



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

ANDRÉ GONÇALVES BEZERRA JUNIOR

**VARIABILIDADE GENÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE QUITINASE
EM COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS.**

**SUMÉ - PB
2017**

ANDRÉ GONÇALVES BEZERRA JUNIOR

**VARIABILIDADE GENÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE *QUITINASE*
EM COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Professor Dr. Ranoel José de Sousa Gonçalves.

**SUMÉ - PB
2017**

B574v Bezerra Júnior, André Gonçalves.

Variabilidade genética para a produção de Quitinase em coleção de fungos da caatinga com potencial aplicação no controle biológico de pragas. / André Gonçalves Bezerra Júnior. Sumé - PB: [s.n], 2017.

36 f.

Orientador: Professor Dr. Ranoel José de Sousa Gonçalves.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso Superior de Tecnologia em Agroecologia.

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Quitina. 3. controle biológico de pragas. I. Título.

CDU: 561.28(043.1)

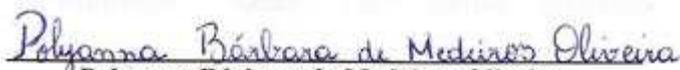
ANDRÉ GONÇALVES BEZERRA JÚNIOR

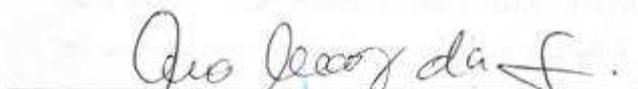
**VARIABILIDADE GENÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE QUITINASE
EM COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:


Professor Dr. Ranoel José de Sousa Gonçalves.
Orientadora – UATEC/CDSA/UFCG


Polyanna Bárbara de Medeiros Oliveira.
Engenheira de Biosistemas pela UFCG /CDSA
Mestranda em Farmacoquímica pela UFCG/CDSA
Examinadora I


Professora Dra. Ana Mary da Silva.
Examinador II – UAEBB/CDSA/UFCG

Trabalho aprovado em: 09 de março de 2017.

SUMÉ - PB

Dedico este trabalho este trabalho a minha família, em especial aos meus pais André e Lourdes por me darem todo o suporte e motivação necessária para continuar firme nos estudos diários, além dos ensinamentos básicos, como, caráter, humildade, simplicidade e respeito ao próximo, a minha segunda família que me acolheu em sua residência na hora que mais precisei Edvan e Rosângela e meus irmãos Iques, Ianca e Pedro Rafael, também dedico em especial aos meus irmãos Aldir, Telma, Vilma, Sirleide, Adegilda e Andreina, que me ensinaram o verdadeiro valor do trabalho duro e dedicação, ressaltando a importância dos estudos na nossa vida, por fim dedico, sobretudo ao meu amigo Pedro Jordan que hoje se encontra no céu. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de estar concluindo essa etapa na minha vida.

Agradeço aos meus pais André e Lourdes, por me darem suporte nas horas que mais precisei.

Aos meus irmãos Aldir, Telma, Sirleide e Adegilda, que sempre me incentivaram, em especial a minha irmã Vilma que sempre me inspirou a chegar onde estou.

A minha segunda família Edvan e Rosângela e seus filhos Iques, Ianca e Pedro.

Ao meu orientador Ranoel José, que me deu toda a orientação necessária para desenvolver este trabalho com maestria, ao qual ressalto minha imensa gratidão.

Aos meus professores, por todo o conhecimento passado durante toda a graduação.

Aos meus colegas de curso, que me ajudaram nas adversidades que a Universidade apresenta no decorrer da graduação.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e me fizeram ser feliz durante toda minha vida acadêmica.

A Universidade Federal de Campina Grande, por me proporcionar realizar meu sonho.

RESUMO

A Caatinga representa uma crescente potencialidade para o setor da prospecção de microrganismos com características comerciais para produção de metabólitos secundários, dentre os quais se destaca os fungos entomopatogênicos. Estes têm sido utilizados como alternativa ao controle biológico de insetos-praga na agricultura, pois secretam enzimas capazes de degradar constituintes do exoesqueleto desses patógenos. Nesse contexto, esta pesquisa buscou verificar a existência de variabilidade genética para a produção de quitinase em isolados fúngicos pertencentes à coleção de fungos filamentosos da caatinga. Avaliando o crescimento celular dos genótipos na presença de quitina, bem como quantificando o Índice Enzimático (IE) por meio do Método de Difusão em Gel de Ágar, onde valor superior a dois classificaram os isolados fúngicos como promissores para produção de quitinase. Dentre os 117 isolados fúngicos apenas 45,3% apresentaram perfil de crescimento. Efeito significativo que mostra a atividade quitinolítica dos isolados fúngicos, indica existência de variabilidade genética e sugere situação favorável para a seleção desses genótipos. Verificou-se, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, a formação de três grupos de genótipos com aptidões distintas sendo o CDSA-097, CDSA-098 e CDSA-111 aqueles que apresentaram maior desempenho para variável resposta em estudo.

Palavras-chave: Quitina. Fungos entomopatogênicos. Índice enzimático.

ABSTRACT

The Caatinga is a growing potential for the exploration sector of microorganisms with commercial characteristics for the production of secondary metabolites, among which stands out the entomopathogenic fungi. These have been used as an alternative to biological control of insect pests in agriculture because secrete enzymes capable of degrading exoskeleton constituents of these pathogens. In this context, this study aimed to verify the existence of genetic variability for the production of chitinase in fungal isolates belonging to filamentous fungi collection of the Caatinga. Evaluating cell growth of the genotypes in the presence of chitin, as well as quantifying the Enzyme Index (IE) through the diffusion method in agar gel, which worth more than two classified the fungal isolates as promising for the production of chitinase. Among the 117 fungal isolates only 45.3% had growth profile. Significant effect showing chitinolytic activity of fungal isolates, indicating the existence of genetic variability and suggests favorable situation for the selection of these genotypes. There was, by Scott-Knott test at 5% probability, the formation of three groups of genotypes with different skills and the CDSA-097, CDSA-098 and CDSA-111 those with higher performance for response variable under study.

