe-Val-Arg- <i>p</i> -nitroanilina (SIGMA).....	13,6 mg
Água destilada estéril (q.s.p.).....	20 mL

Os substratos foram dissolvidos com DMSO (volume suficiente para dissolver) e, em seguida, o volume foi completado para 20 mL com água destilada estéril.

### 3.3 CURVA PADRÃO PARA A DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A curva padrão para a dosagem de proteínas totais foi realizada utilizando-se concentrações de 2 a 10 µg de proteína (soro albumina bovina - BSA) (Tabela 1). O volume foi completado para 100 µL com água destilada, seguido da adição de 1 mL do reagente de Bradford. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um agitador de tubos (vórtex) e a absorvância foi medida em 595 nm, num período de 2 a 60 minutos.

**Tabela 1** – Curva padrão para dosagem de proteína total

Tubos	BSA* (0,1 mg/mL)	Água	Reagente de Bradford	Concentração (µg/100µL)
Branco	-	100 µl	1 mL	0
1	20 µl	80 µl	1 mL	2
2	40 µl	60 µl	1 mL	4
3	60 µl	40 µl	1 mL	6
4	80 µl	20 µl	1 mL	8
5	100 µl	-	1 mL	10

\* BSA: soro albumina bovina.

- : ausência.

### 3.4 CURVA PADRÃO PARA DOSAGEM DE P-NITROANILINA

A curva padrão para a dosagem de *p*-nitroanilina foi realizada utilizando-se concentrações de 0,1 a 5 µg de *p*-nitroanilina (Tabela 2). O volume foi completado para 4 mL com água destilada e, em seguida, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um agitador de tubos (vórtex). A leitura da absorvância foi realizada a 410 nm, num período de 2 a 60 minutos.

**Tabela 2** – Curva padrão para dosagem de *p*-nitroanilina

Tubos	<i>p</i> -nitroanilina (20 µg/mL)	Água	Concentração (µg/mL)
1	-	4,0 mL	0
2	0,02 mL	3,98 mL	0,1
3	0,05 mL	3,95 mL	0,25
4	0,1 mL	3,9 mL	0,5
5	0,2 mL	3,8 mL	1,0
6	0,3 mL	3,7 mL	1,5
7	0,4 mL	3,6 mL	2,0
8	0,5 mL	3,5 mL	2,5
9	0,6 mL	3,4 mL	3,0
10	0,8 mL	3,2 mL	4,0
11	1,0 mL	3,0 mL	5,0

- : ausência

### 3.5 Análise da produção de proteases

#### 3.5.1 Atividade proteolítica em cultura líquida

Para análise da produção de proteases em relação à fonte de carbono, o isolado CG425 foi crescido em MM e MMI + cut (meio mínimo de indução: MM sem nitrato

e sem glucose acrescido de cutícula 0,5%) para obtenção de conídios. Após 7 dias de incubação a 28°C, suspensão de conídios foi inoculada (concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL) em 20 mL de MM líquido e MMI acrescido de cutícula 0,5%. A incubação foi a 28°C sob agitação de 180 rpm por 0, 48, 72 e 96 horas. Foram realizadas três repetições, utilizando um frasco para cada tempo.

A regulação da produção de proteases pelo isolado CG425 também foi analisada em presença de diferentes aminoácidos. Após crescimento em MM por 7 dias a 28°C, uma suspensão de conídios foi inoculada ( $5 \times 10^6$  conídios/mL) em 20 mL de MM líquido. Os cultivos foram incubados a 28°C sob agitação de 180 rpm por 72 horas. A cada cultivo foram adicionados fontes de carbono simples (glicose e aminoácidos) e substratos complexos (Tabela 3). Nos tratamentos, os aminoácidos e glucose foram suplementados (equivalente a concentração inicial) a cada 24 h. Foram realizadas três repetições, utilizando um frasco para cada tempo.

**Tabela 3** – Fonte de carbono e aminoácidos adicionados ao cultivo de *B. bassiana* (CG 425)

<b>Fonte simples</b>	<b>Fonte complexa</b>
Glucose 1%	Cutícula 0,5%
D-alanina 0,5%	Cutícula 0,5% + D-alanina 0,5%
L-alanina 0,5%	Cutícula 0,5% + L-alanina 0,5%
Prolina 0,5%	Cutícula 0,5% + prolina 0,5%
Glicina 0,5%	Cutícula 0,5% + glicina 0,5%
Metionina 0,5%	Cutícula 0,5% + metionina 0,5%

A regulação da produção de proteases foi também analisada em presença de diferentes concentrações do aminoácido metionina. Após crescimento em MM por 7 dias a 28°C, uma suspensão de conídios foi inoculada ( $5 \times 10^6$  conídios/mL) em 20 mL de MM e MMI. Os cultivos foram incubados a 28°C sob agitação de 180 rpm por 72 horas. A cada cultivo foi adicionado metionina nas concentrações 0,25, 0,5 e 0,75%.



### 3.5.2 Preparo das frações enzimáticas

Após cada período de incubação, o micélio foi separado do sobrenadante de cultivo por centrifugação a 8000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante de cultivo foi mantido a -20°C e utilizado como fração enzimática secretada.

### 3.5.3 Atividades enzimáticas sobre substratos sintéticos

Atividades tipo-Pr1 (subtilisina) e tipo-Pr2 (tripsina) foram determinadas utilizando substratos sintéticos específicos: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilina e N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilina, respectivamente.

As reações enzimáticas foram realizadas como descrito por Tiago et al. (2004). O método utilizado para a determinação enzimática baseia-se na hidrólise dos 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) foi realizada utilizando tubos em duplicata conforme tabela 4:

**Tabela 4** – Determinação da atividade enzimática de proteases tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2)

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

C- Controle negativo

\* Sobrenadante aquecido a aproximadamente 98°C/5 minutos.

- : Ausência

Após incubação em banho-maria a 28°C por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 0,25 mL 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 submetidas a centrifugação por 1250g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outros tubos e após 10 minutos de repouso foi realizada a leitura espectrofotométrica a 410 nm.

### 3.5.4 Atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína

A atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína foi determinada segundo o método descrito por Charnley e Tomarelli (1947). Este método baseia-se na hidrólise da azocaseína com liberação de sulfanilamida, mensurável espectrofotometricamente a 440 nm. Quando hidrolisada, a azocaseína libera aminoácidos ou oligopeptídeos não precipitáveis por ácidos fortes como o ácido tricloroacético (TCA) ou ácido perclórico (PCA).

A determinação da atividade enzimática do sobrenadante do meio de cultivo foi realizada utilizando tubos em duplicata, segundo a Tabela 5.

**Tabela 5** – Determinação da atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína

Tubos	Tris-HCl 0,2 M pH 8,5	H <sub>2</sub> O	Substrato 1 g%	Sobrenadante
C-	0,05 mL	—	0,0125 mL	0,375 mL*
Branco	0,05 mL	0,375 mL	0,0125 mL	—
Teste	0,05 mL	—	0,0125 mL	0,375 mL

C- Controle negativo

\* Sobrenadante aquecido a aproximadamente 98°C/5 minutos.

- : Ausência

Após incubação em banho-maria a 28°C por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 0,25 mL de solução de TCA 10%, e os tubos mantidos em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga e submetidas a centrifugação por 1250g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e neutralizado pela adição de 0,25 mL de NaOH 2N, seguido de repouso por 10 minutos. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 440 nm. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de sulfanilamida/mL/h.

### 3.5.5 Dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976)

Para a dosagem de proteínas totais, a partir dos sobrenadantes de cultivo, foi utilizado 0,1 mL de cada amostra e 1 mL do Reagente de Bradford. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um agitador de tubos (vórtex) e em seguida foi feita a leitura da densidade ótica em 595 nm.

### 3.5.6 Análise das proteínas totais secretadas em SDS-PAGE

As proteínas secretadas foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida segundo Laemmli (1970). Um volume de 25 mL dos sobrenadantes de cultivo foi concentrado até o volume aproximado de 1,5 mL em liofilizador. A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada como descrito no item 3.5.5. A cada amostra (17,0 µg de proteína) foram adicionados 10 µL de tampão de amostra 3X concentrado (Tris/SDS 0,5M pH 6.8/ 2-mercaptoetanol 8% (p/v)/ SDS 4%/ glicerol 20% (v/v)/ traços de azul de bromofenol), seguido de incubação a 100°C por 5 minutos e aplicação no gel.

A solução do gel de separação (15%) compreendeu: 2,03 mL Tris/SDS 1,5M pH 8.8/ 1,95 mL água destilada/ 4 mL acrilamida/bis (31/0,9)/ 3,2 µL TEMED/ 80 µL persulfato de amônio (25%). A solução do gel de empilhamento (5%) compreendeu: 0,75 mL Tris/SDS 0,5M pH 6.8/ 1,68 mL água destilada/ 0,54 mL acrilamida/bis (31/0,9)/ 1,5 µL TEMED/ 15 µL persulfato de amônio (25%). Após a polimerização o sistema foi montado em cuba apropriada, preenchida com tampão de corrida 1X [Tris 0,3% (p/v)/ glicina 1,44% (p/v)/ SDS 0,1% (p/v)].

A corrida eletroforética foi realizada a 4°C por 2 horas a 16 Volts/cm. Ao término da corrida, o gel foi corado em solução de Comassie Brilliant Blue R 250 (SIGMA) 0,1% por 2 h e descorado com solução de ácido acético 10% (v/v)/ metanol 30% (v/v) até a revelação das bandas protéicas. O padrão de massa molecular utilizado foi “protein ladder” (10 – 220 KDa) (Invitrogen).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SUBSTRATO CUTICULAR

A produção de proteases por fungos entomopatogênicos em meios de cultivo contendo substrato cuticular têm sido relatada para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (St. LEGER et al., 1986, 1987a, b, 1989, 1996; PATERSON et al. 1994a; de MORAES et al., 2003), *M. anisopliae* var. *acridum* (TIAGO et al., 2002; PINTO et al., 2002) e *Nomurea rileyi* (ELSAYED et al., 1993).

Quanto a *B. bassiana* a produção de proteases em presença de cutícula dos hospedeiros já foi descrita por St. Leger et al. (1986), Bidochka e Khachatourians (1987, 1990), Gupta et al. (1992, 1994) e Campos et al. (2005).

Neste trabalho, a atividade proteolítica extracelular a partir de cultivo líquido do isolado CG425 de *B. bassiana* foi analisada após diferentes tempos de incubação em meio mínimo (MM) e meio mínimo (sem nitrato e sem glucose) acrescido de cutícula de *R. schistocercoides* (MMI + cut).

