

O PAPEL DE PROTEASES DEGRADADORAS DE CUTÍCULA PRODUZIDAS POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS¹

PATRÍCIA VIEIRA TIAGO² e MÁRCIA CRISTINA FURLANETO³

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO - Os fungos entomopatogênicos apresentam fatores de virulência, incluindo a produção de enzimas, sendo que as proteases extracelulares estão envolvidas na hidrólise dos componentes cuticulares (predominância de proteínas) facilitando a penetração da hifa através da cutícula de insetos. Uma endoprotease tipo subtilisina designada Pr1 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* é o melhor modelo de determinantes de patogenicidade em fungos entomopatogênicos. Além de Pr1, foram caracterizadas em *M. anisopliae* var. *anisopliae* uma protease tipo tripsina designada Pr2, duas aminopeptidases extracelulares, uma metaloprotease e uma cisteína protease designada Pr4. Estudos relacionados à produção, regulação, clonagem e sequenciamento destas proteases têm sido realizados, e poderão permitir um melhor entendimento dos fatores envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

Termos para indexação: *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, proteases.

THE ROLE OF DEGRADING PROTEASES OF CUTICLE PRODUCED BY ENTOMOPATOGENICS FUNGI

ABSTRACT - The entomopathogenic fungi show virulence factors, including the enzymes production, AS WELL the extracellular proteases are involved in the hydrolysis cuticle components (proteins predominance) facilitating the hypha penetration through the insects' cuticle. An endoprotease type subtilisin designated Pr1 of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* is the best model of patogenicity determinants in entomopathogenicity fungi. Aside from Pr1, they were characterized in *M. anisopliae* var. *anisopliae* a protease type trypsin designated Pr2, two extracellular aminopeptidases, a metalloprotease and a protease cystein designated Pr4. Studies related to the producion, regulation, cloning and sequencing of the protease have been realized and they will be able to permit a better understanding of the factors involved in the host- pathogen interaction.

Index Terms: *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, proteases.

¹ Parte da Dissertação de Mestrado em Microbiologia, apresentada à Universidade Estadual de Londrina, pela primeira autora.

² Profa. M.Sc., Depto. de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso, Rodovia MT Km 07, C.P. 287, CEP 78300-000, Jardim Aeroporto, Tangará da Serra - MT. E-mail: patiago@unemat.br

³ Profa. Dra., Depto. de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, CEP 86051-970, Londrina – PR, Brasil.

FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E O CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS-PRAGAS

Estima-se que aproximadamente 250 mil espécies de insetos possam ser consideradas pragas da agricultura ou pragas urbanas. O método normalmente empregado para o controle de tais pragas baseia-se no uso de defensivos agrícolas, embora seja crescente a conscientização de seu impacto ambiental e da necessidade de alternativas viáveis. O controle microbiano representa um ramo do controle biológico de insetos, que consiste na utilização racional de patógenos, visando a manutenção da população das pragas em equilíbrio no ambiente. Os patógenos microbianos apresentam vantagens em relação aos inseticidas químicos de largo espectro, pois mantêm populações de parasitos, predadores e polinizadores (insetos não-alvo), não poluem o ambiente, não são tóxicos para o homem e outros animais e seu emprego em associação com inseticidas seletivos em subdosagens visa um controle mais rápido e eficaz de pragas, sem os inconvenientes das superdosagens dos inseticidas químicos (Alves, 1998a).

Os fungos entomopatogênicos apresentam grande versatilidade, causando danos a artrópodes que vivem em plantas, solos e ambientes aquáticos. Com um mecanismo de infecção especializado, alguns fungos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros (McCoy & Milani-Tigano, 1996). Para a maioria dos fungos a penetração ocorre via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral. Além disso, possuem alta capacidade de disseminação horizontal, podendo ser levados pelos diferentes agentes de disseminação para locais muito distantes. A variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos (Alves, 1998b).