Keywords: Chitin. entomopathogenic fungi. enzymatic index.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teste semiquantitativo de produção de quitinase após revelação com solução de iodo e iodeto de potássio pelos isolados fúngicos CDSA-113 (a) e CDSA-114 (b). UFCG, Sumé, PB, 2015.....	27
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios de cultivo utilizados na manutenção, ativação e produção de quitinase.....	23
Tabela 2 - Isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG que apresentaram crescimento em meio contendo quitina como fonte de carbono. UFCG, Sumé, PB, 2015.....	26
Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o índice enzimático de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG. UFCG, Sumé, PB, 2015.....	28
Tabela 4 - Produção de quitinase por meio de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG, avaliados pelo índice enzimático (IE). UFCG, Sumé, PB, 2015.....	29

ABREVIATURAS E SIGLAS

b	Índice b
BDA	Batata Dextrose Amido
Biolab	Laboratório de Biologia Celular
BOD	Estufa Incubadora Refrigerada (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
CV _e	Coefficiente de Variação Ambiental
CV _g	Coefficiente de Variação Genética
h _a ²	Herdabilidade no sentido amplo
IE	Índice Enzimático
NAcGLc	N-acetil-Dglucosamina
NAGs	N-acetilglutamato sintase
SAS	Statistical Analysis System
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	DESENVOLVIMENTO.....	14
	2.1. Controle Biológico.....	14
	2.2. Fungos Entomopatogênicos.....	15
	2.3. Quitinase.....	17
	2.4. Quitinase versus Controle Biológico.....	18
	2.5. Parâmetros Genéticos.....	20
3	OBJETIVOS.....	21
	3.1. Objetivo Geral.....	21
	3.2. Objetivos Específicos.....	21
4	METODOLOGIA.....	22
	4.1.1 Quitina.....	22
	4.2 Seleção dos Microrganismos.....	22
	4.3 Manutenção e Ativação dos Microrganismos.....	22
	4.4 Meios de Cultivo.....	23
	4.5 Métodos Analíticos.....	23
	4.5.1 Formação do Halo.....	23
	4.5.2 Análise Estatística e Obtenção dos Parâmetros Genéticos.....	24
5	ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE DADOS.....	25
6	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de alimentos cresce em ritmo vertiginoso, havendo previsão de expansão nos próximos anos. Apesar deste sucesso como grande produtor e fornecedor mundial de alimentos, principalmente de origem vegetal, o atual modelo empregado na produção agrícola é feito com o uso de agentes químicos que vem ocasionando danos significativos ao ambiente e a saúde humana, além de resultar no aumento dos custos de produção. A utilização intensiva de agentes químicos, com o objetivo de mitigar danos causados por doenças, plantas invasoras ou pragas na agricultura, tem resultado em diversos problemas de ordem ambiental, como por exemplo, o alto teor residual em alimentos, acúmulo de compostos químicos indesejáveis no solo e contaminações de bacias hidrográficas e lençóis freáticos (PAULA JÚNIOR *et al.*, 2005).

Uma alternativa à redução de tais impactos, tem sido a implementação do controle biológico. Segundo Filho *et al.* (2010) o controle biológico por microrganismos apresenta-se como alternativa inteligente para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos. A diversidade de microrganismos surge como ferramenta importante para a aplicação do controle biológico. Entre os microrganismos com potenciais aplicações para o controle biológico com o objetivo de reduzir o uso de inseticidas químicos, os fungos entomopatogênicos têm sido utilizados como alternativa ao controle de insetos-praga na agricultura. Proteases e quitinases têm sido aceitas como os principais fatores determinantes da virulência dos fungos entomopatogênicos (St. LEGER *et al.*, 1986b).

Devido à capacidade de atuarem como agente de defesa contra organismos quitinosos, como fungos e insetos, considerável interesse tem sido dedicado às propriedades biopesticidas das enzimas quitinases. A hidrólise da quitina acarreta uma desestruturação nos tecidos (insetos) e células (fungos e bactérias) dos organismos-alvos levando-os a morte. Essa característica viabiliza o emprego de microrganismos produtores de quitinase, como agentes de biocontrole a fungos fitopatogênicos e insetos-pragas (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006), podendo assim, reduzir o emprego excessivo de moléculas químicas nocivas. Desta forma, as quitinases destacam-se como produtos de microrganismos de elevado potencial para o controle de pragas e doenças agrícolas.

Os fungos vêm se destacando graças a seu enorme potencial em produzir uma infinidade de metabolitos, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas, entre elas, um possível potencial antifúngico, assim representando um mercado bilionário em todo o mundo (AZEVEDO & ARAÚJO, 2006). Isso pode ser justificável pela existência de variabilidade

genética neste reino para as diversas características. É oportuno evidenciar, ainda, que esta possível variabilidade genética pode ocorrer não apenas em nível de reino, mas também, em nível de filo, classe e até mesmo de raças.

Diante do potencial demonstrado pelas enzimas quitinase para o controle biológico de pragas, nota-se a grande importância de identificar e selecionar isolados fúngicos do Bioma Caatinga que apresentem potencial aplicação na indústria desse segmento agrícola. Assim, objetivou-se neste trabalho verificar a existência de variabilidade genética para a produção de quitinase em isolados fúngicos pertencentes à coleção de fungos filamentosos da caatinga, e avaliar a eficiência do método de seleção empregado, pela estimação dos coeficientes de variação genética e ambiental, e das herdabilidades no sentido amplo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Controle Biológico

O surgimento de pragas está relacionado, principalmente, à simplificação do agroecossistemas, pelo cultivo de extensas áreas com uma só espécie de planta. Nessa situação de monocultivo, a principal forma de controle dessas pragas tem sido feita pela utilização de inseticidas químicos. Esses inseticidas, além de caros, são frequentemente aplicados de forma inadequada, ocasionando danos ao meio ambiente e a saúde do agricultor. No entanto, pode-se reduzir o efeito negativo desses inseticidas, através do manejo integrado de pragas, que consiste na utilização simultânea de diversas táticas de redução populacional dos insetos-praga, de forma econômica e harmoniosa com o meio ambiente (CROCOMO, 1990).

Predadores, parasitóides e patógenos atuam como agentes de controle natural e quando bem manejados, podem regular populações de insetos fitófagos em vários agroecossistemas. Essa regulação, também conhecida por controle biológico, foi definida por DeBach (1964) como a ação de parasitóides, predadores e patógenos que mantêm a densidade populacional de outros organismos numa média mais baixa, em relação à que ocorreria na ausência destes. Segundo Romeiro (2007) o controle biológico é uma técnica aplicada à redução da população de uma espécie-alvo que tem potencial de provocar dano econômico, além de ser recomendado para reduzir as populações de insetos pragas, e combater plantas daninhas, patógenos de plantas, nematoides, entre outros.

A utilização do controle biológico, incluindo o uso de práticas culturais adequadas para promovê-lo, forma a base do manejo integrado, que pode ser complementado com a utilização de inseticidas químicos ou outras formas de controle de pragas. No Brasil, especialmente, na região nordeste os inimigos naturais entomófagos e os microorganismos entomopatogênicos devem ser incrementados e conservados, afirma Ramalho *et al.* (1984).

