



Biological

Sciences

Foudantions

Patrícia Michele da Luz
(Organizadora)

 **Atena**
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Karine de Lima

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
B615	Biological sciences foudantions [recurso eletrônico] / Organizadora Patrícia Michele da Luz. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-173-2 DOI 10.22533/at.ed.732191303 1. Ciências biológicas. 2. Biologia – Pesquisa – Brasil. I. Luz, Patrícia Michele da. CDD 574
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

Patrícia Michele da Luz

(Organizadora)

Biological Sciences Foudantions

Atena Editora

2019

APRESENTAÇÃO

A presente obra, que se oferece ao leitor, nomeada como “ Biological Sciences Foudantions ” de publicação da Atena Editora, aborda 11 capítulos envolvendo estudos biológicos de Norte a Sul do Brasil. Possuindo temas com vasta importância para compreendermos a importância do conhecimento interferindo na nossa vida.

Alguns estudos abrangem pesquisas realizadas com auxílio de geotecnologia, melhoramento genético e estudos citogenéticos, atividades enzimáticas, com diferentes classes de animais e plantas, relatando os distintos problemas distintos de saúde pública com visão de minimizar os efeitos causados por doenças transmitidas por insetos. Temos também pesquisas com áreas de qualidade de água subterrânea; ensino de microbiologia por jogos pedagógicos e sobre perfil epidemiológico de infecções para os pacientes oncológicos.

Apesar dos avanços tecnológicos e as atividades decorrentes, ainda temos problemas recorrentes que afetam nossa vida, causadores de riscos visíveis e invisíveis à saúde de todos dos humanos. Diante disso, lembramos a importância de discutir questões sobre a saúde pública da população, para aumentar a qualidade de vida.

Agradecemos sinceramente aos autores dos diversos capítulos, pela dedicação e esforços sem limites, que viabilizaram esta obra que retrata os recentes avanços científicos e todos os Organizadores da Atena Editora.

Por fim, esperamos que esta obra possa colaborar e instigar mais estudantes e pesquisadores na constante busca de novas pesquisas e assim, garantir a um melhor ambiente para futuras gerações, minimizando os efeitos de doenças.

Patrícia Michele da Luz

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE ESPACIAL DA PAISAGEM E A INCIDÊNCIA DA COCHONILHA-DO-CARMIM (<i>DACTYLOPIUS OPUNTIAE</i>) EM PALMA FORRAGEIRA NO ESTADO DE ALAGOAS	
Jackson Pinto Silva Claudio José dos Santos Junior Melchior Carlos do Nascimento Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrisoli	
DOI 10.22533/at.ed.7321913031	
CAPÍTULO 2	11
ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DE UM ISOLADO DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> (BALS.) VUILLEMIN <i>IN VITRO</i>	
Gabryel Cezar da Silva Marinho Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.7321913032	
CAPÍTULO 3	24
CARACTERIZAÇÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS RADICULARES DE <i>Allium Cepa L.</i> DO BULBO GRANDE	
Vitória Réggia Ferreira Lopes Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.7321913033	
CAPÍTULO 4	37
CONTROLE BIOLÓGICO E MONITORAMENTO DO MOSQUITO <i>Aedes</i> NO CAMPO	
Adriano Rodrigues de Paula Anderson Ribeiro Leila Eid Imad Silva Eduardo Rodrigues de Paula Richard Ian Samuels	
DOI 10.22533/at.ed.7321913034	
CAPÍTULO 5	46
DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DE BORRACHUDOS (DIPTERA: SIMULIIDAE) DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL: INVENTÁRIO FAUNÍSTICO DA MESORREGIÃO NOROESTE RIO-GRANDENSE	
Sirlei Maria Hentges Tieli Cláudia Menzel Milton Norberto Strieder	
DOI 10.22533/at.ed.7321913035	
CAPÍTULO 6	53
IDENTIFICAÇÃO DE <i>Cryptococcus Sp.</i> EM EXCRETAS DE POMBOS – REGIÃO CENTRAL DE SÃO PAULO	
Karen Dias Costa Jorge Luís Freire Pinto Alípio Carmo Rildo Yamaguty Lima Marília Patrão Sandra Nunes Messias	

Fernando Luis Affonso Fonseca
Flávia de Sousa Gehrke
DOI 10.22533/at.ed.7321913036

CAPÍTULO 7 61

O USO DE JOGOS PEDAGÓGICOS NO ENSINO DE MICROBIOLOGIA

Márcia Regina Terra
Rafaela Sterza da Silva
Elisa Barbosa Leite da Freiria Estevão
Dayanna Saeko Martins Matias da Silva
Fernanda Gianelli Quintana
Ednalva de Oliveira Miranda Guizi

DOI 10.22533/at.ed.7321913037

CAPÍTULO 8 75

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM SAÚDE EM PACIENTES ONCOLÓGICOS