Para determinação da atividade proteolítica foram utilizados substratos sintéticos específicos para atividade tipo-Pr1 (subtilisina) e tipo-Pr2 (tripsina), como descrito por Tiago et al. (2004) (item 3.5.3). A atividade proteolítica foi determinada também utilizando-se o substrato natural azocaseína, segundo Charnley e Tomarelli (1947) (item 3.5.4).

Proteases extracelulares do tipo-Pr1 foram detectadas a partir de 24 horas de cultivo em ambos meios testados (Tabela 6, Figura 2).

Na ausência de cutícula (meio mínimo), observou-se que a atividade de proteases do tipo-Pr1 foi crescente até o último tempo testado (96 horas). Já em presença de cutícula de *R. schistocercoides*, a atividade de Pr1 foi crescente até 48 horas. A atividade de proteases do tipo-Pr1 em meio contendo cutícula foi superior à observada em MM em todos os tempos testados. Este dado sugere que a produção destas proteases pelo isolado CG425 foi provavelmente induzida por componentes da cutícula de *R. schistocercoides*.

Este dado concorda com os obtidos anteriormente por outros autores. Gupta et al. (1992) analisaram a produção de enzimas degradadoras de cutícula, incluindo proteases, por isolados de *B. bassiana* e observaram que altos níveis de atividade ocorreram em presença

de substrato cuticular. Além disso, segundo os autores, a variabilidade entre os isolados refletiu diferenças na quantidade de enzimas produzidas, bem como no padrão de expressão destas enzimas frente a diferentes meios de cultivo testados.

Mais recentemente, Campos et al. (2005) descreveram que os maiores picos de atividade proteolítica (protease tipo-Pr1), a partir do sobrenadante de cultivo de *B. bassiana*, ocorreram em presença de cutícula do carrapato *Boophilus microplus*. Além disso, Urtz e Rice (2000) demonstraram que duas proteases extracelulares purificadas a partir do cultivo de *B. bassiana* (BBP e tipo-subtilisina-Pr1) apresentaram atividade degradadora de cutícula.

Quanto à espécie *M. anisopliae*, Paterson et al. (1994a) descreveram que Pr1 foi especificamente induzida em presença de cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. Pinto et al. (2002) analisaram a produção de Pr1 a partir de sete isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* após crescimento em meio contendo cutícula de *R. schistocercoides* e substratos não cuticulares. A produção de Pr1 foi observada em todos os sobrenadantes analisados, porém, os maiores níveis enzimáticos foram observados em meio contendo cutícula, sugerindo também a ocorrência de indução da produção de Pr1 por componentes da cutícula de *R. schistocercoides*.

Quanto à atividade proteolítica do tipo-Pr2, foi observado níveis basais a partir de sobrenadante de cultivo em MM (nitrito como fonte de nitrogênio), em todos os tempos analisados (Tabela 6, Figura 3). Já em MMI acrescido de cutícula (0,5%) a atividade proteolítica foi detectada a partir de 24 horas de cultivo, sendo superior a detectada em MM, em todos os tempos testados. Estes dados sugerem que a produção de Pr2 pelo isolado CG425 de *B. bassiana* também parece ser induzida por componentes cuticulares. Para *M. anisopliae* var. *acridum*, Pinto et al. (2002) demonstraram que a produção de proteases tipo-Pr2 foi maior em meio suplementado com cutícula de *R. schistocercoides* quando comparado à produção em substrato não-cuticular (caseína e nitrito).

Em contraste, níveis elevados de Pr2 foram observados no sobrenadante de cultivo da mesma linhagem de *M. anisopliae* var. *acridum* tanto em MM quanto em meio acrescido de cutícula do gafanhoto *Schistocerca pallens* (TIAGO et al., 2002).

Como mostrado na Tabela 6, a atividade de protease do tipo tripsina (Pr2) não foi detectada anteriormente à atividade do tipo subtilisina (Pr1), sugerindo que, para este isolado de *B. bassiana*, a produção de ambos tipos proteolíticos não deve ocorrer de forma coordenada. Para *Metarhizium* spp a produção de Pr2 ocorreu previamente a produção de Pr1, tendo sido sugerido seu papel na indução ou ativação de Pr1 (GILLESPIE et al., 1998).

A ausência de atividade no tempo zero de incubação, em presença de substrato cuticular, sugere que embora os conídios utilizados como inóculo nos experimentos tenham sido obtidos a partir de meio contendo cutícula, não ocorreu indução prévia da produção destas proteases.

A partir dos perfis de produção de Pr1 e Pr2 pode-se observar algumas características comuns como a ausência de atividade no tempo zero e atividade superior em meios contendo substrato cuticular. Porém, os valores de Pr1 foram superiores aos de Pr2, em ambos meios testados, sugerindo que o sistema de regulação destas enzimas é distinto, refletindo, provavelmente, funções diferentes durante o processo de infecção.

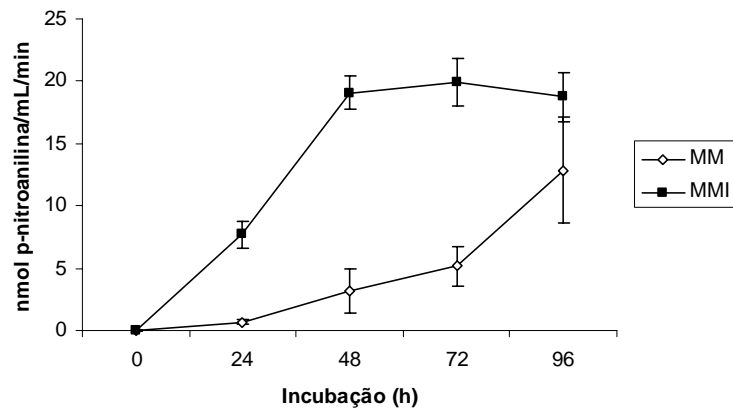
**Tabela 6** – Atividade proteolítica do isolado CG425 de *Beauveria bassiana* cultivado em meio mínimo (MM) e meio de indução (MMI acrescido de cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides*)

Incubação (h)	Meio mínimo			Meio mínimo de indução		
	Pr1 <sup>1</sup>	Pr2 <sup>1</sup>	Azocaseína <sup>2</sup>	Pr1 <sup>1</sup>	Pr2 <sup>1</sup>	Azocaseína <sup>2</sup>
0	0	0	0,008±0,001	0	0	0
24	0,661±0,186	0	0	7,706±1,083	6,505±3,781	0,274±0,055
48	3,184±1,771	1,677±0,904	0,026±0,011	19,077±1,369	11,679±2,500	0,533±0,116
72	5,143±1,630	0	0,191±0,030	19,899±1,885	11,036±1,766	0,525±0,084
96	12,843±4,248	1,398±0,225	0,263±0,140	18,740±1,966	12,564±1,157	0,557±0,037

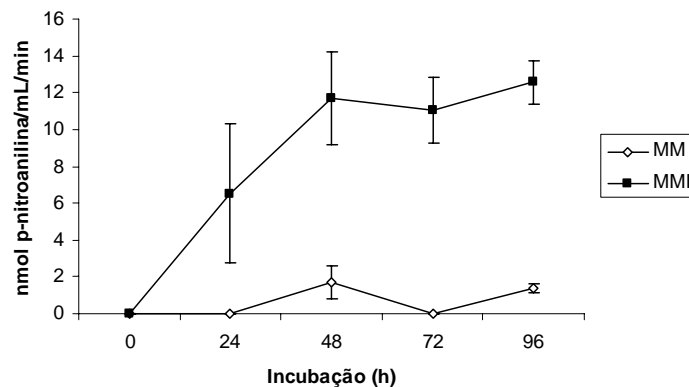
Os resultados são médias de três experimentos independentes.

<sup>1</sup> nmol *p*-nitroanilina/mL/min

<sup>2</sup> μmol de sulfanilamida/mL/min



**Figura 2** – Atividade Pr1 extracelular do isolado CG425 de *B. bassiana* após diferentes tempos de incubação em MM (meio mínimo) e MMI (meio de indução) acrescido de cutícula. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.



**Figura 3** – Atividade Pr2 extracelular do isolado CG425 de *B. bassiana* após diferentes tempos de incubação em MM (meio mínimo) e MMI (meio de indução) acrescido de cutícula. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

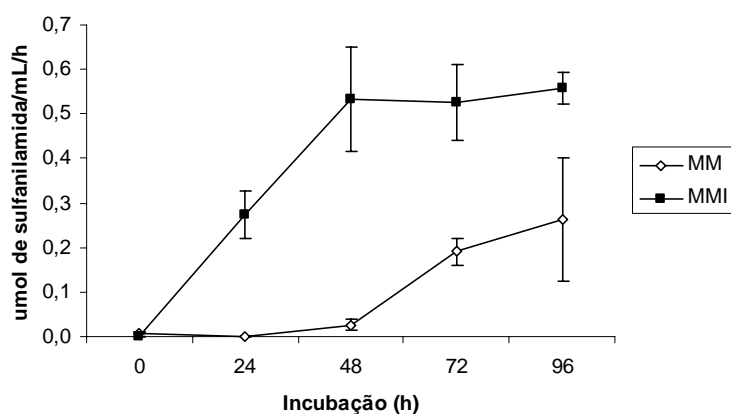
A atividade proteolítica também foi determinada empregando-se o substrato natural azocaseína. Em MM (nitrato como fonte de nitrogênio) valores basais de atividade proteolítica foram detectados em todos os tempos analisados, exceto em 24 horas (Tabela 6, Figura 4). Já em MMI acrescido de cutícula (0,5%) a atividade proteolítica foi detectada a



partir de 24 horas de cultivo e em valores superiores aos observados no sobrenadante de cultivo em MM.

Na ausência de cutícula, observa-se que a atividade sobre o substrato azocaseína foi crescente até o último tempo testado (96 horas), sugerindo uma expressão aumentada em função do tempo de cultivo. Já em presença de cutícula a atividade foi crescente até 48 horas, permanecendo constante após este período.

Quando comparamos o perfil de atividade sobre o substrato azocaseína com os das atividades do tipo-Pr1 e tipo-Pr2, podemos observar que o perfil de atividade em azocaseína foi semelhante ao de proteases do tipo-Pr1, em ambos meios testados, sugerindo que seja provável que este tipo proteolítico seja prevalente nos sobrenadantes de cultivo analisados.