Na prática, o controle biológico pode ser autosustentável e se diferencia de outras formas de controle, porque atua dependendo da densidade da população da praga. Portanto, com o aumento da densidade populacional dos inimigos naturais, a densidade populacional das pragas tende a diminuir e vice-versa (DEBACH & ROSEN, 1991).

O interesse pelo controle biológico tem crescido consideravelmente no mundo em função do novo direcionamento internacional dado à produção agrícola, no sentido de se utilizar meios alternativos menos agressivos ao ambiente, visando favorecer a conservação e o uso

sustentável da biodiversidade (BETTIOL & GHINI, 1995). Diante disso, atualmente, o controle biológico evoluiu muito e tem sido amplamente empregado em praticamente todo o mundo para combater espécies consideradas nocivas. No entanto, é preciso destacar que o uso desta técnica isoladamente não é, em muitos casos, suficiente para controlar os insetos, necessitando ser integrado a outras técnicas de controle, afirma Barbosa (2004).

Segundo Melo *et al.* (2000) a aplicação de microrganismos como os vírus, as bactérias e os fungos, como agentes de biocontrole, tem se mostrado eficiente à redução de efeitos danosos causados por pragas e fitopatógenos. Os microrganismos entomopatogênicos são uma ferramenta do manejo integrado, e sua identificação e estudo são de grande importância para o incremento do uso deste método visto que, esses organismos são capazes de produzir e liberar enzimas hidrolíticas degradadoras da parede celular do patógeno, o que representa um fator determinante na eficiência desse controle.

2.2 Fungos Entomopatogênicos

Com o objetivo de reduzir o uso de inseticidas químicos, os fungos entomopatogênicos têm sido utilizados como alternativa ao controle de insetos-praga na agricultura. Estes fungos apresentam vantagens, em relação a outros agentes microbianos do controle biológico, porque não necessitam ser ingeridos para causar doença nos insetos (ALVES, 1998). Esses fungos têm como hospedeiros primários os afídeos, gafanhotos, moscas, besouros, lagartas, tripses e ácaros. Possuem largo espectro de ação, capazes de colonizar diversas espécies de insetos e ácaros e de causar, com frequência, epizootias em condições naturais. Esses patógenos também se diferem de outros grupos por ter a capacidade de infectar todos os estádios de desenvolvimento dos hospedeiros (ALVES *et al.*, 2008).

O sucesso do uso de fungos no controle biológico depende de ter o isolado que seja ativo contra o inseto-alvo, dependendo do estágio de vida deste inseto, da umidade relativa e da temperatura. Os esporos fúngicos, que podem ser transportados pelo vento e pela água, devem entrar em contato com o hospedeiro para causar infecção. Segundo Khachatourians (1996) a infecção ocorre por adesão dos conídios fúngicos, e subsequente penetração da cutícula protetora dos insetos devido à produção de enzimas extracelulares e pressão mecânica exercida pelas estruturas de reprodução dos conídios.

Uma vez dentro dos insetos, os fungos multiplicam-se rapidamente por todo o corpo. A morte é causada pela destruição dos tecidos e, ocasionalmente, pelas toxinas produzidas pelos fungos. Os fungos entomopatogênicos frequentemente emergem do corpo dos insetos, produzem esporos que, quando espalhados pelo vento, chuva ou contato com outros insetos, podem causar uma epizootia. Os insetos infectados param de alimentar e tomam-se mais lentos. Estes morrem relativamente rápido, às vezes em uma posição ereta, mas ainda presos na folha ou no ramo, afirma (ALVES *et al.*, 2008).

Proteases e quitinases têm sido aceitas como os principais fatores determinantes da virulência dos fungos entomopatogênicos, pois hidrolisam os principais polímeros constituintes da cutícula, proteínas e quitina, organizados em camadas denominadas exo e endocutícula, afirma (St. LEGER *et al.*, 1986b).

No Brasil, o primeiro registro de insetos-praga do algodoeiro infectados por fungos entomopatógenos foi citado por Hambleton (1937). De acordo com esse autor exemplares adultos da broca-do-algodoeiro, *Eutinobothrus brasiliensis* (HAMBLETON, 1937) destinados a criação foram encontrados atacados pelos fungos *Botrytis* sp. (*B. bassiana*) e *Verticilium* sp. Segundo Alves *et al.* (2008) os principais fungos entomopatogênicos usados em programas de controle biológico no Brasil são: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

O fungo *Beauveria bassiana* é empregado em escala comercial em alguns países, entre eles os Estados Unidos e o México. Volumes consideráveis desse fungo foram comercializados no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café, além de um volume menor ter sido destinado ao controle de cochonilhas. Esse fungo tem-se mostrado igualmente eficiente no controle de cupins, muito embora, do ponto de vista comercial, ainda seja desejável o desenvolvimento de metodologias de aplicação de maior praticidade, além de apresentar potencial para o controle de pragas como o moleque-da-bananeira e a mosca branca. (FARIA & MAGALHÃES, 2001).

Na região Nordeste, o fungo *M. anisopliae* é utilizado para o controle da cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*. Na região, a cana-de-açúcar ocupa, cerca de um milhão de hectares e o momento favorável vivido pelo setor sucro-alcooleiro poderá impulsionar a utilização de micoinseticidas (FARIA & MAGALHÃES, 2001). Pesquisas realizadas nas regiões Sudeste e Nordeste mostram que o fungo *M. anisopliae* possibilita redução de 70 a 90% dos indivíduos. No estado de São Paulo, o tratamento dos canaviais com *M. anisopliae* reduz em três vezes o custo do tratamento em relação ao uso de agrotóxicos, como afirma Júnior (2011).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são excelentes hiperparasitas, pois atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno (BETTIOL & GHINI, 1995). A capacidade saprofítica do *Trichoderma* está na quantidade de enzimas hidrolíticas produzidas e liberadas. Estas enzimas apresentam efeito sinérgico com os antibióticos visto que a ação antifúngica de ambos compostos tende a ser superior a qualquer um deles agindo separadamente (BETTIOL & GHINI, 1995).

O fungo *S. insectorum* é utilizado para combate de ninfas e adultos do percevejo-de-renda da seringueira, *Leptopharsa heveae*. Empresas produtoras de látex no estado de Mato Grosso vêm usando o fungo *S. insectorum* desde a década de 80. As percentagens de mortalidade observadas sob condições de campo são variáveis, superior a 90% no estado do Amazonas e de 80% no estado de São Paulo (JUNQUEIRA *et al.*, 1999).