Bruno Oliveira de Veras
Katharina Marques Diniz
Fernanda Granja da Silva Oliveira
Maria Betânia Melo de Oliveira
Alexandre Gomes da Silva
Márcia Vanusa da Silva

DOI 10.22533/at.ed.7321913038

CAPÍTULO 9 83

PERSISTÊNCIA DE BLASTOSPOROS DE *Metarhizium Anisopliae* VISANDO O CONTROLE DE LARVAS DO MOSQUITO *Aedes Aegypti*

Simone Azevedo Gomes
Aline Teixeira Carolino
Josiane Pessanha Ribeiro
Thais Berçot Pontes Teodoro
Richard Ian Samuels

DOI 10.22533/at.ed.7321913039

CAPÍTULO 10 89

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS DA CIDADE DE CAMPOS DO JORDÃO – SP

Daniela Rodrigues Norberto
Alexandre Magno Batista Machado

DOI 10.22533/at.ed.73219130310

CAPÍTULO 11 93

SCREENING OF L-ASPARAGINASE THE SALT-TOLERANT AND THERMOSTABLE MARINE *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN SR61

Bruno Oliveira de Veras
Yago Queiroz dos Santos
Anderson Felipe Jácome de França
Penha Patricia Cabral Ribeiro
Elaine Costa Almeida Barbosa
Krystyna Gorlach-Lira

DOI 10.22533/at.ed.73219130311

SOBRE A ORGANIZADORA..... 101

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DE UM ISOLADO DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN IN VITRO

Gabryel Cezar da Silva Marinho

Graduando em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba - UFPB/João Pessoa/PB

Adna Cristina Barbosa de Sousa

Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba - UFPB/João Pessoa/PB

RESUMO: *Beauveria bassiana* é utilizado no controle biológico de insetos-praga na agricultura. Estudos comportamentais como germinação, esporulação, crescimento e atividade enzimática são parâmetros importantes para auxiliar na caracterização e virulência. Portanto, o nosso objetivo foi avaliar a atividade proteolítica e caracterizar, do ponto de vista citomorfológico, um isolado de *B. bassiana*, visando à seleção para uso no controle biológico de insetos-praga. Para análise macro e microscópica, foi utilizado o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose. A análise citológica foi realizada através de cultura em lamínula, no período de 48 a 120 horas. A atividade enzimática foi determinada a partir do índice enzimático (IE) em meio ágar-leite. Macroscopicamente, a colônia apresentou micélio aéreo branco e uma pigmentação creme no verso. O crescimento radial foi rápido e ao oitavo dia, o fungo cobriu toda a superfície do meio de cultura,

apresentando um diâmetro de 6,9 cm. As observações microscópicas revelaram que as estruturas se formaram a partir da germinação dos conídios, originando um micélio hialino, septado, anastomoses, numerosos conidióforos formando densos cachos de conídios globosos e subglobosos. A atividade proteolítica foi constatada pela formação do halo transparente ao redor da colônia (1,1 cm), onde a caseína do leite foi degradada, comprovando que a caseína do leite é uma fonte indutora das proteases. O IE foi fortemente positiva (0,81). *B. bassiana* apresentou bom desenvolvimento e resposta aos experimentos realizados *in vitro*, apontando este isolado como um possível agente entomopatogênico a ser explorado para minimizar os danos ecotóxicos na produção animal e vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, fungo entomopatogênico, fungo filamentoso, proteases.

ABSTRACT: *Beauveria bassiana* is used in the biological control of insect pests in agriculture. Behavioral studies such as germination, sporulation, growth and enzymatic activity are important parameters to aid characterization and virulence. Therefore, our objective was to evaluate the proteolytic activity and to characterize, from the cytomorphological point of view, a *B. bassiana* isolate, aiming at the selection

for use in the biological control of pest insects. For macro and microscopic analysis, the agar-Sabouraud-dextrose medium was used. Cytological analysis was performed through a cover slip culture, in the period of 48 to 120 hours. The enzymatic activity was determined from the enzymatic index (IE) in milk agar medium. Macroscopically, the colony showed white aerial mycelium and a cream pigmentation on the reverse side. Radial growth was rapid and on day 8, the fungus covered the entire surface of the culture medium, having a diameter of 6.9 cm. Microscopic observations revealed that the structures formed from the germination of the conidia, originating a hyaline mycelium, septate, anastomoses, numerous conidiophores forming dense clusters of globose and subglobose conidia. Proteolytic activity was evidenced by the formation of the transparent halo around the colony (1.1 cm), where milk casein was degraded, proving that milk casein is a protease inducing source. IE was strongly positive (0.81). *B. bassiana* showed good development and response to the experiments performed *in vitro*, pointing this isolate as a possible entomopathogenic agent to be explored to minimize the ecotoxic damages in animal and vegetal production.