**Figura 4** – Atividade proteolítica sobre o substrato natural azocaseína do isolado CG425 de *Beauveria bassiana* após diferentes tempos de incubação em MM (meio mínimo) e MMI (meio de indução) acrescido de cutícula. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

#### 4.2 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM PRESENÇA DE AMINOÁCIDOS DISTINTOS

O isolado CG425 de *B. bassiana* foi cultivado por 72 horas em meio mínimo adicionado de fonte simples de carbono e nitrogênio (glucose e aminoácidos) e substratos complexos (Tabela 3). Estes experimentos foram direcionados para verificar o

efeito regulatório destas fontes de carbono e nitrogênio na secreção de proteases dos tipos-Pr1 e Pr2.

A Tabela 7 e a Figura 5 mostram que os menores valores de proteases do tipo-Pr1 ocorreram na presença dos aminoácidos L-alanina, prolina e glicina, enquanto que em presença do aminoácido metionina e nos cultivos contendo cutícula ocorreram os maiores valores de atividade enzimática. Os sobrenadantes contendo glucose e D-alanina apresentaram atividade tipo-Pr1 intermediária de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em presença de glucose (1%) e de aminoácidos individuais, exceto metionina, não ocorreu indução significativa de proteases do tipo-Pr1, comparativamente ao observado em meio contendo substrato cuticular. Interessante notar que estes aminoácidos foram detectados como componentes de proteínas cuticulares de gafanhotos (ST. LEGER et al. 1986; HACKMAN e GOLDBERG, 1987).

Já em cultivos contendo metionina, a secreção de proteases do tipo-Pr1 foi estatisticamente semelhante ao observado no cultivo contendo cutícula de *R. schistocercoides* (Tabela 7). Interessante ressaltar, que segundo alguns autores, este aminoácido está ausente ou ocorre em pequenas quantidades em cutícula de artrópodes, particularmente de gafanhotos (HACKMAN e GOLDBERG, 1987; BIDOCHKA e KHACHATOURIANS, 1992).

Nos cultivos contendo substratos complexos (cutícula 0.5% e aminoácidos individuais 0,5%) não foi observada repressão catabólica, pela adição de aminoácidos, uma vez que não houve diferenças significativas na produção de subtilisinas, comparativamente ao observado em meio contendo cutícula (Tabela 7).

Campos et al. (2005) analisaram a produção de várias proteases e quitinases produzidas por *B. bassiana* e *Beauveria amorpha* na presença da cutícula do carrapato *B. microplus* e de alguns aminoácidos e observaram repressão da atividade tipo subtilisina em cultivos adicionados de alanina e glicina, sendo que os maiores picos de atividade ocorreram na presença da cutícula do carrapato. Paterson et al. (1994b) também relataram a ocorrência de repressão da produção de Pr1 em cultivos de *M. anisopliae* na presença de alanina, prolina e glicina.

**Tabela 7** – Atividade proteolítica do isolado CG425 de *Beauveria bassiana* após cultivo por 72h em substratos simples (glucose e aminoácidos individuais) e complexos (cutícula e substratos simples).

Substrato	Atividade proteolítica		
	Pr1 <sup>1</sup>	Pr2 <sup>1</sup>	Azocaseína <sup>2</sup>
Glucose 1%	5,883 <sup>b</sup>	10,456 <sup>bcd</sup>	0,067 <sup>a</sup>
D-alanina 0,5%	5,577 <sup>b</sup>	5,092 <sup>a</sup>	0,123 <sup>a</sup>
L-alanina 0,5%	2,152 <sup>a</sup>	5,187 <sup>a</sup>	0,066 <sup>a</sup>
Prolina 0,5%	2,331 <sup>a</sup>	8,612 <sup>bc</sup>	0,035 <sup>a</sup>
Glicina 0,5%	2,458 <sup>a</sup>	8,465 <sup>b</sup>	0,037 <sup>a</sup>
Metionina 0,5%	15,526 <sup>c</sup>	9,118 <sup>bcd</sup>	0,258 <sup>b</sup>
Cutícula 0,5%	15,441 <sup>c</sup>	12,648 <sup>e</sup>	0,357 <sup>bcd</sup>
Cutícula 0,5% + D-alanina 0,5%	15,199 <sup>c</sup>	11,331 <sup>cde</sup>	0,400 <sup>cd</sup>
Cutícula 0,5% + L-alanina 0,5%	16,284 <sup>c</sup>	12,701 <sup>e</sup>	0,271 <sup>b</sup>
Cutícula 0,5% + prolina 0,5%	15,831 <sup>c</sup>	11,763 <sup>de</sup>	0,295 <sup>bc</sup>
Cutícula 0,5% + glicina 0,5%	15,599 <sup>c</sup>	13,038 <sup>e</sup>	0,432 <sup>d</sup>
Cutícula 0,5% + metionina 0,5%	15,494 <sup>c</sup>	12,174 <sup>e</sup>	0,370 <sup>bcd</sup>

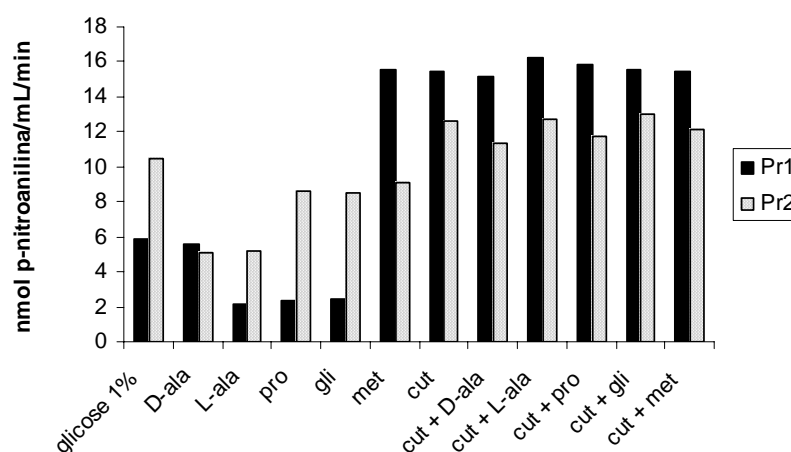
Os resultados são médias de três experimentos independentes. Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> nmol *p*-nitroanilina.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>

<sup>2</sup> μmol de sulfanilamida.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>

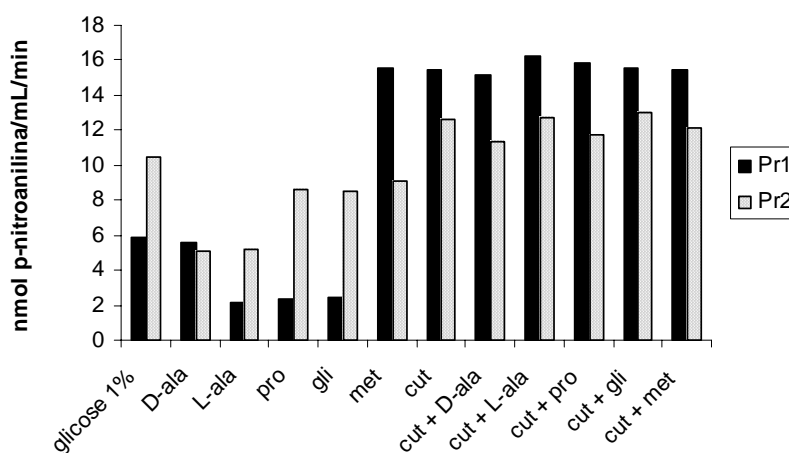
Já a produção de proteases do tipo-Pr2 foi significativamente inferior em meios contendo os aminoácidos individuais, comparativamente ao observado em meio contendo substrato cuticular, sendo os menores valores observados em meios contendo D- e L-alanina (Tabela 7). A produção de proteases nos cultivos onde foram adicionados glucose (1%) e substratos complexos (cutícula 0,5% e aminoácidos 0,5%) não diferiu significativamente do observado no cultivo contendo somente cutícula (Tabela 7), sugerindo também a não ocorrência de repressão catabólica, nas condições testadas.

Campos et al. (2005), ao analisar a produção de proteases por um determinado isolado de *B. bassiana*, após cultivo em presença de diferentes aminoácidos, não observaram atividade do tipo-Pr2. Esta diferença em relação aos resultados obtidos em nosso trabalho pode estar relacionada com a variabilidade natural encontrada entre diferentes isolados de uma mesma espécie, como descrito por Gupta et al. (1992).



**Figura 5** – Atividades do tipo-Pr1 e Pr2 do isolado CG425 de *Beauveria bassiana* após cultivo por 72h em substratos simples (glucose e aminoácidos individuais) e complexos (cutícula e substratos simples). Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

Nos ensaios com o substrato natural azocaseína (Tabela 7, Figura 6) os menores valores de atividade proteolítica também ocorreram nos cultivos contendo os aminoácidos alanina, glicina e prolina. Já no cultivo contendo metionina não houve diferença significativa quanto a produção de proteases comparativamente ao obtido em meio contendo cutícula, assim como nos cultivos contendo substratos complexos (cutícula acrescido de aminoácidos). O perfil de regulação de proteases detectadas pelo emprego do substrato azocaseína foi semelhante ao perfil de regulação de proteases do tipo-Pr1 reforçando que este tipo proteolítico seja prevalente nos sobrenadantes de cultivo analisados, em relação a outros tipos de atividade proteolítica.



**Figura 6** – Atividade proteolítica sobre o substrato natural azocaseína do isolado CG425 de *B. bassiana* após cultivo por 72h em substratos simples (glucose e aminoácidos individuais) e complexos (cutícula e substratos simples). Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

#### 4.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE METIONINA

O aminoácido metionina foi a única fonte simples testada que resultou em atividade proteolítica estatisticamente semelhante aos cultivos contendo cutícula. Além disso, metionina difere dos demais aminoácidos testados no que se refere à baixa ocorrência ou ausência em cutícula de gafanhotos (HACKMAN E GOLDBERG, 1987; BIDOCHKA e KHACHATOURIANS, 1992). A metionina é um aminoácido hidrofóbico e possui uma cadeia lateral apolar com um átomo de enxofre. Sua rota degradativa é complexa produzindo propionil-coA que é convertido a succinil-coA por uma série de reações.

Para verificar o efeito do aminoácido metionina na regulação da secreção de proteases, o isolado CG425 foi cultivado em meio mínimo (MM) e MMI suplementado com cutícula (0,5%) e diferentes concentrações de metionina.

A Tabela 8 e a Figura 7 mostram que somente nos cultivos contendo metionina nas concentrações de 0,25% e 0,75% a atividade do tipo-Pr1 foi significativamente inferior à das demais condições testadas.