Segundo Faria e Magalhães (2001) é provável que o volume de micoinseticidas em comercialização em nosso país, considerando ainda as produções de empresas de menor porte, resulte no tratamento anual de 120, 150 mil hectares. Os números são bastante modestos, sobretudo quando comparados com inseticidas químicos ou mesmo com produtos biológicos como o Dipel e Thuricid (constituídos de esporos e toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* como ingredientes ativos e destinados exclusivamente ao controle de lagartas), mas o contexto atual mostra-se favorável ao crescimento do mercado de micoinseticidas.

2.3 Quitinase

As enzimas quitinolíticas, ou quitinases, estão incluídas em uma classe de enzimas do grupo das glicosil-hidrolases, capazes de promover a clivagem das ligações β -(1,4) existentes entre os monômeros de NAcGLc, produzindo oligômeros, multímeros e monômeros de NAcGLc (FLACH *et al.*, 1992). Estes resíduos de N-acetil-Dglucosamina compõem a quitina, um polímero insolúvel linear presente de forma considerável na natureza, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta.

De acordo com a nomenclatura sugerida por Sahai *et al.* (1993), as enzimas quitinolíticas são divididas em dois principais tipos: as quitinases que podem ser endoquitinases ou exoquitinases e NAGs. Endoquitinases são definidas como enzimas que catalisam a hidrólise randômica de ligações β -1,4 de N-acetilglicosamina (GlcNac) produzindo produtos solúveis como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose. Exoquitinases podem ser sub-divididas em duas subcategorias: quitobiosidases que catalizam a liberação progressiva de

diacetilquitobiose do final não redutor da cadeia de quitina (HARMAN *et al.* 1993) e NAG que hidrolizaquitobiose ou libera N- β -D-acetilglicosamina do polímero de quitina.

As quitinases são produzidas principalmente por organismos que possuem quitina na sua parede celular ou exoesqueleto como insetos, crustáceos, fungos, algas entre outros. Em fungos e crustáceos as quitinases são essenciais para síntese da parede celular e do exoesqueleto, respectivamente (PATIL *et al.*, 2000). Alguns organismos que não possuem quitina produzem quitinase com o objetivo de degradar quitina de outros organismos e obter nutrientes, na ausência de outras fontes de carbono, como no caso de bactérias do solo. Em plantas está relacionada com a defesa contra fungos fitopatogênicos.

Em insetos, a quitina associa-se a proteínas para formar a cutícula do exoesqueleto e matriz peritrófica, a qual contém uma mistura de glicosaminoglicanos, glicoproteínas e quitina (LEHANE *et al.*, 1996). A matriz peritrófica serve como barreira contra patógenos (SHAHABUDDIN *et al.*, 1996), além de atuar na digestão em insetos hematófagos (SHAO *et al.*, 2001) e também como substrato para a ligação do grupo heme como ocorre em *Aedes aegypti* (PASCOA *et al.*, 2002). As quitinases são importantes na degradação da matriz peritrófica do intestino de insetos por permitir uma absorção eficiente de nutrientes. Em crustáceos essa localização da quitinase permite a degradação parcial do seu exoesqueleto durante o desenvolvimento, através de um mecanismo de controle hormonal (SPINDLER-BARTH, 1993).

Segundo Matsuo *et al.* (1999) os principais microrganismos produtores de quitinases são *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio vulnificus*, *Streptomyces* spp, *Trichoderma harzanium*, *Cellulomonas flavigena*, *Beauveria bassiana*, *Enterobacter* sp, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas* sp, entre outros.

2.4 Quitinase versus Controle Biológico

Um dos produtos de microrganismos que apresenta grande potencial para o controle biológico é a quitinase, pois esta enzima hidrolítica possui a capacidade de degradar a quitina presente no exoesqueleto de prováveis patógenos da agricultura. Segundo Kern (2003) considerável interesse tem sido dedicado às propriedades biopesticidas das enzimas quitinolíticas, devido à capacidade de atuarem como agentes de defesa contra organismos quitinosos, como fungos e insetos.

Esta categoria de enzima digere a parede celular do hospedeiro, possibilitando a utilização de nutrientes intracelulares pelo fungo antagonista. A viabilidade celular depende da integridade dos componentes de sua parede celular, a qual funciona como barreira seletiva ante as pressões físico-químicas exercidas pelo meio ambiente em que o microorganismo sobrevive. Tal barreira é o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos (LORITO *et al.*, 1994). As enzimas hidrolíticas capazes de lisar os componentes da parede celular desempenham, portanto, papel fundamental no processo antagonístico do micoparasitismo (DE MARCO *et al.*, 2000).

Os protoplastos dos fungos são protegidos por parede celular, a qual seleciona o fluxo de materiais, protege o organismo contra ambientes hostis e constitui um obstáculo para possíveis parasitas. A parede celular de fungos é constituída principalmente por quitina, β -1,3-glucana e proteínas. O sucesso da digestão das células do hospedeiro pelo agente de controle biológico irá depender de sua habilidade de produzir enzimas capazes de degradar esta barreira primária. Entre as proteínas com ação enzimática secretadas por *Trichoderma* durante a interação micoparasita encontram-se quitinases, β -1,4-N-acetilglicosaminidases, β -1,3-glucanases e proteases (LIMA *et al.*, 1998).

Os sistemas quitinolíticos, assim como os celulolíticos, mais bem estudados são aqueles produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*. A espécie que apresenta maior número de trabalhos identificando a presença de quitinase no controle biológico é a *T. harzianum* (LORITO, 1998).

Segundo Haran *et al.* (1995) a penetração de *Trichoderma* no lúmen das hifas do hospedeiro irá depender da taxa de secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares, que degradam a parede celular do fungo e geram orifícios no local dos apressórios, permitindo a invasão do interior do corpo do hospedeiro. A secreção enzimática constitui uma etapa essencial no biocontrole de fungos.

Considerando as evidências de que a infecção de fungos entomopatogênicos resulta da ação sinérgica e complementar entre enzimas extracelulares; e em grande parte por atividade das quitinases produzidas pelos mesmos; e tendo em vista que o estudo dos mecanismos de ação das enzimas colabora com informações sobre a ação bioinseticida dos fungos entomopatogênicos é de elevada relevância avaliar a produção desta enzima, tendo em vista a seleção de potências linhagens para o biocontrole.