KEYWORDS: Biological control, entomopathogenic fungus, filamentous fungus, proteases.

1 | INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin é um importante agente microbiano utilizado no controle biológico de insetos-praga. O controle biológico pode ser aplicado pela proteção ou manutenção do desenvolvimento de um antagonista natural ou através da introdução de um competidor, patógeno ou predador exógeno (GRONVOLD et al., 1996). A aplicação de um organismo exógeno em um meio ambiente a fim de controlar uma praga constitui-se no emprego do controle biológico clássico. Porém, é de fundamental importância controlar a adaptação e o sucesso deste agente exógeno no ambiente de aplicação, para que haja o controle da praga alvo de maneira harmoniosa e sem impactar outras espécies nativas (HOWARTH, 1996).

Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os micro-organismos, devido à facilidade de manuseio e aplicação, o custo, ao fácil conhecimento de produção, além da eficiência já pronunciada por algumas espécies. Entre os micro-organismos utilizados para este propósito, destacam-se os fungos filamentosos, pois estes não necessitam ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo alvo. Eles desenvolvem-se de forma ativa sobre o tegumento de seu hospedeiro (ALVES, 1998b).

Entre os primeiros fungos entomopatogênicos utilizados no controle microbiano de insetos-praga, destacam-se os gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH; PELL, 2003). Os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de

80 % das doenças causadas em insetos. Existindo cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos patogênicos de invertebrados já descritos. Apesar disso, a maioria dos trabalhos refere-se apenas a duas espécies de fungos: *B. bassiana* e *M. anisopliae* (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

B. bassiana é considerado um deuteromiceto (fungo imperfeito), no qual não se observa fase sexuada. Fungos que se reproduzem de forma assexuada são geralmente menos diversos que os micro-organismos que possuem reprodução sexual, devido à ausência de recombinação genética (BURDON, 1993). Apesar de se reproduzir por via assexual, *B. bassiana* apresenta uma considerável variabilidade genética, devido a sua ubiquidade, ampla distribuição geográfica e especificidade a diversos hospedeiros. Esta diversidade pode conferir ao microrganismo uma plasticidade para se adaptar e sobreviver em ambientes heterogêneos. Estes fungos podem apresentar durante o seu ciclo biológico uma fase parasitária e outra não parasitária (ALVES, 1998a).

As espécies de *Beauveria* são facilmente distinguidas morfologicamente. Suas características principais são os grupos de células conidiogênicas curtas e globosas que produzem uma sucessão de conídios unicelulares a partir de uma raque alongada e em *zig-zag* (KIRK et al., 2001). A forma dos conídios pode variar de globoso, elipsóide, cilíndrico, reniforme e vermiforme e com uma grande variedade de tamanhos (REHNER, 2005).

Diversos autores têm relatado a eficácia da utilização de *B. bassiana* no controle de *Melolontha melolontha*, *Hypsipyla grandella*, *Plutella maculipennis* dentre outros, com resultados promissores no controle biológico. No Brasil, *B. bassiana* foi encontrado colonizando *Diatraea saccharalis*, *Anthonomus grandis*, *Dialrotica speciosa*, *Castnia liais*, *Solenopsis invicta*, *S. saevissima*, *Cosmopolites sordidus* e *Hypothenemus hampei*, entre outros (AZEVEDO, 1998; BITTENCOURT, 2000; FARIA; MAGALHÃES, 2001). Dessa forma, torna-se evidente o amplo espectro de ação destes fungos, os quais podem ser utilizados em vários grupos de insetos no controle integrado de diversas pragas (SCHAMNE, 2010).

O processo de infecção de *B. bassiana* em seus hospedeiros ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação. A infecção inicia-se pela adesão e germinação de conídios do fungo sobre a superfície do artrópode, seguida de penetração da hifa através da cutícula. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultante da ação de enzimas (esterases, proteases, lípases, e quitinases) que facilitam a penetração mecânica. Na germinação, o esporo diferencia-se em um tubo germinativo com uma dilatação na extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico. Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que mantêm o contato com a cutícula. Após atravessar a cutícula, *B. bassiana* encontra um ambiente rico em nutrientes, disseminando-se rapidamente através da hemolinfa por todos

os tecidos, produzindo toxinas como as dextruxinas e citocalasinas, que ocasionam paralisia e conseqüentemente, a morte do hospedeiro (KERSHAW et al., 1999).

Os sintomas observados após a infecção do hospedeiro incluem inquietação, perda da sensibilidade, perda de coordenação dos movimentos e paralisia, ocasionando a morte. O ciclo total da doença é de 8 a 10 dias. Os insetos infectados tornam-se duros e recobertos por uma camada pulverulenta de conídios. Ao final da conidiogênese, a colônia possui um aspecto cotonoso e uma massa de conídios brancos (ALVES, 1998b). A produção de conídios também é indispensável, pois sem os esporos não há inóculo e a produção de conídios após a infecção do inseto garante a manutenção do controle no campo (THOMAS; JENKINS, 1997).