Os principais fungos entomopatogênicos pertencem aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Aschersonia*, *Paecilomyces* e *Entomophthora* (Azevedo, 1998; Faria & Magalhães, 2001), sendo que o gênero *Metarhizium* compreende o grupo mais bem estudado. Segundo Bridge et al. (1993) este gênero inclui três espécies, identificadas segundo sua morfologia e tamanho de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metschnikov) Sorokin, *Metarhizium flavoviride* Gams e Rozsypal e *Metarhizium album* Petch. Recentemente, Driver et al. (2000) reavaliaram a taxonomia de isolados do gênero *Metarhizium* através do sequenciamento de regiões ITS (sequências

internas transcritas-DNAr) e de DNAr 28S e sua correlação com padrões de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). Este estudo permitiu o reconhecimento de quatro clades dentro do grupo *Metarhizium anisopliae*, correspondendo a duas variedades já descritas (*M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus*) e duas variedades novas (*M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *lepidiotum*).

M. anisopliae var. *anisopliae* tem sido a espécie mais bem estudada. A etapa inicial do processo de infecção se dá pela adesão e germinação de conídios do fungo na superfície do inseto, seguida de penetração da hifa através da cutícula. O processo de adesão depende da presença de enzimas (esterases e proteases) que ocorrem na superfície dos conídios não germinados e que alteram a superfície do tegumento do inseto, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (St. Leger et al., 1991a). Alguns fungos sob determinadas condições formam na extremidade do tubo germinativo uma estrutura denominada apressório, que corresponde a uma dilatação da hifa, onde ocorre elevada atividade metabólica devido à produção de enzimas (proteases, lipases e quitinases). Na penetração estão envolvidos os fatores físico (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químico, resultante da liberação destas enzimas que facilitam a penetração mecânica. Após a penetração, inicia-se o processo de colonização do hospedeiro, no qual ocorre proliferação das hifas na cavidade do corpo, com liberação de toxinas (dextruxinas e citocalasinas) que provavelmente causam sua paralização ou morte. Após a morte do hospedeiro, as hifas crescem invadindo os diversos órgãos internos. O micélio emerge do corpo do inseto produzindo esporos que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos (Alves, 1998b).

ENZIMAS DEGRADADORAS DE CUTÍCULA

O tegumento dos insetos constitui-se em uma barreira físico-química altamente eficiente contra a penetração de muitos agentes entomopatogênicos. Este tegumento compreende a epicutícula e procutícula. Segundo Woods & Grula citado por Bidochka et al. (1997) a epicutícula é composta por lipídios (95%), aminoácidos e aminoaçúcares que servem como fonte de nutrientes para a germinação do fungo. Já na procutícula as proteínas são os componentes predominantes (61%), seguida de quitina (30%) e lipídios (7%) (Bidochka & Khachatourians citado por Bidochka et al., 1997).

A penetração do fungo através do tegumento ocorre, em parte, pela ação de enzimas degradadoras de cutícula, sendo destacadas nesta revisão as principais proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. St. Leger et al. (1986a, c) verificaram que enzimas extracelulares (endoproteases, aminopeptidases, lipases, esterases e quitinases) foram produzidas em grandes quantidades por *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Verticilium lecanii* quando crescidos em cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. Uma protease purificada (Pr1) de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi capaz de remover 25–30% das proteínas cuticulares, sugerindo que proteases estariam envolvidas na hidrólise da cutícula e facilitariam a penetração da hifa através da mesma (St. Leger et al., 1986a). Além disso, foi observada uma grande variação nos níveis de produção enzimática entre os diferentes isolados, bem como entre as diferentes espécies analisadas, sendo que todos os isolados apresentaram alta produção de endoproteases. A sequência de produção dos diferentes tipos enzimáticos ocorreu de forma similar para as diferentes espécies, sendo que as primeiras atividades observadas (< 24h) foram as do complexo proteolítico e esterase (St. Leger et al., 1986c). Estes mesmos autores observaram que para que ocorra a hidrólise das proteínas cuticulares é necessária adsorção de proteases à cutícula (St. Leger et al., 1986b). Posteriormente, verificou-se que a adsorção da protease Pr1 ocorre via pontes eletrostáticas não específicas entre os grupos carregados positivamente da enzima e grupos carboxil da cutícula de gafanhoto. Modificações químicas dos grupos carboxil, amino e hidroxil de proteínas cuticulares do gafanhoto revelaram que os grupos carboxil são essenciais para ligações eletrostáticas de proteases básicas produzidas por estas espécies fúngicas (Bidochka & Khachatourians, 1994).