2.5 Parâmetros Genéticos

As estimativas de parâmetros genéticos permitem conhecer a estrutura genética da população, a inferência da variabilidade genética presente na população e proporcionam subsídios para prever os ganhos genéticos e o possível sucesso no programa de melhoramento. Essas estimativas também são importantes na redefinição dos métodos de melhoramento a serem utilizados, na identificação da natureza da ação dos genes envolvidos no controle dos caracteres quantitativos, na definição com eficiência de diferentes estratégias de melhoramento para obtenção de ganhos genéticos com a manutenção da base genética adequada na população (CRUZ & CARNEIRO, 2006).

Entre os parâmetros genéticos e fenotípicos que podem auxiliar o direcionamento da seleção, destacam-se as variâncias genéticas e fenotípicas, as herdabilidades e as correlações genéticas. Quanto à herdabilidade, é fundamental que seja a mais real possível, devido à sua importância na predição de ganhos genéticos de um caráter. Essa veracidade, por sua vez, depende do controle experimental, do local e número de anos de experimentação, da característica avaliada, do método de estimação e da natureza da unidade de seleção (FERRÃO et. al., 2008).

A importância da correlação entre características reside na possibilidade de se avaliar o quanto a alteração em um caráter pode afetar os demais. Se a seleção de um caráter é dificultada pela baixa herdabilidade ou por problemas de mensuração e identificação, esse tipo de conhecimento é importante nas diferentes etapas dos programas de melhoramento (CRUZ et al., 2004). Como a maioria dos programas de melhoramento leva em consideração muitas características simultaneamente, o entendimento da associação genética entre elas pode contribuir para a escolha dos procedimentos de seleção mais apropriados para maximizar o ganho genético por geração (SANTOS & VENCOVSKY, 1986).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a existência de variabilidade genética para a produção de quitinase em isolados de fungos pertencentes à coleção de fungos da caatinga, e avaliar a eficiência do método de seleção empregado, pela estimação dos coeficientes de variação genética e ambiental, e das herdabilidades no sentido amplo.

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, dentre os isolados testados da coleção de fungos da caatinga pertencentes ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido - CDSA, aqueles com maior potencial produtivo para a produção da enzima quitinase, conseqüentemente potencial na aplicação no controle biológico de pragas e doenças de plantas;
- Verificar a capacidade dos isolados da coleção de fungos da caatinga do CDSA em hidrolisar a quitina como substrato;
- Obter outras informações imprescindíveis para tomada de decisões e direcionamento de pesquisas futuras.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG).

4.1 Quitina

No presente trabalho foi utilizada a quitina cedida pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) para o cultivo dos isolados fúngicos objetivando analisar seu perfil de crescimento e produção de quitinase, parâmetro verificado pela formação de halos.

4.2 Seleção dos Microrganismos

Será utilizada neste trabalho a coleção de fungos filamentosos pertencente ao Biolab do CDSA/UFCG, dentre os quais possui 117 isolados fúngicos, identificados por códigos e isolados após algumas coletas de solo e partes aéreas de plantas realizadas entre os meses de Setembro/Outubro de 2012 nas mediações do centro.

4.3 Manutenção e Ativação dos Microrganismos

Para o procedimento de conservação e ativação das células foi utilizado o meio de cultivo sólido básico BDA, cuja composição é demonstrada na Tabela 1. O armazenamento dos isolados fúngicos foi em câmara climatizada BOD a 3°C sem repique periódico. A ativação ocorreu em placas de Petri, também em câmara climatizada BOD, porém a 28°C durante 7 dias.

Tabela 1 - Composição dos meios de cultivo utilizados na manutenção, ativação e produção de quitinase. (Fonte: Própria)

Composição	Meio BDA (g/L)	Meio A (g/L)
Batata	200	-
Dextrose	18	-
Ágar	15	15
Quitina	-	10

Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

4.4 Meios de Cultivo

Os isolados fúngicos foram repicados em placas de Petri contendo meio sintético formulado com a presença de quitina (meio A) e incubadas à temperatura de 28°C durante 5 dias. A formulação do meio A está apresentada na Tabela 1.

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1. Formação do Halo

As placas contendo as colônias foram submetidas à coloração específica com solução contendo iodo (3,33 g/L) e iodeto de potássio (6,67 g/L) por 20 minutos. O halo de degradação foi avaliado como indicativo da capacidade de produção enzimática. Para determinar o melhor potencial foi adotado, segundo Hankin e Anagnostakin (1975), o índice enzimático (IE), que relaciona o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, como mostra a Equação 1. Os diâmetros foram medidos com auxílio de régua escolar.

$$IE = \frac{\text{diâmetro médio do halo de degradação}}{\text{diâmetro médio da colônia}} \quad (1)$$

Dessa forma, os isolados fúngicos que apresentarem IE superior a dois serão os que possuem melhor potencial para atividade quitinolítica extracelular (LEALEM & GASHE, 1994; STAMFORD *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

4.5.2 Análise Estatística e Obtenção dos Parâmetros Genéticos

O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados com três repetições. Cada placa corresponde a uma repetição. Os tratamentos utilizados foram 10 isolados fúngicos escolhidos ao acaso entre aqueles que foram capazes de crescer em meio sintético contendo quitina, dentre os 117 presentes na coleção. A variável resposta utilizada foi o índice enzimático, determinado pela Equação 1.

Os dados referentes ao índice enzimático foram submetidos à análise de variância, com os recursos do pacote computacional SAS (SAS INSTITUTE, 2001). As médias dos tratamentos serão comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974). A partir das esperanças dos quadrados médios das análises de variância, foram estimadas, de acordo com o procedimento de Vencovsky e Barriga (1992), as variâncias genéticas (σ_g^2), ambientais (σ_e^2) e a herdabilidade no sentido amplo (h_a^2). A herdabilidade foi determinada por meio da Equação 2:

$$h_a^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_e^2} \times 100 \quad (2)$$

Os coeficientes de variação genética (CV_g) e ambiental (CV_e), bem como o índice b , foram estimados a partir da Equação 3, 4 e 5, respectivamente:

$$CV_g(\%) = \left(\frac{(\sigma_g^2)^{0,5}}{\mu} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$CV_e(\%) = \left(\frac{(\sigma_e^2)^{0,5}}{\mu} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$b = \frac{CV_g}{CV_e} \quad (5)$$

5 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE DADOS

Dentre os 117 isolados fúngicos apenas 45,3% apresentaram perfil de crescimento em meio de cultivo contendo quitina como fonte de carbono e indutora para a produção de quitinase (Tabela 2). Esse registro é superior ao que foi comumente observado em estudos realizados por Silva Filho (2005) quando avaliou a produção da atividade enzimática de quitosanase por meio de fungos.