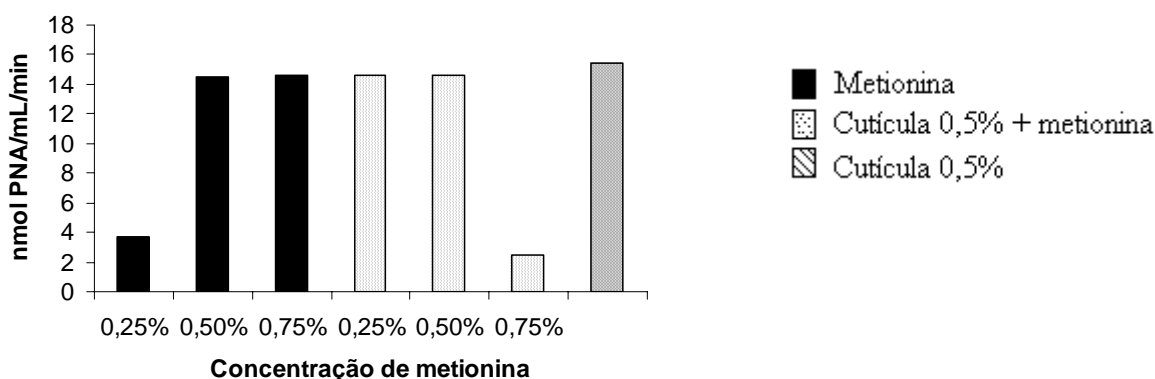
Podemos observar que a adição de metionina na concentração de 0,25% resultou em atividade basal de proteases tipo-Pr1, ocorrendo indução somente a partir da

concentração de 0,5%. Já na presença de cutícula, as concentrações de 0,25% e 0,5% não alteraram a atividade tipo-Pr1, sendo que na concentração de 0,75% houve repressão de sua expressão. Estes dados sugerem que a metionina, apesar de ocorrer em pequenas quantidades na cutícula de alguns gafanhotos, tem papel na regulação da produção de protease do tipo-Pr1 por *B. bassiana*. Como mencionado anteriormente, alguns autores já demonstraram a influência de alguns aminoácidos, normalmente presentes em grande quantidade em cutícula de gafanhotos, na produção de proteases do tipo-Pr1 por *B. bassiana* (PATERSON et al., 1994b; CAMPOS et al., 2005).

**Tabela 8** – Atividade tipo-Pr1 do isolado CG425 de *Beauveria bassiana* após cultivo por 72h em diferentes concentrações de metionina, na ausência e presença de cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides*.

Substrato	Protease tipo-Pr1 (nmol <i>p</i> -nitroanilina.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
Metionina 0,25%	3,743 <sup>b</sup>
Metionina 0,5%	14,461 <sup>c</sup>
Metionina 0,75%	14,619 <sup>c</sup>
Cutícula 0,5% + metionina 0,25%	14,577 <sup>c</sup>
Cutícula 0,5% + metionina 0,5%	14,651 <sup>c</sup>
Cutícula 0,5% + metionina 0,75%	2,510 <sup>a</sup>
Cutícula 0,5%	15,441 <sup>c</sup>

Os resultados são médias de três experimentos independentes. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

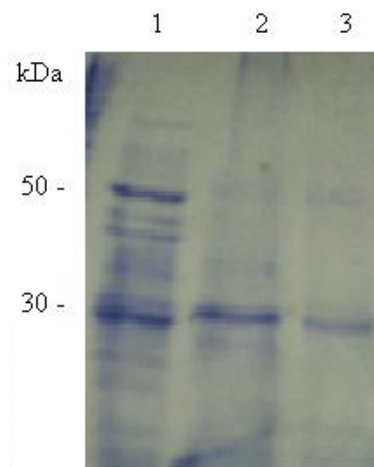


**Figura 7** – Atividade tipo-Pr1 do isolado CG425 de *B. bassiana* após cultivo por 72h em diferentes concentrações de metionina na ausência e presença de cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides*.

#### 4.4 Análise das proteínas totais secretadas em SDS-PAGE

O perfil de proteínas secretadas nos cultivos em presença de cutícula (0,5%), cutícula (0,5%) acrescido de metionina (0,5%) e metionina (0,5%) foi analisado em gel de poliacrilamida (Figura 8).

Como pode-se observar, o padrão de proteínas secretadas diferiu com as condições de cultivo analisadas. O perfil eletroforético do sobrenadante de cultivo em presença de cutícula foi mais complexo comparativamente ao obtido nas outras condições de cultivo. Nos cultivos em que foi adicionado metionina, observa-se a ausência da maioria das proteínas. No entanto, o perfil eletroforético das três culturas demonstrou a presença de uma proteína comum de aproximadamente 30 kDa. Considerando que Urtz e Rice (2000) caracterizaram uma protease do tipo Pr1 de *B. bassiana* com atividade degradadora de cutícula e peso molecular estimado em 32 kDa e que no nosso trabalho não foi observada diferença significativa na produção de proteases, nestas condições de cultivo, é possível que a presença desta proteína nos cultivos analisados possa corresponder a uma protease do tipo-Pr1.



**Figura 8** – Análise eletroforética das proteínas totais secretadas pelo isolado CG425 de *B. bassiana* na presença de: **1** – cutícula (0,5%), **2** – cutícula (0,5%) + metionina (0,5%), **3** – metionina (0,5%). Foi aplicada 17  $\mu$ g de proteína de cada amostra.



## REFERÊNCIAS

- ALVES, B. S. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, B. S. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. p. 21-37.
- ALVES, B. S. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, B. S. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b. p. 289-381.
- BAGGA, S.; H. U., G.; SCREEN, S. E.; St LEGER, R. J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 324, p. 159- 169, 2004.
- 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, p. 1679-1684, 1987.
- BIDOCHKA, M. J., PFEIFER, T. A., KHACHATOURIANS, G. G. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. **Mycopathologia**, v. 99, p. 77-83, 1987.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanopus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 56, p. 362-370, 1990.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanopus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 165-173, 1992.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 63, p. 7-13, 1994.
- BING, L. A. E; LEWIS, L. C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Huebner). **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, p. 39-47, 1992.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 31, p. 426-428, 1976.

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.

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

CHARNLEY, A. K.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

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

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

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

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

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.

DIAS, B.A. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana***. Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2005.

ELSAYED, G. N.; IGNOFFO, C. M.; LEATHERS, T. D.; GUPTA, S. C. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**, v. 122, p. 78-87, 1993.

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

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

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.; 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 *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 13-17, 1994.

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

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

INGLIS, G. D., JOHNSON, D. L., GOETTEL, M. S. Field and laboratory evaluation of two conidial batches of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against grasshoppers. **Canadian Entomologist**, v. 129, p. 171-186, 1997.

JEFFS, L. B.; FENG, M.; 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, p. 383-390, 1997.

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

JOHNSON, D. L., GOETTEL, M. S. Reduction of grasshopper populations following field application of the fungus *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 165-175, 1993.

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. 197, p. 1-8, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

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

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

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

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONDS, L. M.; McDONALD, K. D.; BUPTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-148, 1953.

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

St. LEGER, R. J. The role of cuticle degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, (Suppl. 1), S1119-S1125, 1995.

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

St. LEGER, R. J.; 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. 121-131, 1987b.

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

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

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

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

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

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.

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

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.

WRAIGHT, S. P., JACKSON, M. A., KOCK, S. L. Production, stabilization and formulation of biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N. (Eds). CAB International, Wallingford, pp. 253-287, 2001.

## **PARTE II**

### **Seleção de agro-transformantes de *Beauveria bassiana* quanto a produção de conídios**

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é considerado um promissor agente de controle biológico de insetos-praga da agricultura. Para sua utilização, porém, é importante o conhecimento das etapas envolvidas no processo de infecção do hospedeiro, bem como dos fatores de virulência envolvidos neste processo. Além de enzimas degradadoras de cutícula, a produção de conídios também tem papel na ação patogênica do fungo, pois é através do conídio que ocorre a germinação e formação do apressório que promove a ação mecânica para a penetração da cutícula do hospedeiro.

Para um melhor entendimento dos fatores de virulência de fungos entomopatogênicos, várias técnicas de transformação genética vêm sendo empregadas atualmente. Dentre elas, destaca-se a transformação genética que faz uso da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (AMT – *Agrobacterium*-mediated transformation). O sistema *Agrobacterium* envolve a capacidade natural desta bactéria em transferir parte de seu plasmídeo (T-DNA) para células hospedeiras. Esta metodologia tem permitido a obtenção de um maior número de transformantes para vários fungos, quando comparado às metodologias de transformação tradicionais.

Na AMT é comum a ocorrência de integração aleatória do T-DNA em sítios únicos do genoma da célula hospedeira (COMBIER et al. 2003), o que tem estimulado o emprego desta metodologia como ferramenta na obtenção de mutantes (mutagênese insercional). Além disso, a conservação parcial das bordas esquerda (LB) e direita (RB) após a incorporação do T-DNA no genoma da célula hospedeira têm permitido a identificação de seqüências de DNA genômico que flanqueiam o T-DNA pelo emprego da técnica de “TAIL-PCR” (“Thermal Asymmetrical Interlaced-Polymerase Chain Reaction”) (COMBIER et al., 2003; ROLLAND et al., 2003; TSUJI et al. 2003).



## 1.1 OBJETIVOS

- Analisar agro-transformantes do isolado CG26 de *B. bassiana* quanto a alteração na produção de conídios;
- Amplificar o genoma fúngico que flanqueia o T-DNA de agro-transformantes que apresentam conidiação reduzida.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA AGROBACTERIUM TUMEFACIENS COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DE MUTAGÊNESE INSERCIONAL**

A transformação genética compreende um sistema de recombinação via a incorporação de DNA exógeno no interior de células hospedeiras. A elaboração de sistemas de transformação genética para fungos entomopatogênicos representa uma ferramenta nos estudos de virulência, pois possibilita a expressão de genes de interesse com a obtenção de linhagens geneticamente manipuladas, apresentando aumento de sua capacidade bioinseticida (St. LEGER et al., 1996). Além disso, permite a obtenção de mutantes para determinantes de entomopatogenicidade, através de mutagênese insercional.

As técnicas empregadas em mutagênese insercional têm como objetivo a disrupção de genes de forma eficiente e aleatória em um organismo alvo, provocando nos organismos transformantes alterações fenotípicas. Através da seleção dos organismos que apresentam estas alterações, pode-se resgatar o gene nocauteado do genoma. Esta metodologia tem sido amplamente empregada para fungos patogênicos e permitido a identificação de genes relacionados a patogenicidade (COMBIER et al., 2003).

A principal vantagem da mutagênese insercional sobre outras técnicas de mutagênese é o fato da mutação estar associada à integração do DNA transformante, permitindo o resgate e/ou identificação de DNA genômico que o flanqueia (THON et al., 2000).

