

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES pH E CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO CUTICULAR E NÃO-CUTICULAR NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ISOLADOS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

P.M.O. Costa, P.V. Tiago, T.L. Nascimento

Universidade do Estado de Mato Grosso, Departamento de Ciências Biológicas, Rod. MT 358, km 7, CEP 78300-000, Tangará da Serra, MT, Brasil. E-mail: phelipeoller@yahoo.com.br

RESUMO

A produção de proteases por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin é considerada um importante fator de virulência, pois são fundamentais no processo de penetração através da cutícula do inseto. O objetivo do trabalho foi verificar a influência de diferentes pH e concentrações dos substratos caseína e cutícula de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) na atividade proteolítica de isolados de *M. anisopliae*. Foi utilizado meio mínimo (MM) sólido, exceto fonte de carbono, acrescido de caseína e cutícula de *M. fimbriolata*, ambos nas concentrações de 1%, 2%, 3% e 4%. Para verificar a influência do pH na atividade proteolítica e possível mudança de pH no meio, os meios citados acima foram preparados na concentração em que foi observada a maior atividade proteolítica, com pH inicial 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e contendo indicador de pH. A atividade enzimática foi determinada através do índice de relação enzimática (IRE). Foi observado que os isolados de *M. anisopliae* apresentaram concentrações ótimas distintas para cada substrato, sendo 1% para a caseína e 2% para a cutícula de *M. fimbriolata*. Quanto ao pH, foram verificadas maiores atividades proteolíticas em caseína nos pH 8 e 9 e em cutícula de *M. fimbriolata* nos pH 6, 7 e 8. Foi verificado, a partir do quinto dia de crescimento dos isolados, uma mudança de coloração no meio caseína 1% de pH inicial 6 e 7 para um pH final 8. Portanto, a concentração dos substratos estudados e o pH do meio influenciaram na atividade proteolítica.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, fungo, proteases.

ABSTRACT

INFLUENCE OF DIFFERENT pH LEVELS AND CONCENTRATIONS OF CUTICULAR AND NONCUTICULAR SUBSTRATES ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *METARHIZIUM ANISOPLIAE* ISOLATES. Proteases produced by *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin are considered an important virulence factor, because they are fundamental in the process of penetration through the insect cuticle. The purpose of the present study was to verify the influence of different pH levels and concentrations of the substrates casein and cuticle of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) on the proteolytic activity of isolates of *M. anisopliae*. Casein and cuticle from adult *M. fimbriolata*, both in the concentrations of 1%, 2%, 3% and 4%, were added in minimum medium (MM) solid, without a carbon source. To verify pH influence on the proteolytic activity and possible pH change in the media, the media cited above were made with a pH indicator in the concentration that best influenced the proteolytic activity, with pH 5, 6, 7, 8, 9 and 10. The enzymatic activity was determined from the enzyme relation index (ERI). Isolates of *M. anisopliae* presented distinct optimum concentrations for each substrate, being 1% for casein and 2% for cuticle from *Mahanarva fimbriolata*. Regarding pH, it was verified that there was greater proteolytic activity in casein with pH 8 and 9 and cuticle from *Mahanarva fimbriolata* with pH 6, 7 and 8. Beginning at the 5th growth day of the isolates there occurred a pH color change in the medium casein 1% with pH initial 6 and 7 to pH 8. Therefore, the concentration of the substrates studied and the pH of the media had an influence on the proteolytic activity.

KEY WORDS: Biological control, fungus, proteases.

O Brasil destaca-se como o maior produtor e exportador de cana-de-açúcar, representando 33% da produção mundial, seguido por Índia (22,8%) e China (6,8%) (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Diversas pragas podem afetar a produtividade da cana-de-açúcar;

dentre elas destaca-se *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae), a cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar.

O controle biológico com macro ou micro-organismos é um dos principais componentes do manejo

integrado de cigarrinhas e a aplicação do fungo *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin é uma forma viável de controle de *M. fimbriolata* (ALVES; ALMEIDA, 1997). *M. anisopliae* é um patógeno altamente especializado na penetração via tegumento, o que representa uma grande vantagem dos fungos quando são comparados aos vírus e as bactérias que penetram no hospedeiro somente por via oral (ALVES, 1998a). A fase de penetração envolve um processo físico, em que há pressão mecânica da hifa terminal, e um químico referente à produção de enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases e quitinases (ST. LEGER *et al.*, 1988; ALVES, 1998b).