Donzelli *et al.* (2003) estudaram a hidrólise enzimática avançada de quitina de casca de caranguejo langostino com misturas de enzimas de bactérias e fungos e concluíram que a combinação de enzimas de *Trichoderma atroviride* e *Serratia marcescens* foram capazes de degradar completamente altas concentrações de quitina (100 g/mL) a partir de carapaças de caranguejo langostino convertendo a N-Acetilglicosamima (78%), glucosamima (2%) e quitobiose (10%).

Nogawa *et al.* (1998) estudaram a produção, purificação e caracterização total de quitosanase produzida pelo fungo *Trichoderma reesei* PC-3-4, no qual destaca-se que o fungo não produziu quitosanase em meio contendo quitina ou quitosana. Entretanto, o microrganismo produziu a enzima de interesse em meio contendo glicosamima e N-acetilglicosamima, sendo que para este último obteve-se uma atividade específica máxima de 1,5 U/mg após 72 horas de incubação. Ressaltando que a agitação favoreceu positivamente o processo de produção de quitosanase.

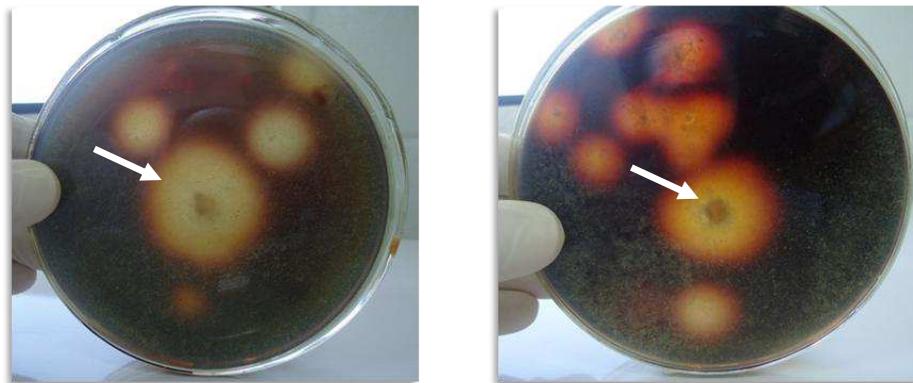
Tabela 2 - Isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG que apresentaram crescimento em meio contendo quitina como fonte de carbono. UFCG, Sumé, PB, 2015.

Código	IC	Código	IC	Código	IC
CDSA-01	+	CDSA-40	-	CDSA-79	+
CDSA-02	+	CDSA-41	-	CDSA-80	-
CDSA-03	-	CDSA-42	-	CDSA-81	+
CDSA-04	-	CDSA-43	-	CDSA-82	-
CDSA-05	-	CDSA-44	-	CDSA-83	+
CDSA-06	+	CDSA-45	-	CDSA-84	-
CDSA-07	+	CDSA-46	-	CDSA-85	+
CDSA-08	+	CDSA-47	-	CDSA-86	+
CDSA-09	-	CDSA-48	-	CDSA-87	+
CDSA-10	+	CDSA-49	+	CDSA-88	+
CDSA-11	+	CDSA-50	+	CDSA-89	-
CDSA-12	+	CDSA-51	-	CDSA-90	+
CDSA-13	+	CDSA-52	-	CDSA-91	-
CDSA-14	-	CDSA-53	-	CDSA-92	+
CDSA-15	-	CDSA-54	+	CDSA-93	+
CDSA-16	-	CDSA-55	-	CDSA-94	-
CDSA-17	+	CDSA-56	+	CDSA-95	-
CDSA-18	+	CDSA-57	-	CDSA-96	+
CDSA-19	-	CDSA-58	-	CDSA-97	+
CDSA-20	+	CDSA-59	-	CDSA-98	+
CDSA-21	-	CDSA-60	-	CDSA-99	-
CDSA-22	+	CDSA-61	+	CDSA-100	+
CDSA-23	+	CDSA-62	+	CDSA-101	+
CDSA-24	-	CDSA-63	-	CDSA-102	-
CDSA-25	-	CDSA-64	-	CDSA-103	+
CDSA-26	-	CDSA-65	-	CDSA-104	-
CDSA-27	-	CDSA-66	-	CDSA-105	+
CDSA-28	-	CDSA-67	-	CDSA-106	+
CDSA-29	-	CDSA-68	+	CDSA-107	+
CDSA-30	-	CDSA-69	-	CDSA-108	-
CDSA-31	-	CDSA-70	+	CDSA-109	+
CDSA-32	-	CDSA-71	-	CDSA-110	+
CDSA-33	-	CDSA-72	-	CDSA-111	+
CDSA-34	-	CDSA-73	+	CDSA-112	+
CDSA-35	+	CDSA-74	+	CDSA-113	+
CDSA-36	-	CDSA-75	-	CDSA-114	+
CDSA-37	-	CDSA-76	-	CDSA-115	+
CDSA-38	-	CDSA-77	-	CDSA-116	+
CDSA-39	-	CDSA-78	+	CDSA-117	-

Os símbolos (+) e (-), respectivamente, representam crescimento ou não da linhagem em meio contendo quitina. A sigla IC significa Indicativo de Crescimento. Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

Por meio do método analítico utilizado neste trabalho pode ser observado, que dentre os 8,56% dos genótipos selecionados ao acaso, 70% desses isolados fúngicos, além de expressarem perfil de crescimento, mostraram capacidade para produção de quitinase (Tabelas 2 e 4). Sendo o halo de degradação o indicativo de que ocorreu com sucesso a hidrólise enzimática da quitina, mostrando assim a atividade quitinolítica dos diversos genótipos (Figura 1).

Figura 1 - Teste semiquantitativo de produção de quitinase após revelação com solução de iodo e iodeto de potássio pelos isolados fúngicos CDSA-113 (a) e CDSA-114 (b).



Fonte: Imagem captada pelo pesquisador.

Houve efeito significativo para a atividade quitinolítica dos isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG, indicando, assim, haver variabilidade genética entre eles (Tabela 3). A estimativa do coeficiente de variação ambiental (CV_e) foi aproximadamente 545% inferior ao coeficiente de variação genética ($CV_e = 15,18\%$ e $CV_g = 82,79\%$), resultando em valor da razão $b = CV_g/CV_e$, superior a 1,0. Além disso, a estimativa de herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) foi alta (98,89%), o que reforça, mais uma vez, a alta variabilidade genética e também uma situação favorável para a seleção de isolados fúngicos com potencial para produção de quitinase (VENCOVSKY & BARRIGA, 1992).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o índice enzimático de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG. UFCG, Sumé, PB, 2015.