O sucesso do emprego de estratégias de mutagênese randômica mediada por transformação, independente da técnica empregada, é dependente de como a metodologia é delineada e otimizada. No geral, três parâmetros são fundamentais para a geração e seleção de mutantes insercionais. O primeiro corresponde a obtenção de transformantes que exibam uma alteração fenotípica, a qual seja preferencialmente resultante de inserções únicas no genoma hospedeiro. O segundo relaciona-se a existência de uma metodologia simples de análise de transformantes que permita a identificação do fenótipo desejado, ou seja, paralelamente à obtenção de um banco de transformantes, deverá ser desenvolvido um sistema de análise rápida, sensível e reproduzível. E, uma vez que os transformantes tenham sido selecionados, o

terceiro parâmetro relaciona-se à forma com que o gene alvo será recuperado a partir do genoma da linhagem mutante (MULLINS e KANG, 2001).

Uma das metodologias de transformação comumente empregada em estudos de mutagênese insercional é baseada no emprego de *Agrobacterium tumefaciens* (AMT, “*Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation”).

Esta metodologia de transformação genética tem sido empregada para transferência e etiquetagem de genes em uma grande variedade de plantas há algumas décadas, sendo amplamente empregada como ferramenta para mutagênese insercional em *Arabidopsis thaliana* (CHANG et al., 1994).

*A. tumefaciens* é um bacilo Gram-negativo aeróbico encontrado no solo e é responsável por causar tumores em células vegetais (KADO, 1991). Durante a formação do tumor, a bactéria transfere parte do seu plasmídeo Ti (*tumor inducing*), o T-DNA, para a célula vegetal. O plasmídeo Ti tem cerca de 200 kilobases e nele se encontram os genes *vir* que codificam proteínas essenciais envolvidas na transferência do T-DNA para a célula hospedeira. Essas proteínas detectam a presença de interrupção ou perda da integridade na célula vegetal, pela liberação de compostos fenólicos como acetoseringona (AS) produzidos pelas plantas, e também promovem a transferência do T-DNA para a célula hospedeira. A região de T-DNA é flanqueada por duas seqüências curtas, de aproximadamente 25 pares de bases, denominadas de borda direita (RB) e borda esquerda (LB), que são essenciais para o processo de infecção. O plasmídeo Ti das linhagens de *A. tumefaciens* utilizadas para a transformação *in vitro* não apresentam a região de T-DNA e as bordas (LB e RB), não ocorrendo a transferência de material genético para a célula hospedeira. Neste caso, o plasmídeo Ti passa a ser denominado de “plasmídeo desarmado ou helper”. Por outro lado, a região de T-DNA é modificada pela remoção dos oncogenes sendo substituídos por genes de interesse (a serem expressos na célula hospedeira) e inseridos em um segundo vetor. Este vetor híbrido, denominado vetor binário, é re-introduzido numa linhagem de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo Ti desarmado a qual readquire a capacidade de transformar células hospedeiras (MICHELSE et al, 2005).

Além de seu hospedeiro natural (células vegetais), *A. tumefaciens* apresenta também a capacidade de transferir parte de seu DNA para leveduras, fungos filamentosos e células humanas (BUNDOCK et al., 1995; De GROOT et al., 1998; KUNIK et al., 2001). A metodologia para fungos consiste em co-cultivar células alvo do hospedeiro e células de *A. tumefaciens* (contendo o vetor binário). O co-cultivo é realizado em presença de acetoseringona, a fim de simular o ambiente vegetal e induzir a expressão dos genes *vir*. Após

o período de co-cultivo, as células são transferidas para meio seletivo contendo antibiótico, para inibir o desenvolvimento bacteriano, além de selecionar células alvo transformadas (De GROOT et al., 1998).

Várias espécies fúngicas têm sido transformadas pelo emprego de *A. tumefaciens* (MICHIELSE et al., 2005). Nesta metodologia de transformação é comum a ocorrência de integração aleatória de T-DNA em sítios únicos no genoma da célula hospedeira o que tem estimulado o seu emprego como ferramenta na obtenção de coleções de mutantes insercionais. Esta forma de integração e a conservação parcial das bordas esquerda (LB) e direita (RB) após a incorporação do T-DNA no genoma da célula hospedeira têm permitido a identificação de seqüências de DNA genômico que flanqueiam o T-DNA pelo emprego da técnica de “TAIL-PCR” (“Thermal Asymmetrical Interlaced-Polymerase Chain Reaction”) (COMBIER et al., 2003; ROLLAND et al., 2003; TSUJI et al. 2003).

## **2.2 AGRO-TRANSFORMAÇÃO DE BEAVERIA BASSIANA**

Como já mencionado, para o melhor entendimento do processo de colonização de insetos alvos por fungos entomopatogênicos é necessário conhecer o mecanismo de infecção e os fatores de virulência envolvidos nesse processo. Neste sentido, a transformação genética via *A. tumefaciens* pode ser uma ferramenta útil já que apresenta como característica a inserção do T-DNA de forma aleatória no genoma podendo levar a nocaute de genes relacionados à virulência, propiciando posterior identificação de genes envolvidos neste processo.

Dentre os fatores de virulência de *B. bassiana*, a eficiência de conidiação é importante uma vez que os conídios correspondem ao tipo celular empregado como agente microbiano de controle. É o conídio, que em condições ambientais favoráveis, irá germinar formando o apressório que, por ação mecânica e enzimática, poderá penetrar no inseto causando a doença e posterior morte deste. Após a morte do inseto o fungo produz conídios que poderão ser disseminados e colonizar outros insetos. O conhecimento do mecanismo de conidiação é, portanto, uma importante variável no estudo de fungos entomopatogênicos visando uma futura aplicação em campo.

Até o momento, a transformação de *B. bassiana* empregando-se AMT foi descrita por três grupos de pesquisa (REIS et al., 2004; LECLERQUE et al., 2004 e FANG et al., 2004).

Leclerque et al. (2004) obtiveram um banco de mutantes insercionais de *B. bassiana*, denominando essa estratégia de mutagênese insercional mediada por *A. tumefaciens* (AIM). Neste trabalho, cerca de 90% dos transformantes analisados apresentaram integração heteróloga do T-DNA em cópias únicas.

Fang et al. (2004) também produziram um banco de mutantes insercionais de *B. bassiana* utilizando o gene de resistência ao glifosinato de amônio como marcador seletivo. Apesar do baixo número de transformantes analisados (4), quanto ao número de cópias, todos apresentaram cópias únicas do T-DNA em diferentes locais do genoma do hospedeiro. Estes autores obtiveram um banco de aproximadamente 800 transformantes, dentre os quais 01 apresentou alterações fenotípicas visíveis além de drástica diminuição na virulência contra larvas de *Pieris rapae*.

Reis et al. (2004) descreveram a metodologia de AMT para o isolado CG26 de *B. bassiana*, empregando a linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens*. Estes autores demonstraram alta eficiência na transformação quando comparada a outras metodologias previamente utilizadas, como a de protoplasto-PEG (DABOUSSI et al., 1989) e a eletroporação (PFEIFER e KHACHATOURIANS, 1992). Reis et al. (2004) obtiveram um banco de aproximadamente 600 transformantes que foram analisados quanto a produção de proteases (DONATTI, 2004), sendo que dois apresentaram produção estatisticamente inferior à linhagem selvagem.

### **2.3 THERMAL ASYMMETRIC INTERLACED – POLYMERASE CHAIN REACTION (TAIL – PCR)**

A identificação de genes mutados em decorrência da inserção do T-DNA tem sido feita através do seqüenciamento de regiões que flanqueiam o inserto. Métodos baseados em PCR têm sido utilizados para amplificar seletivamente as regiões que flanqueiam as bordas direita e esquerda do T-DNA. Dentre estes métodos, destaca-se a “Thermal Asymmetric Interlaced – Polymerase Chain Reaction (TAIL – PCR)” descrita por Liu et al. (1995). A estratégia para amplificar as regiões que flanqueiam o T-DNA faz uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos que reconhecem o T-DNA e oligonucleotídeos

iniciadores degenerados não específicos que anelam em regiões desconhecidas do genoma da célula hospedeira. Para atenuar a amplificação de produtos não específicos são utilizados um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores específicos longos (temperatura de anelamento alta) e um oligonucleotídeo iniciador arbitrário degenerado curto (temperatura de anelamento baixa). Três reações de PCR são realizadas para atingir o objetivo final. Na primeira reação (PCR primária) utiliza-se um oligonucleotídeo iniciador específico para o reconhecimento do T-DNA e um oligonucleotídeo iniciador degenerado. Cinco ciclos de amplificação de alta estringência são realizados para que sejam formadas, de forma linear, fitas específicas. Em seguida é realizado um ciclo de PCR em baixa estringência para facilitar o anelamento inicial de bases mal combinadas do oligonucleotídeo iniciador degenerado com a seqüência alvo não conhecida. Logo depois, são realizados cerca de 15 ciclos alternados de alta e baixa estringência.

Uma segunda reação de PCR (PCR secundária) é realizada utilizando-se uma alíquota do produto (produto diluído) obtido na PCR primária. Como oligonucleotídeos iniciadores são empregados um oligonucleotídeo iniciador específico mais interno e o mesmo oligonucleotídeo iniciador degenerado usado na PCR primária. Finalmente, a terceira reação de PCR (PCR terciária) é realizada utilizando-se como molde uma alíquota do produto (produto diluído) obtido na PCR secundária e como iniciadores um oligonucleotídeo iniciador específico mais interno que o usado na PCR secundária e o mesmo oligonucleotídeo iniciador degenerado usado nas reações anteriores.

A TAIL-PCR tem se mostrado eficiente para a identificação de genes nocauteados de algumas espécies fúngicas. MULLINS et al. (2001) e ROLLAND et al. (2003) obtiveram sucesso de 90-100% de isolamento das bordas de T-DNA e do DNA fúngico que as flanqueia através da TAIL-PCR, porém nenhuma similaridade foi encontrada entre o DNA do hospedeiro e as seqüências depositadas em banco de dados (NCBI). Estes autores também não encontraram extensiva homologia entre o T-DNA e o local de integração ou entre os locais de integração dos diferentes transformantes, indicando que a integração do T-DNA no genoma fúngico ocorre de forma aleatória.

Pelo emprego da TAIL-PCR, Tsuji et al. (2003) obtiveram oito seqüências de DNA genômico de agro-transformantes do fungo *Colletotrichum lagenarium*, sendo que quatro destas seqüências correspondiam a de aminoácidos com significativa homologia àquelas presentes em banco de dados. Isto indica que a TAIL-PCR é uma ferramenta eficiente na identificação das seqüências do DNA do hospedeiro que flanqueiam o T-DNA.