A produção de proteases é considerada um importante fator de virulência, pois além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos esporos, são as primeiras enzimas a atuarem na cutícula do inseto por meio da hidrólise das proteínas, o que possibilita a ação de outras enzimas, como as quitinases (BIDOCHKA *et al.*, 1997; ALVES, 1998b). As proteases também têm função nutricional, uma vez que convertem o tecido do inseto em nutrientes (ROBERTS *et al.*, 1992; ALVES, 1998b).

Muitos fatores podem influenciar a atividade proteolítica do fungo, como a composição, a concentração do substrato e o pH do meio. TIAGO; SILVA (2007) e COSTA *et al.* (2006) verificaram a influência dos substratos cuticular e não-cuticular na atividade proteolítica de isolados de *M. anisopliae*. O pH, é considerado um importante sinal que controla a expressão de proteases em *M. anisopliae* (ST. LEGER *et al.*, 1998; ST. LEGER *et al.*, 1999).

O estudo de algumas características fisiológicas de *M. anisopliae*, como a atividade proteolítica, pode ser utilizado como subsídio para a caracterização de isolados potenciais para o controle biológico e também pode contribuir para o melhor entendimento de aspectos básicos da biologia do fungo (ALVES, 1998b; FRANCESCHINI *et al.*, 2001). O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de diferentes concentrações dos substratos caseína e cutícula de *M. fimbriolata* e do pH na atividade proteolítica de isolados de *M. anisopliae*.

Foram utilizados os isolados URM5946 (= UNEMAT 06) e URM6113 de *M. anisopliae*, obtidos a partir de *M. fimbriolata*, coletadas no Município de Tangará da Serra, MT. Esses isolados foram depositados na Micoteca - URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Inicialmente, os fungos foram inoculados em batata dextrose ágar (BDA) e mantidos em câmara climatizada do tipo BOD, a 26° C, fotofase de 12 horas, por um período de 10 dias. Com o auxílio de uma câmara de Neubauer, foi obtida uma suspensão de conídios de 1×10^8 con./mL, sendo 0,01 mL dessa suspensão inoculada em um disco de papel filtro

estéril (6 mm), este, posteriormente, foi transferido para o meio mínimo (MM) sólido sem glicose, acrescido de cutícula de *M. fimbriolata* e de caseína, nas concentrações finais de 1%, 2%, 3% e 4% (p/v). As placas foram incubadas em câmara climatizada do tipo BOD, a 26° C, fotofase de 12 horas, por 10 dias. As soluções de caseína e cutícula de *M. fimbriolata* foram preparadas conforme metodologia descrita por TIAGO; SILVA (2007).

A atividade enzimática foi determinada por meio do Índice de Relação Enzimática (I.R.D) = D/d , onde D = diâmetro total (colônia + halo) e d = diâmetro da colônia (TIAGO; SILVA, 2007).

Em seguida, foram preparados os meios, acrescidos de cutícula e de caseína, na concentração que melhor influenciou a atividade proteolítica dos isolados, ajustando o pH para 5, 6, 7, 8, 9 e 10. O MM foi acrescido do indicador de pH Azul de Bromotimol (pH 5, 6, 7 e 8) e do indicador O-cresoltaleína (pH 8, 9 e 10). A alteração do pH do meio foi verificada por mudança de cor, do amarelo ao azul (faixa de 6 a 8), quando o meio foi acrescido do indicador de pH Azul de Bromotimol, e de incolor ao vermelho violeta (faixa de 8,2 a 9,8), quando o meio foi acrescido do indicador O-cresoltaleína. A atividade enzimática foi determinada através do índice de relação enzimática.

Para a determinação da atividade proteolítica em diferentes concentrações dos substratos caseína e cutícula de *M. fimbriolata*, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×4 (dois isolados e quatro concentrações), com 9 repetições. Para a determinação da atividade proteolítica em diferentes faixas de pH, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×6 (dois isolados e seis marcações de pH), com 5 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizado o software Assistat 7.4 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2006).

Os isolados URM5946 e URM6113 de *M. anisopliae* apresentaram diferenças na atividade proteolítica em caseína 1% e 3%, sendo que em 1%, a melhor concentração do substrato para ambos os isolados, o isolado URM5946 apresentou maior IRE ($1,61 \pm 0,152$) (Tabela 1). Essa diferença é devida à variabilidade genética encontrada entre os isolados de *M. anisopliae*, constatada também por BRAGA *et al.* (1999) e PINTO *et al.* (2002), em ensaios enzimáticos realizados após cultivo em meio líquido contendo caseína como única fonte de nitrogênio.