Segundo St. Leger et al. (1986a) o pré-tratamento de cutícula com proteases aumentou consideravelmente a subsequente produção de quitinases. *M. anisopliae* var. *anisopliae* parece não produzir quitinases durante a penetração da cutícula da larva do tabaco (*Manduca sexta*) (St. Leger, 1995). Os resultados obtidos a partir desse estudo sugerem que as quitinases possam ter um papel menos significativo na penetração da cutícula comparado ao das proteases (Charnley & St. Leger, 1991). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que as quitinases venham a desempenhar um papel importante na infecção considerando outros modelos de parasitismo (espécies fúngicas e hospedeiros diferentes) refletindo variabilidade tanto da estrutura cuticular de insetos quanto da capacidade de síntese de hidrolases por fungos entomopatogênicos (St. Leger et al., 1991b).

Duas proteases alcalinas foram caracterizadas a partir do sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ME1), sendo uma com atividade tipo quimoelastase (Pr1) e a outra com atividade tipo tripsina designada Pr2. Através do emprego de inibidores enzimáticos demonstrou-se que ambas possuem resíduos de serina e histidina no centro ativo. No entanto, Pr1 apresentou afinidade por aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) ou apolares (alanina e glicina), enquanto Pr2 hidrolisou caseína e substratos sintéticos contendo arginina ou lisina (St. Leger et al., 1987a).

Proteases do tipo Pr1 e Pr2 também foram observadas em sobrenadante de cultivo de *B. bassiana*, *V. lecanii*, *Nomuraea rileyi* e *Aschersonia aleyrodinis* (St. Leger et al., 1987b). As enzimas do tipo Pr1 produzidas por estes fungos apresentaram similaridades quanto a especificidade pelo substrato, porém, anticorpos contra protease de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ME1) reagiram somente com proteases produzidas por isolados da mesma espécie não ocorrendo reação com as proteases produzidas pelas demais espécies analisadas. Resultados semelhantes foram observados por Shimizu et al. (1993). Segundo estes autores, proteases produzidas por isolados de *B. bassiana* e de *Beauveria brongniartii* foram imunologicamente idênticas, enquanto que proteases de *B. bassiana* diferiram imunologicamente daquelas produzidas por *M. anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus*, apesar de apresentarem alto grau de similaridade quanto à especificidade pelo substrato.

O papel de Pr1 na degradação de proteínas cuticulares foi descrito por St. Leger et al. (1988a). Estes autores demonstraram que a presença de inibidor de Pr1 ou anticorpos IgG (específico para Pr1) durante a infecção de *M. sexta* por *M. anisopliae* var. *anisopliae* 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 sua superfície e que a presença de produtos de degradação da cutícula foram dependentes da presença de Pr1. O papel de Pr1 na degradação localizada de proteínas cuticulares foi corroborado em outro estudo onde esta enzima foi a principal protease produzida por estruturas infecciosas (apressório e tubos germinativos) durante a infecção (St. Leger et al., 1989).

O papel de Pr2 no parasitismo ainda não está completamente elucidado. Segundo St. Leger et al. (1987b), é possível que esta enzima possa estar envolvida em mecanismos de controle celular, catalisando processos de ativação e inativação proteolítica (*turnover* protéico). Paterson et al. (1994b) relataram que Pr2 estaria envolvida na ativação ou indução

de Pr1 em *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que, em cultivo, Pr2 ocorre anteriormente a Pr1 (Gillespie et al., 1998). Estes autores investigaram a produção de Pr1 e Pr2 em 19 isolados de *M. anisopliae*. A atividade de Pr1 foi observada após 72 horas de incubação, enquanto a atividade Pr2 foi detectada, na maioria dos isolados, após 48 horas, sugerindo que Pr2 atuaria precocemente na cutícula com liberação de peptídios indutores de Pr1.