Estudos comportamentais como germinação, esporulação, número de colônias, crescimento radial e atividade enzimática *in vitro* são realizados para auxiliar na caracterização de fungos entomopatogênicos (KUMAR et al., 1999; GUIMARÃES, 2002; ALMEIDA et al., 2005). Estes parâmetros são importantes para definir a virulência de uma linhagem fúngica (LIU et al., 2003). A viabilidade de formas infectivas, tanto quanto, a virulência merece ser destacada, considerando que a germinação dos conídios é a parte essencial na patogênese (SHAH; PELL, 2003).

De modo geral, *Beauveria* sp. exibem considerável variação morfológica natural, citológica e patogênica, dificultando a sua classificação e seleção para uso no controle biológico de insetos-praga. A avaliação e caracterização *in vitro* são ferramentas que oferecem subsídios para a compreensão da virulência do fungo sobre o inseto. Partindo dessas considerações, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade proteolítica em meio de cultura sintético e caracterizar, do ponto de vista citomorfológico um isolado de *B. bassiana*, visando a seleção para uso no controle biológico de insetos-praga.

2 | METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Multiusuários do Centro de Biotecnologia – CBiotec/UFPB.

Foi utilizado um isolado de *B. bassiana* coletado do solo de um sistema agroflorestral (zona da mata de Pernambuco), no ano de 2015.

2.1 Meios de cultura

Ágar-Sabouraud-Dextrose: 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 6,8.

Ágar-Leite: 50 g de leite molico desnatado, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 6,8. Todos os meios de cultura foram autoclavados por 15 min a 120 °C.

2.2 Manutenção da cultura fúngica

As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4 °C.

2.3 Crescimento radial

Fragmentos da cultura fúngica foram inoculados no centro da placa de *Petri* contendo o meio de cultura específico. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura ambiente. As observações foram feitas nos intervalos de 0-2, 2-4, 6-8, 8-10, 10-12 12-14, 14-15 dias. Mensurações com régua milimetrada foram feitas e empregadas para a construção de um gráfico para a observação do crescimento radial.

2.4 Cultura em lamínula

Fragmentos do fungo foram colocados estrategicamente sobre o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose, contidos em placas de *Petri* e coberto com uma lamínula previamente flambada. Após o crescimento, as lamínulas foram retiradas e colocadas invertidas sobre uma lâmina contendo o corante azul de metil e observada ao microscópio óptico.

2.5 Atividade enzimática

Inóculo do fungo foi colocado no centro da placa de *Petri* sobre o meio de cultura ágar-leite. Foi avaliada no período de 12 dias, a capacidade de degradação da caseína do leite em pó, única fonte de nitrogênio adicionada ao meio, para medir a atividade proteolítica de *B. bassiana*. A degradação foi avaliada macroscopicamente pela formação do halo transparente ao redor da colônia.

2.6 Determinação da atividade enzimática e do índice enzimático

Para a determinação do índice enzimático (IE), foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), em que a atividade da espécie avaliada decorre da razão entre o diâmetro da colônia ($\emptyset c$) e o diâmetro da colônia, acrescido da zona de precipitação do halo ($\emptyset h$). A partir do (IE) a atividade enzimática (Pz) poderá ser classificada como: A) negativa (IE = 1, Pz = classe 1); B) positiva ($0,64 = IE < 1$, Pz = classe 2); C) fortemente positiva (IE < 0,64, Pz = classe 3).

$$IE = \frac{\text{Diâmetro da colônia } (\varnothing c)}{\text{Diâmetro da colônia + Zona de precipitação do halo } (\varnothing h)}$$

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Análise macroscópica de *Beauveria bassiana*

O crescimento micelial de *B. bassiana* foi avaliado durante 15 dias no meio de cultura de ágar-Sabouraud-dextrose. A Figura 1 ilustra o aspecto macroscópico da colônia.