Diferenças entre os isolados URM5946 e URM6113 foram observadas em cutícula de *M. fimbriolata* 2%, destacando-se o isolado URM5946, que apresentou maior IRE ($1,26 \pm 0,067$) em cutícula 2%, enquanto o isolado URM6113 apresentou maiores valores de IRE

nas concentrações 2% ($1,18 \pm 0,071$) e 3% ($1,13 \pm 0,041$) (Tabela 2). Não foi observado halo de degradação do substrato (IRE = 1) para ambos os isolados em cutícula na concentração de 1%. TIAGO; SILVA (2007) observaram que as cutículas das cigarrinhas *Deois flavopicta* e *M. fimbriolata* 1% não demonstraram ser um substrato adequado para detecção de atividade proteolítica. Posteriormente, COSTA *et al.* (2006), verificaram atividade proteolítica de isolados de *M. anisopliae* ao utilizar a cutícula de *M. fimbriolata* a 2%.

Foi verificado que os isolados URM5946 e URM6113 apresentaram concentrações ótimas distintas para cada substrato, sendo 1% para a caseína e 2% para a cutícula de *M. fimbriolata*. A composição do meio de cultura influencia a atividade proteolítica de *M. anisopliae* e a regulação gênica da síntese de proteases depende das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio e da presença de proteínas indutoras do meio (ST. LEGER *et al.*, 1988; PATERSON *et al.*, 1994a; 1994b; MORAES *et al.*, 2003).

Foram observadas diferenças entre os isolados estudados, quanto ao IRE, em caseína com pH inicial 8, 9 e 10. O isolado URM6113 apresentou

maior IRE ($2,72 \pm 0,569$; $3,60 \pm 0,586$ e $2,27 \pm 0,133$) nas respectivas marcações de pH (Tabela 3). O isolado URM5946 apresentou os maiores valores de IRE ($2,20 \pm 0,419$ e $2,68 \pm 0,170$) em caseína, com pH inicial 8 e 9, enquanto o isolado URM6113 apresentou maior IRE ($3,60 \pm 0,586$) em caseína pH 9 (Tabela 3).

Os isolados diferiram, quanto ao IRE, em cutícula de *M. fimbriolata*, nos pHs 6 e 7, destacando-se o isolado URM5946 (Tabela 04), que apresentou maior IRE ($1,71 \pm 0,124$) em cutícula pH 7. O isolado URM6113 apresentou os maiores valores de IRE nos pHs 6, 7 e 8 ($1,33 \pm 0,060$; $1,45 \pm 0,096$ e $1,31 \pm 0,171$). Não foi observado crescimento (IRE = 0) para ambos os isolados de *M. anisopliae* em caseína pH 5 e em cutícula pH 9 e 10 (Tabelas 3 e 4), visto que mudanças extremas de pH podem causar modificações na estrutura do substrato. Os dados obtidos indicam que a atividade proteolítica extracelular é somente produzida no pH em que elas são ativas, corroborando com os dados de ST. LEGER *et al.* (1998), em que as proteases produzidas por *M. anisopliae* foram mais efetivas em pH neutro ou alcalino, sendo o pH 8 considerado ótimo.

Tabela 1 - Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações do substrato caseína¹.

Isolados	Concentração de caseína			
	1%	2%	3%	4%
URM5946	$1,61 \pm 0,152$ aA	$1,26 \pm 0,057$ aB	$1,07 \pm 0,012$ bC	$1,05 \pm 0,015$ aC
URM6113	$1,46 \pm 0,036$ bA	$1,26 \pm 0,055$ aB	$1,19 \pm 0,029$ aB	$1,07 \pm 0,037$ aC

¹As médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações do substrato cutícula de *Mahanarva fimbriolata*¹.

Isolados	Concentração de cutícula de <i>M. fimbriolata</i>			
	1%	2%	3%	4%
URM5946	$1,00 \pm 0,000$ aD	$1,26 \pm 0,067$ aA	$1,17 \pm 0,071$ aB	$1,10 \pm 0,058$ aC
URM6113	$1,00 \pm 0,000$ aC	$1,18 \pm 0,071$ bA	$1,13 \pm 0,041$ aAB	$1,10 \pm 0,043$ aB

¹As médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* em diferentes marcações de pH no substrato caseína¹.

Isolados	Marcações de pH					
	5	6	7	8	9	10
URM5946	$0,00 \pm 0,000$ aD	$1,40 \pm 0,178$ aC	$1,51 \pm 0,070$ aC	$2,20 \pm 0,419$ bAB	$2,68 \pm 0,170$ bA	$1,75 \pm 0,079$ bBC
URM6113	$0,00 \pm 0,000$ aD	$1,48 \pm 0,093$ aC	$1,61 \pm 0,080$ aC	$2,72 \pm 0,569$ aB	$3,60 \pm 0,586$ aA	$2,27 \pm 0,133$ aB

¹As médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* em diferentes marcações de pH no substrato cutícula de *Mahanarva fimbriolata*¹.