Segundo St. Leger et al. (1994) proteases dos tipos Pr1, Pr2 e metaloproteases foram observadas no sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* durante o crescimento em cutícula de *Blaberus giganteus* (barata). Estes autores observaram através de eletroforese de focalização isoelétrica, a ocorrência de quatro isoformas de Pr1 e três isoformas de Pr2. A presença destas isoformas variou conforme o meio de cultura e tempos de cultivo, sugerindo que elas podem ser diferentemente expressadas ou apresentam uma estabilidade que varia conforme o meio de cultivo. Duas isoformas denominadas Pr1A (pI ~10; 29kD) e Pr1B (pI ~9; 31,5 kD) apresentaram propriedades físico-químicas semelhantes, embora com 53% de homologia nas suas sequências de aminoácidos N-terminal, sugerindo que estas enzimas são produtos de genes distintos. St. Leger et al. (1992) clonaram o gene *pr1A* (originalmente *pr1*) que codifica para Pr1A (originalmente Pr1) e segundo estes autores, a estrutura primária desta enzima é similar a das serino-proteases da subclasse das subtilisinas. Posteriormente, Joshi et al. (1997) clonaram o gene *pr1B* e a dedução de sua sequência de aminoácidos demonstrou 54% de similaridade com a subtilisina Pr1A. A análise cariotípica revelou que os genes *pr1A* e *pr1B* estão localizados em cromossomos diferentes. Quanto as três isoformas de Pr2, St. Leger et al. (1994) caracterizaram duas maiores (pI ~ 4,4 e pI ~ 4,9) e uma menor (pI ~ 5,2). Smithson et al. (1995) clonaram o gene (*try1*) que codifica uma protease degradadora de cutícula que apresenta alto grau de homologia com serino-proteases da subclasse tripsina (Try1). A análise de Southern blot indicou que *try1* ocorre como cópia única no genoma de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

Além das enzimas já citadas, *M. anisopliae* var. *anisopliae* produz duas aminopeptidases extracelulares (Charnley & St. Leger, 1991), uma cisteína protease designada Pr4 (Cole et al., 1993) e uma aspartil protease (St. Leger et al., 1998). Segundo Cole et al. (1993), Pr4 apresenta maior atividade degradadora de cutícula em relação a Pr2, embora o seu papel no parasitismo também não esteja esclarecido.

As proteases extracelulares de *M. anisopliae* var. *anisopliae* também têm sido estudadas em termos de regulação (St. Leger et al., 1988b; Paterson et al., 1994a; Paterson et al., 1994b; St. Leger et al., 1998; Moraes et al., 2003). St. Leger et al. (1988b) verificaram que em meios contendo fontes simples de carbono e nitrogênio Pr1 foi reprimida e Pr2 foi produzida em baixos níveis, enquanto que na ausência destas fontes nutricionais ambas foram rapidamente sintetizadas. Paterson et al. (1994a) observaram que a atividade Pr1 em meio contendo cutícula do gafanhoto *S. gregaria* foi dez vezes maior quando comparada a de micélio desreprimido (cultivado em meio com ausência de fonte de carbono e nitrogênio), sugerindo que Pr1 é induzida especificamente por componentes da cutícula do inseto. Moraes et al. (2003) analisaram a secreção de proteases (subtilisina e tripsina) e quitinases em meios contendo fontes de carbono/nitrogênio e substratos complexos como quitina e cutícula do carrapato *Boophilus microplus*. Estes autores verificaram maior atividade enzimática nos meios contendo substratos complexos. Portanto, a expressão dos genes envolvidos na síntese de Pr1 e Pr2 depende do nível de fontes de carbono e nitrogênio e da presença de proteínas indutoras no meio.

Segundo St. Leger et al. (1998) a produção de Pr1 e Pr2 apresenta um padrão diferencial de expressão em resposta ao pH do ambiente. Tais enzimas foram produzidas por *M. anisopliae* somente no pH em que elas atuam efetivamente independente do meio conter um substrato indutível, porém, os níveis de produção enzimática foram maiores quando o meio foi suplementado com cutícula de inseto. Tanto Pr1 quanto Pr2 foram produzidas somente em condições alcalinas (pH 8,0). Durante a penetração do fungo, o pH da cutícula infectada aumentou de 6,3 para 7,7, coincidindo com o pH de regulação da produção de Pr1 e Pr2. Os autores propuseram que a alcalinidade da cutícula infectada representa um sinal fisiológico da expressão de fatores de virulência, particularmente proteases.

Gillespie et al. (1998) relataram a produção de proteases extracelulares por isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviride*) utilizando cutícula de pupa de *M. sexta* e cutícula de diferentes partes do tegumento de *S. gregaria* (cutícula abdominal de ninfas de quinto instar, cutícula abdominal do inseto adulto e cutícula das asas) que compreendem tipos cuticulares com composição protéica e grau de esclerotização distintos. Os autores verificaram que a hidrólise destes tipos cuticulares por Pr1 ocorreu em diferentes graus, sugerindo uma hierarquia das distintas partes do inseto quanto à suscetibilidade à ação enzimática. Não foi observado correlação significativa, quanto à

degradação da cutícula e o tempo de mortalidade de *S. gregaria* para os diferentes isolados analisados. No entanto, observou-se que a contribuição de Pr1 na degradação não foi a mesma para cutícula de *M. sexta* e do gafanhoto *S. gregaria*. Estes resultados sugerem uma possível participação de Pr1 na especificidade ao hospedeiro.