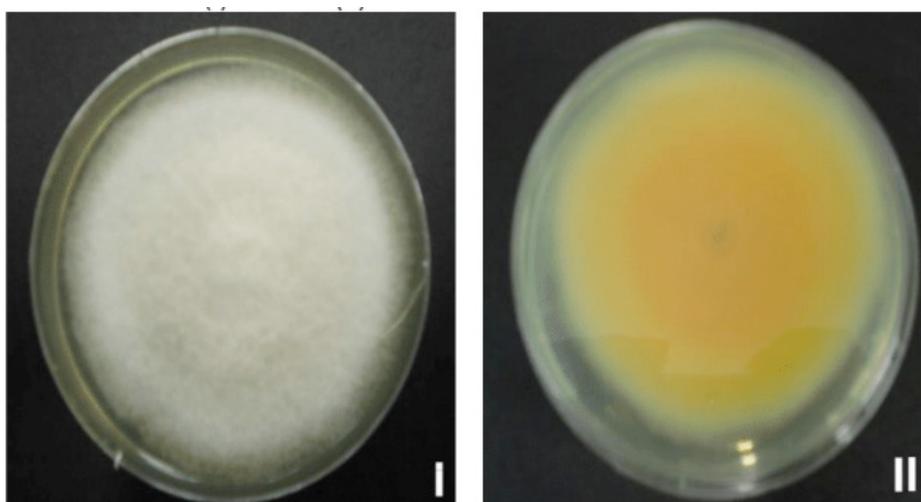


Figura 1 – Aspecto macroscópico da colônia de *Beauveria bassiana* em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose. Frente (I) e verso (II) da colônia.

Fonte: Autores

A colônia de *B. bassiana* em meio ágar-Sabouraud-dextrose apresentou micélio aéreo de aspecto algodinoso esbranquiçado e uma pigmentação creme clara no verso. O crescimento radial em meio ágar-Sabouraud-dextrose atingiu 6,9 cm (Tabela 1 e Figura 2). Estes resultados indicaram que o meio de cultura foi eficaz para induzir o crescimento e esporulação de *B. bassiana* em temperatura ambiente ($\pm 30^\circ \text{C}$), pois garantiram o suprimento nutricional necessário para o isolado, favorecendo o seu desenvolvimento *in vitro*.

Dias	Diâmetro da colônia
1 à 2	1,7 cm
2 à 4	3,8 cm
4 à 6	6,2 cm
6 à 8*	6,9 cm

*A partir do 8º dia a colônia tomou toda a placa de *Petri*.

Tabela 1 - Crescimento de *Beauveria bassiana* avaliada durante 15 dias em meio ágar-Sabouraud-dextrose.

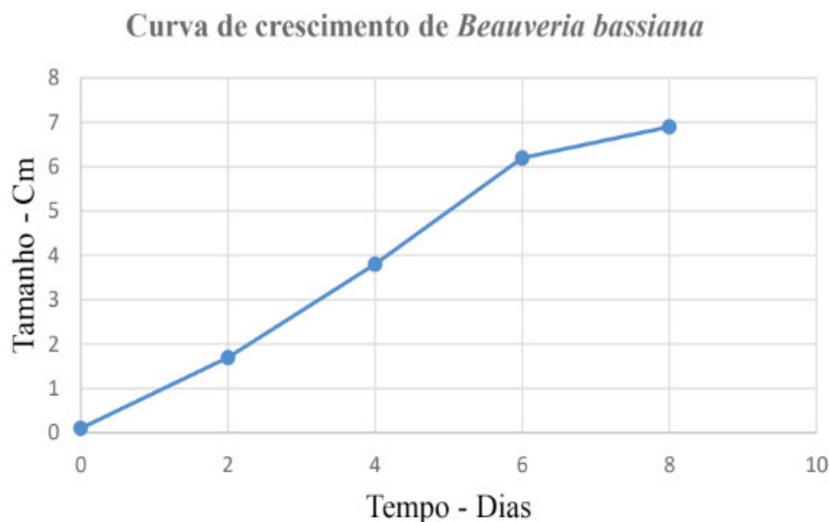


Figura 2 – Curva de crescimento de *Beauveria bassiana* durante oito dias de crescimento em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose.

Na maioria absoluta dos fungos, o crescimento é uma resposta a composição e ao enriquecimento do meio de cultivo. No entanto, a concentração da fonte de carbono, pode justificar a resposta do desenvolvimento vegetativo *in vitro* (ROCHA, 1997).

Fatores ambientais como temperatura e umidade relativa, podem diminuir a eficácia de fungos entomopatogênicos utilizados como agentes de controle biológico, pelo simples fato de limitarem o seu desenvolvimento na superfície do inseto. A maioria destes fungos requer cerca de 90% de umidade relativa e uma temperatura adequada de crescimento para germinação, formação do tubo germinativo e infecção. Desta forma, a temperatura é um fator determinante para a taxa de germinação, crescimento, esporulação e sobrevivência dos fungos entomopatogênicos (CHANDLER et al., 2000).