Baseado nestas informações, a seleção de transformantes do isolado CG26 de *B. bassiana* (REIS et al., 2004) quanto a determinantes de entomopatogenicidade, particularmente quanto a produção de proteases e alteração na conidiação, poderá aumentar nosso conhecimento sobre os genes envolvidos na patogenia deste fungo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Agro-transformantes do isolado CG26 foram obtidos por REIS et al. (2004), empregando o vetor binário pPK2 (COVERT et al., 2001) que contém o cassete de resistência ao antibiótico higromicina-B. Um total de 179 transformantes (TP1-TP179) foram analisados quanto a alteração na conidiação.

#### 3.2 SOLUÇÕES

##### 3.2.1 Tampão de extração de DNA

Tris-HCl 1M pH 8,0.....	40 mL
NaCl 5M.....	10 mL
EDTA 0,5M pH 8,0.....	10 mL
SDS 10%.....	20 mL
Água destilada.....	120 mL

##### 3.2.2 Clorofil

Clorofórmio.....	24 partes
Álcool iso-amílico.....	1 parte



### 3.2.3 Clorofane

Fenol..... 1 parte

Clorofil..... 1 parte

### 3.2.4 Tampão de corrida TEB (10X)

Trisma base..... 121,14 g

EDTA..... 3,72 g

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>..... 51,3 g

O volume foi completado para 1000 mL com água destilada e diluído 10 vezes na hora do uso.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE CONIDIAÇÃO

Para a determinação da produção de conídios, a linhagem selvagem CG26 e um total de 179 agro-transformantes foram inoculados (inóculo de ponto) em MC (PONTECORVO et al., 1953) e incubados a 28°C por 15 dias. Após este período, foi analisada a presença de conídios com auxílio de microscópio estereoscópio (aumento de 40x), além do tamanho da colônia. Baseado nesta seleção inicial, os transformantes que apresentaram produção de conídios reduzida em relação ao selvagem (CG26) foram inoculados em MC (inóculo de ponto) e incubados a 28°C por 17 dias.

Após este período, foram retirados 3 blocos circulares de ágar de cada colônia (com o auxílio de um cilindro de metal de 7 mm de diâmetro) e colocados em frascos

estéreis contendo 1mL de solução Tween 20 (0,5%). A suspensão foi agitada em vórtex para o despreendimento dos conídios dos blocos de ágar. A partir da suspensão de conídios resultante foi estimado o número de conídios com auxílio de uma câmara de Neubauer. Os experimentos foram repetidos três vezes. Os resultados foram expressos em número de conídios por  $\text{cm}^2$ .

### **3.4 MICROCULTIVO**

O microcultivo foi realizado para a visualização de estruturas de reprodução assexuada (conidióforos) e conídios da linhagem selvagem CG26 e agro-transformantes que apresentaram redução significativa na produção de conídios.

Blocos de meio completo solidificado foram colocados sobre lâminas de microscopia esterilizadas. Em seguida, conídios da linhagem selvagem e de cada um dos transformantes testados foram inoculados em duas das extremidades do bloco. Por fim, foi colocada sobre os blocos uma lamínula esterilizada. As lâminas foram acondicionadas individualmente em placas de Petri esterilizadas contendo algodão umedecido e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Após este período, os blocos de ágar foram separados das lâminas e das lamínulas, e estas foram coradas com o corante lactofenol para facilitar a visualização dos conídios, conidióforos e hifas.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O teste t de Student (Teste t pareado) foi utilizado para a comparação da produção de conídios entre linhagem selvagem CG26 e cada um dos transformantes testados.

### 3.6 EXTRAÇÃO DE DNA (AZEVEDO ET AL., 2000)

Os agro-transformantes que apresentaram crescimento semelhante (para excluir a possibilidade de serem transformantes auxotróficos) e redução na conidiação, comparativamente ao isolado selvagem, foram submetidos à extração de DNA com vistas a análise de TAIL-PCR.

Uma suspensão de conídios ( $1 \times 10^6$  conídios/mL) dos transformantes foi inoculada em 30 mL de meio completo (MC) líquido e incubada por 48 horas a 28°C sob agitação (180 rpm). O micélio obtido foi coletado por filtração a vácuo, lavado com água destilada estéril para remoção dos restos de cultura e macerado em presença de nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. A este pó foi adicionado 500 µL de tampão de extração. A mistura foi incubada por 15 minutos em banho-maria a 65°C. Em seguida, foi adicionado 500 µL de fenol. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo adicionando-se 500 µL de clorofane seguido de centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos. O procedimento foi repetido substituindo-se o clorofane por clorofil. À fase aquosa foram adicionados 30 µL de NaCl 3M e 800 µL de etanol absoluto gelado. A mistura foi colocada a -20°C por 18 horas. O DNA foi sedimentado por centrifugação (12000 rpm por 5 minutos) e lavado com 300 µL de etanol 70% seguido de centrifugação (12000 rpm por 10 minutos). Após seco à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspendido em 60 µL de água MilliQ.

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

O DNA foi quantificado em gel de agarose 0.8% utilizando-se como marcador DNA  $\lambda$  com concentrações conhecidas (50, 75 e 100 ng/µL). A eletroforese foi realizada na presença de tampão TEB (1X) a 50V por aproximadamente 2 horas. O gel foi corado com brometo de etídeo e o DNA foi quantificado por comparação da fluorescência da banda dos transformantes com as bandas dos marcadores.

### 3.8 ANÁLISE MOLECULAR DOS TRANSFORMANTES POR PCR ASSIMÉTRICA (TAIL-PCR)

A TAIL-PCR dos transformantes selecionados foi realizada como descrito por Combier et al. (2003).

**Tabela 1** – Primers utilizados na TAIL-PCR

Nome do primer	Seqüência nucleotídica (5' a 3')	Nível de degenerescência <sup>a</sup>
RB1	GGCACTGGCCGTCGTTTTACAAC	-
RB2	AACGTCGTGACTGGGAAAACCCT	-
RB3	CCCTTCCCAACAGTTGCGCA	-
AD1	WGTGNAGWANCANAGA <sup>b</sup>	256

<sup>a</sup> – nível de degenerescência do primer degenerado.

<sup>b</sup> - W = A ou T; N = A, T, C ou G; S = G ou C.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 20 µL, contendo 1x tampão, 0,2mM dNTPs, 0,4 µM do primer RB-1, 10 µM do primer AD1 e 1,25 unidades de Taq polimerase (primeira reação). A segunda reação consistiu de: 1 µL do produto da primeira reação (diluição de 50x), 1x tampão, 0,2mM dNTPs, 0,4 µM do primer RB-2, 8 µM do primer AD1 e 1 unidade de Taq polimerase em volume final de 20 µL. A terceira reação consistiu de: 1 µL do produto da segunda reação (diluição de 50x), 1x tampão, 0,2mM dNTPs, 0,6 µM do primer RB-3, 6 µM do primer AD1 e 0,75 unidades de Taq polimerase em volume final de 100 µL.

As reações foram submetidas ao termociclador programado como descrito na Tabela 2. Os três ciclos de amplificação foram realizados em termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient). Os produtos de amplificação da segunda e terceira reação foram analisados em gel de agarose (0,8%) e o produto de amplificação da terceira reação foi retirado do gel e purificado empregando o kit CONCERT<sup>TM</sup> Rapid Gel Extraction System (Invitrogen).

**Tabela 2** – Condições a serem utilizadas no protocolo de PCR assimétrica (TAIL-PCR)

Primeira reação/ciclos	Programas
1	94°C, 1 min; 95°C, 1 min
5	94°C, 20 seg; 65°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
1	94°C, 20 seg; 30°C, 30 seg; 41°C, 55 seg
13	52°C, 55 seg; 63°C, 55 seg; 74°C, 30 seg
	94°C, 20 seg, 68°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
	94°C, 20 Seg; 68°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
	94°C, 20 Seg; 44°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
1	74°C, 1 min
Segunda reação/ciclos	
1	94°C, 1 min; 95°C, 1 min
10	94°C, 20 seg; 68°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
	94°C, 20 seg; 68°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
	94°C, 20 seg; 44°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
Terceira reação/ciclos	
1	74°C, 1 min
1	94°C, 1 min; 95°C, 1 min
10	94°C, 20 seg; 68°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
	94°C, 20 seg; 68°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
	94°C, 20 seg; 44°C, 5 seg; 74°C, 30 seg
1	74°C, 1 min

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DA CONIDIAÇÃO

A produção de conídios foi inicialmente analisada empregando-se a linhagem CG26 e 179 agro-transformantes de *B. bassiana*. Um total de 14 agro-transformantes (TP17, TP18, TP25, TP26, TP34, TP46, TP53, TP87, TP97, TP104, TP105, TP113, TP121 e TP125) apresentaram redução na produção de conídios comparativamente ao do isolado selvagem.

Os 14 agro-transformantes foram então testados quanto a produção de conídios após crescimento em meio completo (dados expressos em número de conídios por  $\text{cm}^2$ ). Todos os transformantes apresentaram produção de conídios significativamente inferior comparativamente ao do isolado CG26 (Teste t pareado,  $p < 0.05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Produção de conídios da linhagem selvagem e dos agro-transformantes de *B. bassiana*. Os resultados representam a média de dois experimentos.

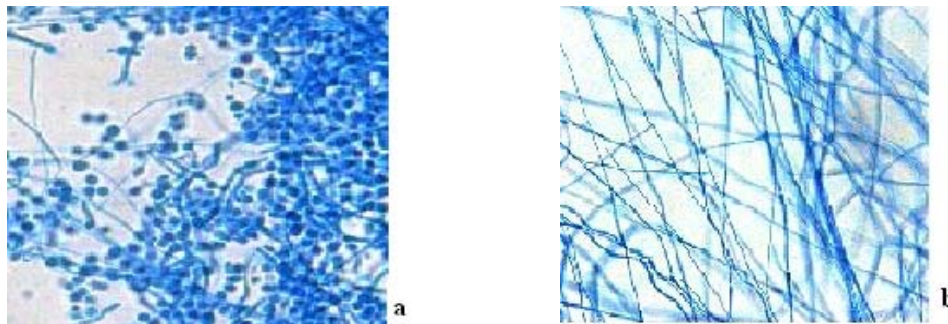
Linhagem	Número de conídios por $\text{cm}^2$	Teste t
CG26	$1,1 \times 10^8$	
TP17	$1,6 \times 10^7$	0,026*
TP18	$2,2 \times 10^7$	0,041*
TP25	$1,9 \times 10^7$	0,046*
TP26	$1,8 \times 10^7$	0,049*
TP34	$1,3 \times 10^7$	0,04*
TP46	$1,9 \times 10^7$	0,037*
TP53	$1,5 \times 10^7$	0,032*
TP87	$1,7 \times 10^7$	0,048*
TP97	$2,1 \times 10^7$	0,04*
TP104	$1,2 \times 10^7$	0,036*
TP105	$1,0 \times 10^7$	0,038*
TP113	$6,0 \times 10^6$	0,037*
TP121	$1,0 \times 10^7$	0,034*
TP125	$1,5 \times 10^7$	0,028*

\* Diferença significativa (Teste t -  $p < 0.05$ ) (duas amostras em par para médias)

## 4.2 ANÁLISE DE MICROCULTIVO

Alterações na produção de conídios foram também evidenciadas através da técnica de microcultivo seguida do exame direto em lâmina. Esta análise demonstrou que os 14 transformantes testados possuem alterações na conidiação, particularmente no que se refere ao número de conídios e a presença de conidióforos. A Figura 1 ilustra a análise de microcultivo da linhagem selvagem e do transformante TP125, após coloração com lactofenol. Como pode-se observar, no microcultivo da linhagem selvagem (Fig.1a) foi possível evidenciar grande produção de conídios através da relação: densidade de conídios/densidade de hifas. Já no microcultivo do transformante TP125 não se observou a presença de conídios e conidióforos (Fig.1b).