Pinto et al. (2002) analisaram a produção de proteases extracelulares (Pr1 e Pr2) a partir de sete isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviride*) após crescimento em meio contendo cutícula do gafanhoto *Rhammatocerus 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. Estes dados permitem sugerir que Pr1 desempenha papel importante na degradação de proteínas cuticulares, sendo provavelmente um determinante de patogenicidade, semelhante ao observado para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (St. Leger et al., 1988a).

Pinto (1999) também analisou o efeito de diferentes valores de pH, temperatura e inibidores de proteases a partir do sobrenadante de cultivo de dois isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* (CG423 e CG442). Observou-se que o “pool” de proteases produzido por estes fungos é de caráter neutro e que a temperatura ótima para detecção de atividade proteolítica foi de 28°C. O efeito de inibidores proteolíticos permitiu a caracterização parcial do “pool” enzimático como proteases dos tipos serino–proteases, tripsina e cisteína–proteases.

Os estudos da produção de proteases por fungos entomopatogênicos têm se concentrado em atividades extracelulares, sendo escassos os relatos de atividade proteolítica intracelular. St. Leger et al. (1996) observaram imunocitoquimicamente, através de anticorpos marcados com partículas de ouro, duas isoformas de Pr2 em cortes finos de cutícula de *M. sexta* infectada por *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Ambas as isoformas foram secretadas por estruturas de infecção (apressório) na superfície da cutícula e estavam localizadas principalmente na parede celular do fungo, sendo sua distribuição intracelular bastante esparsa. Tiago et al. (2002) analisaram a produção de subtilisina (Pr1) e tripsina (Pr2) intra e extracelular do isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviride*) após crescimento em presença de cutícula do gafanhoto *Schistocerca pallens*, sendo verificados altos níveis de atividade extracelular tanto para Pr1 quanto para Pr2. Estes resultados sugerem a ocorrência de um eficiente mecanismo de secreção destas proteínas por este fungo.

Muitos dos trabalhos citados ressaltam o papel das proteases no processo de infecção de insetos por fungos, estando estas proteases envolvidas na hidrólise dos componentes cuticulares (predominância de proteínas) facilitando a penetração da hifa através da cutícula de insetos. Esta revisão também resalta a importância de se compreender como a produção dessas enzimas é regulada nos mais diversos processos fisiológicos, sendo que o tipo de substrato influencia sua expressão. Portanto, os estudos relacionados a determinantes de virulência de fungos entomopatogênicos poderão permitir um maior entendimento dos fatores envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

AZEVEDO, J.L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v.1, p.69-96.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.64, p.26-32, 1994.

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.

BRIDGE, P.D.; WILLIAMS, M.A.J.; PRIOR, C.; PATERSON, R.R.M. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.1163-1169, 1993.

CHARNLEY, A.K.; St. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, M.C. (Eds.) **The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. New York: Plenum, p.267-286, 1991.

COLE, S.C.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.113, p.189-196, 1993.

DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v.104, p.134-150, 2000.

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

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.

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.

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.

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, n.3, p.205-210, 2003.

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

PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M.; CLARKSON, 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. **Detecção e Caracterização de Proteases Extracelulares do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium flavoviride***. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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, n.2, p.231-234, 2002.

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

SMITHSON, S.L.; PATERSON, I.C.; BAILEY, A.M.; SCREEN, S.E.; HUNT, B.A.; COBB, B.D.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M. Cloning and characterisation of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v.166, p.161-165, 1995.

St. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, v.73, n.1, p.1119-1125, 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, 1986a.

St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.295-302, 1986b.

St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.85-95, 1986c.

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.123-131, 1987b.

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

St. LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Regulation of production of proteolytic enzymes by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology**, v.150, p.413-416, 1988b.

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, 1991a.

St. LEGER, R.J., COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.415-426, 1991b.

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.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.313, p.1-7, 1994.

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.

TIAGO, P.V., FUNGARO, M.H.P., FURLANETO, M.C. 2001. 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.