3.2 Análise citomorfológica de *Beauveria bassiana*

A análise citológica foi realizada por meio de cultura em lamínula, no período de 24 a 120 horas após a inoculação. As observações microscópicas mostraram que as estruturas se formaram a partir da germinação dos conídios (Figura 3- AI e AII). A partir das 48 horas de cultivo foi verificada a diferenciação micelial formada por hifas hialinas, septadas (Figura 3 – AIII), uninucleadas e várias anastomoses (Figura 3 – B). O septo é formado da periferia para o centro do micélio, através da invaginação da parede interna onde há um poro mediano que permite a passagem do citoplasma e núcleo. Esta diferenciação funcional e morfológica da hifa é encontrada predominantemente nos Deuteromycetos, Ascomycetos, Uredinales e Ustilaginales (ALEXOPOULOS et al., 1996). As anastomoses são eventos importantes dentro dos Deuteromycetos,

porque possibilitam a troca do material genético (citoplasma e núcleo) entre hifas de diferentes origens (AZEVEDO, 2001). Com 72 horas de cultivo constatou-se a presença de conidióforos sésseis (Figura 3 - C). Com 72 horas foi constatada a presença de abundantes conidióforos formando densos cachos de conídios globosos e subglobosos. Os conídios são unicelulares e haplóides. Foi observado que os conídios estavam dispostos sobre as hastes das fiálides com várias ramificações do tipo zigue-zague. Existe uma variabilidade citológica dentro do gênero *Beauveria*, dificultando estudos taxonômicos e a caracterização das linhagens. A disposição dos conídios sobre as fiálides em zigue-zague é um caráter taxonômico e característico de *B. bassiana* (SAMSON; EVANS, 1982). Observações realizadas as 96 e 120 horas mostraram todas as estruturas em estágios avançados de desenvolvimento e numerosos conídios (Figura 3 - D).

Os conídios de *B. bassiana* são elementos reprodutivos de origem assexuada capazes de resistir às condições adversas, e de germinar sob condições favoráveis, garantindo a propagação da espécie (VIDOTTO, 2004). São caracterizados como ectosporos porque são formados nas extremidades de hifas especiais, denominadas de conidióforos (BERGAMIN FILHO et al., 1995). A disposição dos conidióforos, estruturas onde estão depositados os conídios e a forma dos conídios são características taxonômicas essenciais para distinguir as espécies de *Beauveria* e suas variedades (ALVES, 1998a).

B. bassiana é considerado um fungo eucárpico (ALEXOPOULOS et al., 1996). Característica facilmente identificada na cultura em lâmina realizada na espécie. As estruturas reprodutivas surgiram apenas em uma parte das estruturas somáticas, sendo a parte restante, a forma vegetativa. De modo geral as estruturas somáticas são diferentes das reprodutivas e estas possuem uma diversificação de formas nas quais se baseia a classificação dessas espécies (ELENA; PAPAS, 2002).

A correta identificação dos isolados fúngicos é extremamente importante devido ao papel que os fungos desempenham na natureza, particularmente os entomopatogênicos, que são utilizados no controle biológico de insetos-praga na agricultura (LUNA-ALVES LIMA, 1989; COSTA et al., 2006).

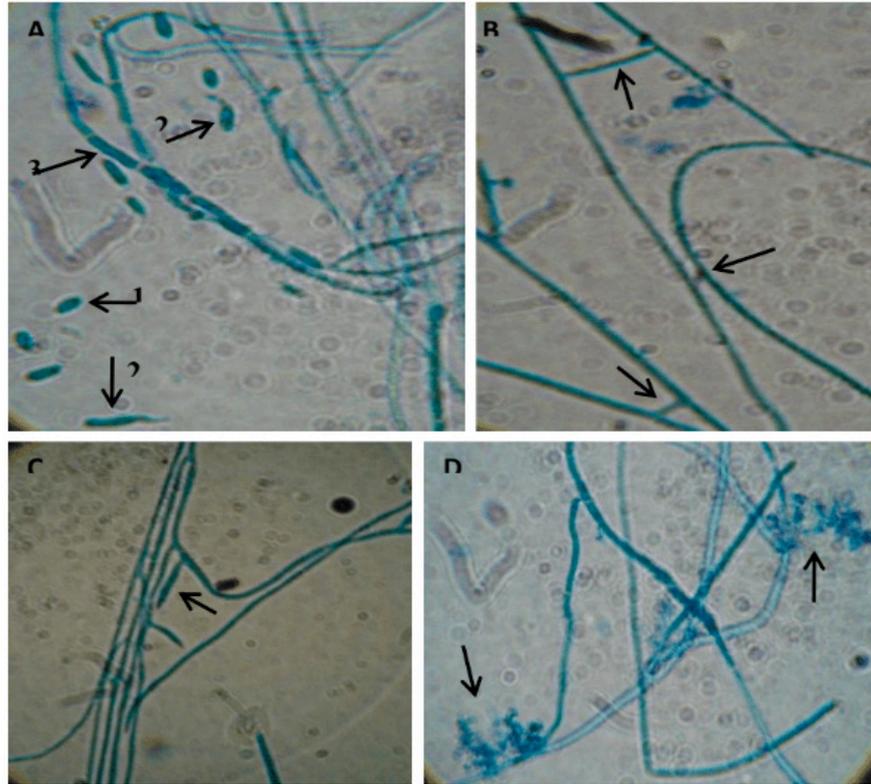


Figura 3 – *Beauveria bassiana*. (A1) Conídios; (A2) Conídios germinando; (A3) Micélio septado – hifa; (B) Anastomose; (C) Fiálides; (D) Conidióforos maduros formando densos cachos com terminações do tipo zigue-zague.