Fontes de variação	GL	Índice Enzimático
Blocos	2	0,3293
Genótipos	9	146,8240**
Erro	18	1,6274
Média (μ)		8,40
CV_e (%)		15,18
CV_g (%)		82,79
$b = CV_g/CV_e$		5,45
h_a^2 (%)		98,89

CV_e , coeficiente de variação ambiental; CV_g , coeficiente de variação genético; índice b , CV_g/CV_e ; e, h_a^2 , herdabilidade no sentido amplo. ^{NS}Não significativo. * e ** Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F. Fonte: Construída com os dados da pesquisa

De acordo com o critério do Índice Enzimático (IE) para determinar atividade quitinolítica, pôde-se evidenciar pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade há formação de três grupos constituídos por genótipos com aptidões distintas a expressar este caráter. Desses 10 genótipos testados ao acaso, 70% apresentam potencial para produção de quitinase, pois suas médias estão acima do ponto de referência ($IE \geq 2,0$). Os genótipos CDSA-097, CDSA-098 e CDSA-111 foram aqueles que apresentaram maior desempenho para variável resposta em estudo, sendo enquadrados no mesmo grupo (Tabela 4).

Lui et al. (2003) estudaram a produção de quitinase por *Verticillium lecanii* F091 usando fermentação submersa, obtendo neste trabalho a atividade quitinolítica de 9,95 mU/mL em um meio de cultura otimizado, com volume de cultura de 200 mL, agitação de 150 rpm e temperatura de 24°C cultivado em incubador rotativo. Além disso, concluíram que a taxa de agitação e o pH foram os fatores mais significativos para a produção de quitinase, no entanto,

as taxas de agitação e aeração poderiam modificar a concentração de oxigênio dissolvido afetando diretamente no crescimento do *Verticillium lecanii* e na produção de quitinase.

Tabela 4 - Produção de quitinase por meio de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG, avaliados pelo índice enzimático (IE). UFCG, Sumé, PB, 2015.

Genótipos	IE
CDSA-097	18,00a ⁽¹⁾
CDSA-098	17,67^a
CDSA-111	14,83^a
CDSA-109	11,03b
CDSA-115	7,57c
CDSA-114	7,50c
CDSA-113	7,43c
CDSA-110	0,00d
CDSA-106	0,00d
CDSA-071	0,00d

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Construída com os dados da pesquisa

Ainda por meio do critério IE, o genótipo CDSA-109, apresentou atividade quitinolítica, no entanto, em nível intermediário com relação ao primeiro (Tabela 4). Os genótipos CDSA-115, CDSA-114 e CDSA-113, representam 30% dos isolados fúngicos analisados, e pelo critério adotado estão aptos a serem potenciais produtores da enzima estudada. Entretanto não possuem o mesmo potencial do primeiro e do segundo grupo, que apresentaram desempenho superior em ordem decrescente, respectivamente, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (Tabela 4). Esse registro corrobora com os dados obtidos por Silva et. al. (2015) em seu trabalho que analisou a atividade celulolítica de actinobactérias da região semiárida do

estado do Ceará, especificamente da cepa UB-05-R1, previamente identificada como do gênero *Streptomyces* (IE = 6,9).

Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) avaliaram em seu estudo a atividade de celulase por meio de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, e observaram que os fungos *Penicillium herquei* e *Trichoderma harzianum* apresentaram valores de Índice Enzimático próximo aos registrados no presente trabalho. Comparando os trabalhos citados anteriormente com o presente estudo, os isolados fúngicos CDSA-115, CDSA-114 e CDSA-113 demonstraram equivalente desempenho quanto à atividade enzimática quitinolítica e celulolítica.

Os demais genótipos (30% dos isolados fúngicos), CDSA-110, CDSA-106 e CDSA-071, não atenderam os requisitos necessários exigido no presente trabalho para a produção de quitinase em meio sólido, ficando abaixo do ponto de referência. Neste caso, estes genótipos estão enquadrados no grupo que não possuem produtividade da atividade quitinolítica e não apresentam características de interesse industrial para o seguimento de controle biológico de pragas (Tabela 4).

De maneira geral, quando consideramos todos os 117 isolados fúngicos da coleção, 5,98% dos genótipos foram selecionados como potenciais produtores da enzima quitinase. É importante evidenciar que nesta coleção os isolados fúngicos não foram identificados segundo a taxonomia e com isso os presentes resultados evidenciados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade podem indicar a presença de 4 grupos distintos com genótipos pertencentes ao mesmo gênero e espécie. Isso leva ao questionamento quanto à presença de variabilidade genética na população em estudo, pois os 10 genótipos analisados podem ser reduzido, no mínimo, há apenas 4 classificados fúngicos.

Enfim, a relação entre a estimativa do coeficiente de variação genética e ambiental e a herdabilidade no sentido amplo foram altas para o IE, demonstrando a eficiência do método empregado para a seleção de genótipos promissores para a produção de quitinase, condicionando, assim, a classificação desses quanto à produção dessa enzima para aplicação no controle biológico de pragas.

6 CONCLUSÃO

A relação entre a estimativa do coeficiente de variação genética e ambiental e a herdabilidade no sentido amplo foram altas para o índice Enzimático, demonstrando a eficiência do método empregado para a seleção de genótipos com maior potencial para produção de quitinase.

De maneira geral, quando consideramos todos os 117 isolados fúngicos da coleção 5,98% dos genótipos foram selecionados como potenciais produtores da enzima quitinase.

Os isolados fúngicos CDSA-097, CDSA-098 e CDSA-111 foram selecionados para estudos que possam promover a otimização do processo de produção da enzima quitinase.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 1163, 1998.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: (Ed). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, p.69-110, 2008.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversidade e aplicações de fungos endofíticos isolados de plantas tropicais. In: GANGULI, B. N.; DESMUCH, S. K. *Fungi: Multifaceted Microbes* New Dehli: Anamaya Publication, p. 189-207, 2006.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In **Manual de Fitopatologia, Princípios e conceitos** (BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L., eds). 3ª ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 1, p. 717-27, 1995.
- CROCOMO, W. B. **Manejo integrado de pragas**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1990.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. S. C. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. v.2. 586p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2004. 480p.
- DE BACH, P. **Biological control of insect pests and weeds**. New York: Reinhold, p. 844, 1964.

DE BACH, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. cambridge: Cambridge University. Press, 1991.

DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C; SOUZA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World JMicrobiolBiotechnol**, v.16, p.383-86, 2000.

DONZELLI, B. G. G.; OSTROFF, G.; HARMAN, G. E. Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydrate Research* 338, p. 1823-1833, 2003.