A obtenção de mutantes com conidiogênese reduzida ou mesmo quanto a formação de estruturas de reprodução assexuada (conidióforos) indica que o emprego desta metodologia pode ser promissor na busca de mutantes insercionais para este fenótipo em *B. bassiana*.



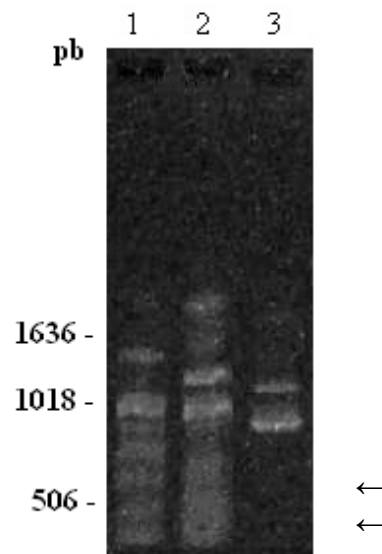
**Figura 1** – Microcultivo da linhagem selvagem (CG26) de *Beauveria bassiana* (a) e transformante TP125 (b). Aumento de 40x.

## 4.3 ANÁLISE POR TAIL-PCR

O transformante TP125 foi selecionado para análise por TAIL-PCR. Como observado na Figura 2, o produto da terceira reação da TAIL-PCR resultou em duas bandas

com massa molecular aproximadamente 100 pb menor do que as obtidas na segunda reação (setas), como esperado de acordo com a posição de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores RB2 e RB3 na região de T-DNA.

Estas bandas provenientes da terceira reação foram eluídas do gel de agarose e, posteriormente, serão submetidas a seqüenciamento e análise junto ao banco de dados do NCBI, visando a identificação das seqüências de DNA genômico que flanqueiam a região do inserto (T-DNA).



**Figura 2** – Gel de agarose 0,8% dos produtos da TAIL-PCR do transformante TP125. **1** – primeira reação, **2** – segunda reação, **3** – terceira reação.



## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 729-732, 2000.
- BUNDOCK, P.; den DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.
- CHANG, S. S.; PARK, S. K.; KIM, B. C.; KANG, B. J.; KIM, D. U.; NAM, H. G. Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. **Plant Journal**, v. 5, p. 551-558, 1994.
- COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiological Letters**, v. 220, p. 141-148, 2003.
- COVERT, S. F.; KAPOOR P.; LEE M-H.; BRILEY A. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, v. 105, p. 259-264, 2001.
- DABOUSSI, M. J.; DJEBALLI, A.; GERLINGER, C.; BLAISEAU, P. L.; BOUVIER, I.; CASSAU, M.; LEBRUN, M. H.; PARISOT, D.; BRYGOO, Y. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v. 15, p. 453-456, 1989.
- De GROOT, M. J. A.; BUNDOCK P.; HOOYKAAS P. J. J.; BEIJERSBERGEN A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 839-842, 1998.
- DONATTI, A. C. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana***. Monografia de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina, 48 p., 2004.
- FANG, W.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHENG, X.; DUAN, H.; LI, Y.; PEI, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide gene as a selection marker. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 18-24, 2004.

KADO, C. I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Science**, v. 10, p. 1-32, 1991.

KUNIK, T.; TZFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVSKY, V. Genetic transformation of Hela cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, p. 1871- 1876, 2001.

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

LIU, Y. G.; MITSUKAWA, N.; OOSUMI, T.; WHITTIER, R. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **The Plant Journal**, v. 8, p. 457-463, 1995.

MICHIELSE, C. B., HOOYKAAS, P. J. J., van den HONDEL, C. A. M. J. J.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, v. 48, p.1-17, 2005.

MULLINS, E. D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 2043-2052, 2001.

MULLINS, E. D.; CHEN, S.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, p. 173-180, 2001.

PFEIFER, T. A.; KHACHATOURIANS, G. G. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 376-381, 1992.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMONS, L. M.; Mac DONALD, K. D.; BUFFON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-148, 1953.

REIS M. C.; FUNGARO, M. H. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 197-202, 2004.

ROLLAND, S.; JOBIC, C.; FÈVRE, M.; BRUEL, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, v. 44, p. 164-171, 2003.

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

THON, M. R.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plants-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1356-1365, 2000.

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General and Plant Pathology**, v. 69, p. 230-239, 2003.

## 5 CONCLUSÕES

- A produção de proteases do tipo-subtilisina (Pr1) e do tipo-tripsina (Pr2) produzidas pelo isolado CG425 de *Beauveria bassiana* parece ser induzida por componentes cuticulares de *Rhammatocerus schistocercoides*, à semelhança do observado para outros fungos entomopatogênicos;
- A produção de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2, em presença de cutícula, parece não ocorrer de forma coordenada, já que ambas foram detectadas a partir de 24h de cultivo;
- O aminoácido metionina parece exercer papel na regulação da expressão de proteases tipo-Pr1 e tipo-Pr2 em *Beauveria bassiana*;
- A metodologia de transformação baseada no emprego de *Agrobacterium tumefaciens* (AMT) parece promissora em estudos de mutagênese insercional em *B. bassiana*, uma vez que permitiu a obtenção de mutantes com alterações na conidiação;
- O emprego da metodologia de TAIL-PCR parece ser promissor para a identificação e etiquetagem de seqüências de DNA genômico que flanqueiam a região de T-DNA neste transformante.

**ARTIGO - Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus  
Beauveria bassiana in the presence of Rhammatocerus schistocercoides  
cuticle**

**Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle**

Ariane Coelho Donatti, Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, Márcia Cristina Furlaneto\*

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. P.O. Box 6001, 86051-990. Londrina -PR, Brazil.

**Abstract**

Extracellular proteases have been shown to be virulence factors in fungal pathogenicity towards insects. We examined the production of extracellular proteases, subtilisin-like activity (Pr1) and trypsin-like activity (Pr2) by *Beauveria bassiana* CG425, which is a fungus of interest for the control of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides*. To access the role of these proteases during infection of *R. schistocercoides* we analyzed their secretion during fungus growth in either in nitrate-medium or in cuticle-containing medium supplemented with different amino acids. The enhancing effect of cuticle on Pr1 and Pr2 production suggests that these proteases-types may be specifically induced by components of the grasshopper cuticle. In medium supplemented with methionine high level of Pr1 was observed. The remaining amino acids tested did not induce the protease to the levels seen with cuticle. The amino acid methionine seems to play a regulatory role on Pr1 secretion by *B. bassiana*, since both induction and repression seems to be dependent on the concentration of the amino acid present in the culture medium.

**KEYWORDS:** biological control; subtilisin-like proteases (Pr1); trypsin-like proteases (Pr2); methionine; *Beauveria bassiana*

\* Corresponding author: E-mail address: [furlaneto@uel.br](mailto:furlaneto@uel.br) (M. C. Furlaneto)

## Introduction

Grasshoppers are one of the major pests of agricultural crops worldwide. In Central-Brazil the grasshopper, *Rhammatocerus schistocercoides*, is a serious pest of several crops and native pastures. The entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, has been described as one of the promising species for development as a biological control agent for grasshoppers (Bidochka et al., 1997). *B. bassiana*-based mycoinsecticide has already been developed and registered for the control of grasshoppers (Butt et al., 2001).

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

The first physical barrier to insect infection is the insect cuticle which is composed primarily of proteins. To transverse this barrier, entomopathogenic fungi utilize a combination of mechanical and enzymatic mechanisms, and the secretion of proteases is believed to be important pathogenic factor for fungal attack on cuticle (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 colonization 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). 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.

According to Bidochka and Khachatourians (1988a) the regulation of extracellular protease synthesis in *B. bassiana* is consistent with a multiple control model. These authors described that *B. bassiana* synthesizes and secretes an extracellular protease into its growth medium when an exogenous protein serves as its source of nitrogen and carbon. Furthermore, free amino acids generated from the hydrolysis of gelatin did not repress protease synthesis (Bidochka and Khachatourians, 1988b).

To help understand the role of proteases in *R. schistocercoides* cuticle penetration, it is desirable to determine how their synthesis is regulated in *B. bassiana*. Knowledge of how proteases production is regulated could be relevant to understanding the mechanisms of fungal pathogenesis. Therefore, in this study, we examined for the first time the production of Pr1 and Pr2 proteases by *B. bassiana* in the presence of *R. schistocercoides* cuticle, 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 spread plates of minimal medium (MM) (6g NaNO<sub>3</sub>, 1.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5g KCl, 1mg FeSO<sub>4</sub>, 1mg ZnSO<sub>4</sub>, 10g glucose, and 15g agar in 1000ml of distilled water), and MMI (MM without nitrate and glucose) supplemented with 0.5% insect cuticle prepared from adult *Rhammatocerus schistocercoides* using an aqueous solution of 1% potassium tetraborate (Andersen, 1980). The prepared cuticle was added to previously sterilized MMI and autoclaved for 5 min at 115°C. For enzyme production conidia were inoculated into 20 ml of liquid MM and MMI at a concentration of 5 x 10<sup>6</sup> conidia/ml and grown in submerged culture (180 rpm) at 28°C for 0, 24, 48, 72 and 96 h. Following growth, mycelium was harvested by centrifugation at 8000g for 15 min. The supernatants (extracellular fraction) obtained were stored at -20 °C and assayed for protease activity.