Isolados	Marcações de pH					
	5	6	7	8	9	10
URM5946	1,34 ± 0,093 aB	1,46 ± 0,086 aB	1,71 ± 0,124 aA	1,42 ± 0,129 aB	0,00 ± 0,000 aC	0,00 ± 0,000 aC
URM6113	1,24 ± 0,064 aB	1,33 ± 0,060 bAB	1,45 ± 0,096 bA	1,31 ± 0,171 aAB	0,00 ± 0,000 aC	0,00 ± 0,000 aC

¹As médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi verificado, a partir do quinto dia de crescimento dos isolados, uma mudança de coloração em caseína 1%, com pH inicial 6 (amarelo) e 7 (verde), para um pH final 8 (azul). Essa mudança de coloração não foi observada em caseína 1%, com pH 8, 9 e 10 e, como descrito anteriormente, os maiores valores de IRE foram obtidos nestas marcações. Os isolados de *M. anisopliae* estudados alteraram o pH do meio para uma condição alcalina, o que pode ter facilitado a utilização das fontes de nutrientes dos substratos. Em seu trabalho, FRANCESCHINI *et al.* (2001) verificaram que *M. anisopliae* alcalinizou o meio contendo o substrato azocaseína e que o pH ótimo para as proteases secretadas ficou na faixa de 8. Essa alcalinização do meio ocorreu devido à produção de amônia, que teria função relacionada à regulação do microambiente, e seria considerado um fator de virulência (ST. LEGER *et al.*, 1998; ST. LEGER *et al.*, 1999).

Em cutícula de *M. fimbriolata* não foi observada mudança de coloração nas marcações de pH estudadas. Porém, ST. LEGER *et al.* (1998) observaram um aumento do pH de 6.3 para 7.7, após o crescimento de *M. anisopliae* em cultura líquida, contendo cutícula de *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae).

Foi verificado que a concentração dos substratos caseína e cutícula de *M. fimbriolata* e o pH desses meios de cultura influenciaram a atividade proteolítica dos isolados de *M. anisopliae*, visto que foram observados maiores valores de IRE após a otimização dessas condições de cultivo. A otimização desses fatores poderá contribuir em estudos que visem à caracterização e à seleção de isolados de *M. anisopliae* com maior capacidade de degradar esses substratos, uma vez que pode existir uma correlação entre a produção de enzimas e eficiência no controle biológico de um determinado inseto.

AGRADECIMENTOS

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

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

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____ (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998b. p.289-381.

ALVES, S.B., ALMEIDA, J.E.M. Controle biológico das pragas das pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMA DE PASTAGENS. Jaboticabal, SP. *Anais. Jaboticabal: UNESP*, 1997. p.318-341.

BIDOCHKA, M.J.; ST. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, v.171, p.213-224, 1997.

BRAGA, G.U.L.; DESTÉFANO, R.H.R.; MESSIAS, C.L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Revista de Microbiologia*, v.30, p. 107-113, 1999.

COSTA, P.M.O.; TIAGO, P.V.; SOUZA, H.M.L.; NASCIMENTO, T.L. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticular e não cuticulares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGRO-ECOLOGIA, 4., 2006, Belo Horizonte, MG. *Anais. Belo Horizonte: 2006*. 1 CD ROM.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A.P.; BARATTO, C.M.; KOGLER, V.; SILVA, M.V.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A.. Biotecnologia aplicada ao controle biológico: o entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.4, p. 32-37, 2001.

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

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.
- ROBERTS, D.W.; GUPTA, S; ST. LEGER, R.J. Metabolite Production by Entomopathogenic Fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, p. 325-347, 1992.
- SANT'ANNA, A.; FERRAZ, J.V.; SILVA, M.L.M. (Coord.). *Agriannual 2009: Anuário da Agricultura Brasileira*. São Paulo: iFNP, 2009. 497p.
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. A new version in the Assistat Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando, Florida, USA. *Annals*. Orlando: 2006. p.393-396.
- ST. LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology*, v.150, p.413-416, 1988.
- 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.
- ST. LEGER, R.J.; NELSON, J.O.; SCREEN, S.E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology*, v.145, p.2691-2699, 1999.
- TIAGO, P.V.; SILVA, R.J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não cuticulares. *Ciência Rural*, v.37, p. 26-30, 2007.

Recebido em 6/4/10
Aceito em 29/4/11