FARIA, M. R. de; MAGALHÃES, B. P. **O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, nº 22, setembro/outubro, 2001.

FERRÃO, R. G. et. al. **Parâmetros genéticos em café Conilon**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.43, n.1, p.61-69, jan. 2008.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica** – Ciências Agrárias e Biológicas v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

FLACH, J; E. P.; P. J. **What's new in chitinase research?** *Experientia*48 . p. 701-716, 1992.

GOODAY, G. W.; HUMPHREYS, A. M.; MCINTOCH, W. H. in: MUZARELLI, R. A. A.; JEUNNIAUX, C.; GOODAY, G.W. **Chitin in Nature and Technology**, **Plenum Press**, New York, 1986.

HAMBLETON, E. J. A broca do algodoeiro do Brasil *Gasterocercoles brasiliensis* Hambleton (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 47-73, 1937.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L.**The use of solid media for detection of enzymes production by fungi**. *Mycologia*, New York, v. 39, n.2, p. 235 – 251, Feb. 2006.

HARMAN, G. E.; HAYES, C.K .; LORITO, R.M.; DIPIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. **Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase**. *Mol Plant Pathol*. p. 313-318, 1993.

JUNIOR, M. E. **Controle biológico de insetos pragas**. I Seminário Mosaico Ambiental: Olhares sobre o ambiente. Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

JUNQUEIRA, N. T. V.; PINHEIRO, E.; ALVES, R. T.; CELESTINO FILHO, P.; PEREIRA, A. V.; OLIVEIRA, M. A. S.; FIALHO, J. F. & GASPAROTTO, L. **Controle biológico do percevejo-de-renda (*Leptopharsa heveae* Drake e Poor) em seringais de cultivo**. Circular Técnica nº 3. Planaltina, Embrapa Cerrados. p. 30, 1999.

KERN, M. F. **Expressão de uma quitina de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotianatabacum*: obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas**. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, p. 85, 2003.

KHACHATOURIANS, G. G. **Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi**. In: The Mycota VI: Human and Animal Relationships. Howard/Miller (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

KUMAR, M. N.V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, n.3, p.348-352, Mar. 1994.

LEHANE, M; ALLINGHAM P; WEGLIICKI, P. **Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans***. Cell Tissue Res. p. 375-384, 1996.

LIU, B.; KAO, P.; TZENG, Y.; FENG, K.; **Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation**. Enzyme and microbial technology 33, p. 410-415, 2003.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de micro-organismos no Brasil. IN: MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 15-28, 2009.

LORITO, M. **Chitinolytic enzymes and their genes. In: Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications** (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol 2, p. 73-99, 1998.

LORITO, M.; HARMAN, G.E; HAYES, C. K; BRODWAY, R. M; TROSMO, A.; WOO, S. L; PIETRO, A. **Chitinolytic enzymes produced by Trichoderma harzianum, antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase.** *Phytopathology*, v. 83, p. 302-07, 1994.

MATSUO, Y.; KURITA, M.; PARK, J.K.; TANAKA, K.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; e MATSUDA, H. Purification, characterization and gene analysis of N-acetylglucosaminidase from *Enterobacter* sp. G-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n.7, p. 1261-1268, 1999.

MELO, A. F. de. **Avaliação dopotencial inseticida da proteína recombinante RCV2935 purificada da bactéria *Chromobacterium violaceum* sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH).** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, p.45, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico.** Jaguariúna, SP: EMBRAPA, v.1. p. 262, 1998.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, V. 3, p.308, 2000.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos.** Jan / Jun, 2009.

NOGAWA, M.; TAKAHASHI, H.; KASHIWAGI, A.; OHSHIMA, K.; OKADA, H.; MORARIKAWA, Y. **Purification and characterization of exo- β -D-Gucosaminidase from a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7,** *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, nº. 3, p. 890-895, 1998.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, T. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A .F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas,

Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, out./dez, 2006.

PASCOA, V; OLIVEIRA, P. L; DANSA-PETRESKI, M; SILVA, J. R; ALVARENGA, P. H; JACOBS-LORENA, M; LEMOS, F. J. A. 2002. ***Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interactions with heme during blood digestion**. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 517-523.

PATIL, R. S.; GHOR MADA, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: na exploration. **Enzyme and Microbial Technology**. New York, v.6, n. 7, p. 473-483, 2000.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Review: Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 473, 2000. São Paulo: Sarvier, 1995.

PAULA JÚNIOR, T. J.; MORANDI, M. A. B. ; ZAMBOLIM, L.; SILVA, M.B. **Controle alternativo de doenças de plantas: histórico**. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de ; PALLINI, A. (Ed). Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG; CTZM. p.135-162 , 2005.

RAMALHO, F. S.; JESUS, F. M. M.; BLEICHER, E. **Manejo integrado de pragas e viabilidade do algodoeiro herbáceo no Nordeste**. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE INSETOS, Campinas. Anais. Campinas: SEB/FUNDAÇÃO CARGILL. p. 112-123,1989.

RINAUDO, M. **Chitin and chitosan: properties and applications**. Progress in Polymer Science, New York, v. 31, n. 7,p, 603-632, 2006.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas**. 2ª ed. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 269, 2007.

SAHAI, A. S; MANOCHA, M. S. **Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite infection**. *FEMS Microbiol Rev* 11, p. 317-338, 1993.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements. Release 8. Cary: SAS Institute, 2001.

SHAHABUDDIN, M; LEMOS, F. J; KASLOW, D. C; JACOBS-LORENA, M. **Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*.** *Infect Immun.* p. 739-743, 1996.

SHAO, L; DEVENPORT, M; JACOBS-LORENA, M. **The peritrophic matrix of hematophagous insects.** *Insect Biochem Physiol,* p.119-125, 2001.

SILVA FILHO, R. C. **Produção de quitosanase por *Aspergillus ochraceus* em cultivo descontínuo.** Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Natal/RN, 2005.

SILVA, L. J. da. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango (*Fragaria x ananassa*) por linhagem *Streptomyces araujoniae* sp.** 2013. 97p. Dissertação (Mestrado em ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

SPINDLER-BARTH, M. **Hormonal regulation metabolism in insect cell lines. In Chitin Enzymology.** RAA Muzzarelli, ed European Chitin Society, Italy. p. 75-82, 1993.

St. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARLEY, 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, 1986b.

STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de micror-ganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus eros* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 382-385, out./dez. 1998.

VALICENTE, F. H. **Controle biológico de pragas com entomopatógenos.** Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970. Sete Lagoas - MG. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.30, n.251, p.48-55, jul./ago, 2009.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 486, 1992.