In another set of experiments, conidia were inoculated into 20 ml of liquid MM supplemented with glucose (1%) or grasshopper cuticle (*R. schistocercoides*) (0.5%) as carbon source. In cultures supplemented with cuticle, D-alanine, L-alanine, proline, glycine, and methionine (0.5%) were added together with the fungal inoculum and at each 24 h of growth. After 72 h of incubation at 28°C the mycelium was harvested by centrifugation at 8000g for 15 min.

An additional experiment was performed to determine the effect of the methionine on the protease activity. Different concentrations of methionine (0.25%, 0.5% and 0.75%) were

added to MM and MM supplemented with cuticle (0.5%). After 72 h of incubation at 28°C the mycelium was harvested by centrifugation at 8000g for 15 min.

All experiments were repeated three times, and the results represent mean values  $\pm$  SD.

### **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)<sub>2</sub>-proline-phenylalanine-*p*-nitroanilide and benzoyl-phenylalanine-valine-arginine-*p*-nitroanilide as substrates, respectively (St. Leger et al., 1987; Urtz and Rice, 2000). Each assay consisted of 0.05 ml substrate (1 mM), 0.85 ml 15 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) and 0.1 ml crude enzyme. The mixture was incubated for 30 min at 28°C and the reaction was terminated by adding 0.25 ml of 30% acetic acid and left to stand for 15 min in ice, after which samples were centrifuged at 1250g for 5 min at 4°C. The supernatants were read at 410 nm. Activities were expressed as nanomoles nitroanilide (NA) released per milliliter per min (St. Leger et al., 1998). Assays were performed in duplicate for each sample.

## Results and Discussion

Because proteins are the major constituent of grasshopper cuticle (Bidochka and Khachatourians, 1992) and extracellular proteases are produced in abundance by fungi grown in liquid cultures containing ground grasshopper cuticles (St. Leger et al., 1986), it has been postulated that extracellular proteases are involved in cuticle hydrolysis and facilitate hyphal penetration through the cuticle. Like most fungal pathogens, *B. bassiana* might use a combination of enzymes to penetrate the cuticle and access the nutrient-rich host haemocoel.

*Beauveria bassiana* CG425 produced Pr1 and Pr2 in minimal medium containing ground *R. schistocercoides* whole body cuticle, however, in medium containing nitrate as sole nitrogen source, lower activities occurred (Table 1). The enhancing effect of cuticle on Pr1 and Pr2 production suggests that these proteases-types may be specifically induced by a cuticular component (s). Similarly, proteases produced by different strains of *B. bassiana* were maximally expressed during growth on wax moth (*Galleria mellonella*) cuticle (Gupta et al., 1992). According St. Leger et al. (1988) for *Metarhizium anisopliae*, limitation of carbon and nitrogen sources in culture supplemented with acridid cuticle derepressed protease production. Since all proteins contain carbon and nitrogen this finding is consistent with the idea that a major function of the extracellular proteases is to make nutrients available from the cuticle. However, Pr1-like proteases are also produced, albeit at lower levels, by carbon and nitrogen derepression alone indicating a substantial basal level of Pr1 (Table 1). Similar results were found for *Metarhizium anisopliae* (St. Leger et al., 1992).

Both proteases activities (Pr1 and Pr2), in *R. schistocercoides* cuticle-containing medium, were detected after 24 h of growth suggesting that these proteases types were not coordinately expressed in this fungus. Different data were observed when desert locust cuticle (*Schistocerca gregaria*) was used as growth substrate for *Metarhizium* strains (Gillespie et al.,

1998). These authors found that Pr2 produced by this fungus, in the presence of *S. gregaria*, appeared in culture 24 h before Pr1, suggesting its role in the induction or activation of Pr1.

The effects of different carbon sources on protease secretion by *B. bassiana* were tested in medium supplemented with glucose, grasshopper cuticle and amino acids individually or in combination. As shown in Table 2, *B. bassiana* produced proteases (Pr1 and Pr2) in all media tested; however, the amount of secreted proteases varied. The highest levels of both proteases-types were found in culture supernatants from grasshopper cuticle. None of the amino acids tested repressed enzyme secretion. In contrast, Campos et al. (2005) verified that in *B. bassiana*, alanine addition to the culture medium supplemented with tick (*Boophilus microplus*) cuticle repressed subtilisin secretion.

Some amino acids (alanine, proline) which are abundant in (grasshopper) cuticular proteins (Bidochka and Khachatourians, 1992) were tested in restricted cultures for their ability to induce Pr1 and Pr2. Except in medium supplemented with methionine, where high level of Pr1 was observed, the remaining amino acids tested did not induce the protease to the levels seen with cuticle (Table 2).

The possible role of methionine on Pr1 secretion by *B. bassiana*, was tested by culturing the fungus in culture medium containing different concentrations of this amino acid (0.25%, 0.5% and 0.75%) as only carbon source. As shown in Fig. 1, the lowest concentration tested resulted in a significantly lower Pr1 activity ( $p < 0.05$ ) compared to that seen with cuticle. Moreover, in medium supplemented with grasshopper cuticle, the addition of methionine at concentration of 0.75% (highest concentration tested) repressed protease secretion (Fig. 1). These data may reflect the possible role of methionine on Pr1 secretion by *B. bassiana*, since both induction and repression seems to be dependent on the concentration of the amino acid present in the culture medium. Recently, Scully and Bidochka (2006) using a mutant of

*Aspergillus flavus* with auxotrophic requirement for methionine showed the role of nutrition in evolving host-pathogen relationships.

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 grasshopper during the infection process. However, the secretion machinery of this fungus is still to be studied for biological control purposes.

### **Acknowledgments**

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

### **References**

- Andersen, S.O. 1980. Cuticular sclerotization. *In* Cuticle Techniques in Arthropods. Edited by T.A. Miller. Springer-Verlag, New York. pp. 185-217.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J., Roberts, D.W. 1997. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: An overview. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 171, 213-224.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1988a. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* 13, 161-168.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1988b. N-acetyl-D-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Env. Microbiol.* 54, 2699-2704.

- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 56, 362-370.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 165-173
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. 1994. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 7-13.
- Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. 2001. Introduction - Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Oxon: CABI Publishing. pp. 1-8.
- Campos, R.A., Arruda, W., Boldo, J.T., Silva, M.V., Barros, N.M., Azevedo, J.L., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr. Microbiol.* 50, 257-261.
- Gillespie, J.P., Bateman, R., Charnley, A.K. 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 128-137.
- Goettel, M.S., St. Leger, R.J., Rizzo, N.W., Staples, R.C. and Roberts, D.W. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* during penetration of host cuticle. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2223-2239.
- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N., Ignoffo, C.M. 1992. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* 16, 132-137.

- Joshi, L., St. Leger, R.J., Bidochka, M.J. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiol. Lett. 125, 211-218.
- Magalhães, B.P., Faria, M., Tigano, M.S., Sobral, B.W.S. 1997. Characterization and virulence of a Brazilian isolate of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes). Mem. Entomol. Soc. Can. 171, 313-321.
- Moreira, M.A.B., Magalhães, B.P., Valadares, M.C.C., Chagas, M.C.M. 1996. Occurrence of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera:Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brazil. An. Soc.Entomol Bras. 25, 359-361.
- St. Leger, R.J. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. Can. J. Bot. 73, 1119-1125.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. J. Invertebr. Pathol. 48, 85-95.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Arch. Biochem. Biophys. 253, 221-232.
- St. Leger, R. J., Durrands, P. K., Charnley, A. K., Cooper, R. M. 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. J. Invertebr. Pathol. 52, 285-293.
- St. Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W., Staples, R.C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Eur. J. Biochem. 204, 991-1001.
- St Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W., Roberts, D.W. 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by



- Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1257-1264.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Roberts, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 709-713.
- Scully, L.S., Bidochka, M.J. 2006. A cysteine/methionine auxotroph of the opportunistic fungus *Aspergillus flavus* is associated with host-range restriction: a model for emerging diseases. Microbiology 152, 223-232.
- Urtz, B.E., Rice W.C. 2000. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. Mycol. Res. 104, 180-186.

**Table 1** Subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activities in culture supernatants from *Beauveria bassiana* CG425. Values are the means of three replicates.

Incubation (h)	MM <sup>a</sup>		MMI <sup>b</sup>	
	Pr1*	Pr2	Pr1	Pr2
0	0	0	0	0
24	0.661±0.186	0	7.706±1.083	6.505±3.781
48	3.184±1.771	1.677±0.904	19.077±1.369	11.679±2.500
72	5.143±1.630	0	19.899±1.885	11.036±1.766
96	12.843±4.248	1.398±0.225	18.740±1.966	12.564±1.157

The results are means of three independent experiments, with two replicates for each enzymatic assay. \*Activities expressed as nmol nitroanilide ml<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; mean presented plus or minus the standard error.

<sup>a</sup> MM – minimal medium

<sup>b</sup> MMI - MM without nitrate and glucose plus *R. schistocercoides* cuticle (0.5%).

**Table 2** Effect of carbon sources and amino acids on secretion of subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) proteases from *Beauveria bassiana* CG425

Substrate	Pr1*	Pr2*
Glucose (1%)	5.883 <sup>b</sup>	10.456 <sup>bcde</sup>
D-alanine (0.5%)	5.577 <sup>b</sup>	5.092 <sup>a</sup>
L-alanine (0.5%)	2.152 <sup>a</sup>	5.187 <sup>a</sup>
Proline (0.5%)	2.331 <sup>a</sup>	8.612 <sup>bc</sup>
Glicine (0.5%)	2.458 <sup>a</sup>	8.465 <sup>b</sup>
Methionine (0.5%)	15.526 <sup>c</sup>	9.118 <sup>bcd</sup>
Cuticle (0.5%)	15.441 <sup>c</sup>	12.648 <sup>e</sup>
Cuticle (0.5%) + D-alanine (0.5%)	15.199 <sup>c</sup>	11.331 <sup>cde</sup>
Cuticle (0.5%) + L-alanine (0.5%)	16.284 <sup>c</sup>	12.701 <sup>e</sup>
Cuticle (0.5%) + proline (0.5%)	15.831 <sup>c</sup>	11.763 <sup>de</sup>
Cuticle (0.5%) + glicine (0.5%)	15.599 <sup>c</sup>	13.038 <sup>e</sup>
Cuticle (0.5%) + methionine (0.5%)	15.494 <sup>c</sup>	12.174 <sup>e</sup>

The results are means of three independent experiments, with two replicates for each enzymatic assay. Means followed by the same superscript letter in each column are not significantly different according to Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 1** Subtilisin-like (Pr1) activity in culture supernatants from *Beauveria bassiana* CG425 grown in presence of methionine at different concentrations. The results are means of three independent experiments, with two replicates for each enzymatic assay. The asterisk represents significant differences according to the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