Fonte: Autores

3.3 Análise da atividade proteolítica in vitro de *Beauveria bassiana*

A atividade proteolítica de *B.bassiana* foi detectada pela formação de um halo transparente em torno da colônia, medindo 1,1 cm de largura (Figura 4). O halo foi formado pela degradação da caseína do leite Molico® em pó, única fonte de nitrogênio adicionada ao meio de cultura. Morfologicamente, a colônia mostrou micélio esbranquiçado com alta produção de conídios hialinos.

A caseína é a mais importante proteína do leite, sendo uma macromolécula, composta por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, incapaz de penetrar na membrana celular dos microrganismos. Para que a caseína seja utilizada pelos microrganismos, precisa ser degradada em peptonas, polipeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos. Este processo é possível porque os microrganismos produzem enzimas proteolíticas (proteases) que catalisam a hidrólise da caseína em aminoácidos, os quais são depois assimilados e catabolizados pelas células (ST LEGER et al., 1988).

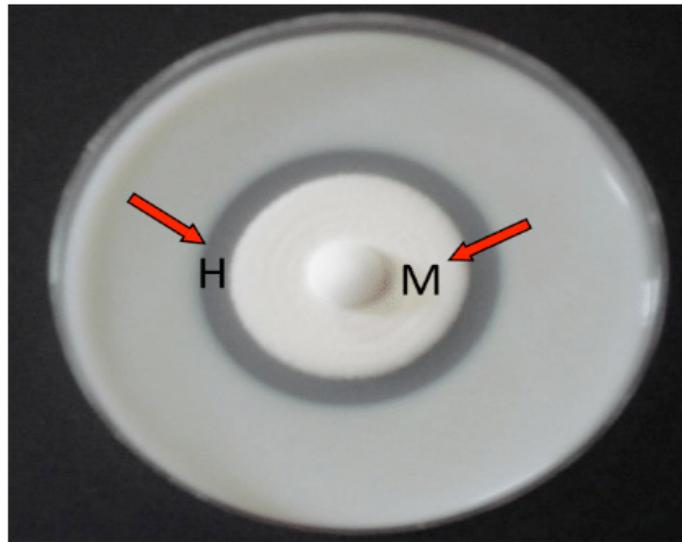


Figura 4 – A atividade proteolítica de *Beauveria bassiana* em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose, evidenciado pela formação de halo transparente em torno da colônia. H – halo transparente, M – micélio vegetativo.

Fonte: Autores

A partir dos dados obtidos, o IE foi calculado seguindo a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), em relação ao diâmetro da colônia ($\varnothing c$) pela razão do diâmetro da colônia mais o halo ($\varnothing h$). O resultado indicou que *B.bassiana* apresentou IE de 0,81 confirmando que o isolado possui uma atividade enzimática fortemente positiva ($Pz = 3$) em relação à degradação da caseína do leite mólico em pó. O IE é um dos parâmetros semi-quantitativo mais usado para se avaliar a produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido. Os microrganismos considerados produtores de enzimas possuem uma correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa (LIN et al., 1991; ARCHER; WOOD, 1995).

A atividade proteolítica, avaliada em meio de cultura sólido, torna o processo de seleção de linhagens bastante simples. Nossos resultados sugerem que o isolado de *B.bassiana* tem potencial para uso no controle biológico de insetos-praga. Em estudos realizados por Smith et al. (2000), não foi observada nenhuma correlação entre produção de exoenzimas e virulência. Porém as linhagens mais virulentas são de *B. bassiana* utilizadas em estudos, foram as que apresentaram índices de atividade proteolítica mais elevados.

Exoenzimas, lipases, proteases, amilases e quitinases são produzidas pelos fungos entomopatogenicos *in vitro*, o que facilita o estudo e a avaliação da correlação entre estas proteínas e outras características envolvidas na virulência. A atividade proteolítica é bastante discutida e sua eficiência na degradação de cutícula pode está ligada aos inibidores de proteases na hemolinfa das larvas dos insetos em geral (JOSHI et al., 1997; TIAGO; SILVA, 2007). ST LEGER et al. (1992) demonstrou que a protease é a enzima mais efetiva na degradação estrutural das proteínas ligadas a cutícula dos insetos.

4 | CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- Os meios de cultura utilizados foram eficazes para induzir tanto o crescimento quanto a esporulação de *B. bassiana*;
- A análise citomorfológica mostrou todas as estruturas características da espécie em diferentes estágios de desenvolvimento;
- A atividade proteolítica em meio sólido foi fortemente positiva;
- *B. bassiana* apresentou bom desenvolvimento e resposta aos experimentos realizados *in vitro*, apontando este isolado fúngico como um possível agente entomopatogênico a ser explorado para minimizar os danos ecotóxicos na produção animal e vegetal.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4ª ed. New York: Journal Wiley, p. 880, 1996.
- ALMEIDA, J. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. **Viabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. Reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleóptera: Curculionidae) artificialmente infectado**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 72, p. 473-480, 2005.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos**. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2ª. Edição. Piracicaba: FEALQ, p. 289, 1998a.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos**. Editora Malone Ltda, Piracicaba: FEALQ, p. 1163, 1998b.
- ARCHER, D. B.; WOOD, D. A. **Fungal exoenzymes**. In: GROW, N. A. R.; GADD, G. M. (Eds.). The growing fungus. London: Chapman e Hall, p. 137-162, 1995.
- AZEVEDO, J. L. **Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed). Controle Biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998, p. 69-96.
- AZEVEDO, J. L. **O uso dos fungos na biotecnologia**. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na Agricultura e na Agropecuária. Guiabá, Livraria e Editora Agropecuária Ltda., p. 300, 2001.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3ª. ed. vol. 1. São Paulo. Agronômica Ceres, p. 518, 1995.
- BITTENCOURT, V. R. **Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 2, p. 25-42, 2000.
- BURDON, J. J. **The structure of pathogen populations in natural plant communities**. Annual Review of Phytopathology, v. 31, p. 305-323, 1993.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. **Fungal biocontrol of acari**. Biocontrol Science and Technology, v. 10, p. 357-384, 2000.

- 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 AGROECOLOGIA, 4, 2006, Belo Horizonte, MG. Anais. Belo Horizonte, 2006.
- ELENA, K.; PAPAS, A. C. **Pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* in alfafa.** Journal of Phytopathology, v. 150, p. 495-499, 2002.
- FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. **O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 22, p.18-21, 2001.
- GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. **Biological control. Aspects of biological control with special reference to arthropods, 6 protozoans and helminthes of domesticated animals.** Veterinary Parasitology, v. 64, p. 47-64, 1996.
- GUIMARÃES, A. M. T. **Efeitos de carrapaticidas químicos e observações citológicas em *Metarhizium anisopliae*.** 2002. 58f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. G. **The use of solid media for detection of enzyme production by fungi.** Mycology, v. 67, p. 597-607, 1975.
- HOWART, F. G. **Environmental impacts of classical biological control.** Annual Review in Entomology. v. 36, p. 485-509, 1996.
- JOSHI, L.; ST LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. **Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR.** Gene, v. 197, p. 1-8, 1997.
- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. **The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 74, p. 213-223, 1999.
- KUMAR, V.; SINGH, G. P.; BABU, A. M.; AHSAN, M. M.; DATTA, R. K. **Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine.** Italian Journal of Zoology, v. 66, p. 39-43, 1999.
- LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. **Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 5, p. 275-280, 1991.
- LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBIRGDE, M.; PARKER, B. L. **Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae).** Journal of Invertebrate Pathology, v. 82, p. 139-147, 2003.
- LUNA ALVES-LIMA, E. A.; TIGANO, M. S. **Citologia de estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera furngiperda*.** Revista de Microbiologia, v. 20, p. 85-94, 1989.
- ROCHA, C. L. M. S. **Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para conidiogênese em *Aspergillus nidulans*.** 1997. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- REHNER, S. A. **Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*.** In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (Ed). Insect-fungal Association Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press, 2005, p. 405-500.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. **Two new *Beauveria* spp from South America.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 39, p. 93-97, 1982.

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

SMITH, K. E.; WALL, R.; FRENCH, N. P. **The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp.** Veterinary Parasitology, v. 92, p. 97-105, 2000.

ST LEGER, R. J.; DURRANDAS, P. K.; COOPER, R. M.; CHARLEY, A. K. **Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Archives of Microbiology. v. 41501, p. 413-416, 1988.

ST LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. **Molecular cloning and regulatory analysis the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Journal de Chemical, v. 204, p. 991-1001, 1992.

SCHAMNE, P. A. **Efeito de aditivos e fishfertilquitosana® em meios sólidos na produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010, 98p.

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.

THOMAS, M. B.; JENKINS, N. E. **Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*.** Mycological Reserach, v. 101, p. 1469-1474, 1997.

VIDOTTO, V. **Manual de micologia médica.** Ribeirão Preto, São Paulo: Tecmed, p. 289, 2004.

Agência Brasileira do ISBN

ISBN 978-85-7247-173-2



9 788572 471732