**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Riqueza e alterações morfofisiológicas associadas à infecção por vírus de
RNA de fita dupla no fungo entomopatogênico
*Metarhizium anisopliae***

Viviane Santos

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

Viviane Santos
Licenciada em Ciências Biológicas

**Riqueza e alterações morfofisiológicas associadas à infecção por vírus de RNA de fita
dupla no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Santos, Viviane

Riqueza e alterações morfofisiológicas associadas à infecção por vírus de RNA de fita dupla no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* / Viviane Santos. - Piracicaba, 2013.
105 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Controle microbiano 2. Controle de pragas 3. Fungos entomopatogênicos
4. Micovírus 5. Virulência 6. Vírus de RNA I. Título

CDD 589.2
S237r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao único que é digno de toda a honra e toda a glória

Dedico.

À minha família, especialmente, aos meus pais Myrian Mazzini dos Santos e José Alves dos Santos (in memoriam)

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz pelas oportunidades oferecidas.

Ao professor Dr. Italo Delalibera Júnior pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelos ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/ USP pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, especialmente ao professor Fernando Luis Cênsoli por disponibilizar equipamentos e materiais do Laboratório de Interações em Insetos da ESALQ/ USP para o desenvolvimento de parte desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/ USP pela troca de conhecimentos e experiências.

À técnica Solange Aparecida Vieira Barros pelo apoio na condução dos experimentos e por toda a experiência e conhecimentos compartilhados ao longo destes anos.

Aos amigos do Departamento de Entomologia da ESALQ/ USP pelos momentos de convivência e pelos valiosos ensinamentos.

À professora Maria Silvia Viccari Gatti do Departamento de Biologia da UNICAMP pelos ensinamentos e por disponibilizar o Laboratório de Virologia para a realização de parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos verdadeiros amigos.

“Não ganhe o mundo e perca sua alma; sabedoria é melhor que prata e ouro.”

Bob Marley

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Utilização do fungo <i>Metarhizium</i> para o controle de pragas.....	19
2.2 Vírus de RNAfd associados aos fungos entomopatogênicos	23
2.3 Características dos micovírus	24
2.4 Efeitos dos micovírus aos fungos	27
2.5 Formas de detecção dos micovírus.....	29
2.6 Formas de eliminação dos micovírus	30
Referências	31
3 VÍRUS DE RNA DE FITA-DUPLA EM ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Metarhizium anisopliae</i>	37
Resumo.....	37
Abstract.....	37
3.1 Introdução.....	37
3.2 Material e métodos	39
3.2.1 Multiplicação e armazenamento de isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	39
3.2.2 Extração dos ácidos nucleicos dos vírus	40
3.2.3 Identificação das espécies de <i>Metarhizium</i>	41
3.3 Resultados.....	42
3.3.1 Detecção de vírus de RNAfd em isolados de <i>Metarhizium</i>	42
3.4 Discussão.....	44
Referências	47
4 EFEITOS DA ELIMINAÇÃO DE VÍRUS DE RNAfd NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>Metarhizium anisopliae</i>	51
Resumo.....	51
Abstract.....	51
4.1 Introdução.....	52
4.2 Material e Métodos.....	53
4.2.1 Obtenção de isolados com e sem vírus de RNAfd	53
4.2.2 Tratamento com ciclohexamida visando à eliminação dos vírus nos fungos.....	54

4.2.3 Cultivo monoconidial e transferência de ponta de hifas visando a eliminação dos vírus nos fungos	55
4.2.4 Extração de RNAfd e eletroforese para a detecção dos micovírus	56
4.2.5 Crescimento micelial e produção de conídios em colônias de <i>M. anisopliae</i> ESALQ 1256 com e sem micovírus.....	57
4.2.6 Virulência de <i>M. anisopliae</i> com e sem micovírus contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	57
4.2.7 Tolerância de <i>M. anisopliae</i> com e sem micovírus ao calor	58
4.2.8 Tolerância de <i>M. anisopliae</i> com e sem micovírus aos raios ultravioletas.....	58
4.2.9 Análises dos resultados	59
4.3 Resultados	59
4.3.1 Tratamento com ciclohexamida visando à eliminação dos vírus nos fungos	59
4.3.2 Cura dos micovírus com cultivo monoconidial e transferência de ponta de hifas.	61
4.3.3 Produção de conídios e crescimento micelial em colônias de <i>M. anisopliae</i> ESALQ 1256 com e sem micovírus.....	65
4.3.4 Virulência de <i>M. anisopliae</i> ESALQ 1256 com e sem micovírus contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	66
4.3.5 Tolerância de <i>M. anisopliae</i> ESALQ 1256 com e sem micovírus ao calor	67
4.3.6 Tolerância de <i>M. anisopliae</i> ESALQ 1256 com e sem micovírus à irradiação ultravioleta	68
4.4 Discussão	72
Referências.....	77
5 INFLUÊNCIA NUTRICIONAL NA REPLICAÇÃO DE VÍRUS DE RNA DE FITA DUPLA EM <i>Metarhizium anisopliae</i>	83
Resumo.....	83
Abstract.....	83
5.1 Introdução	84
5.2 Material e métodos.....	85
5.2.1 Produção de conídios e abundância de vírus de RNAfd em colônias do isolado <i>Metarhizium anisopliae</i> ESALQ PL26 com formação de setores	85
5.2.2 Influência da qualidade nutricional do meio de cultivo sobre a abundância de vírus de RNAfd em isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	86
5.3 Resultados e discussão	91

5.3.1 Produção de conídios e abundância de vírus de RNAfd em colônias de <i>M. anisopliae</i> com formação de setores	92
5.3.2 Influência da qualidade nutricional do meio de cultivo sobre a abundância de vírus de RNAfd em isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	95
5.4 Discussão	98
Referências	101
6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	105

RESUMO

Riqueza e alterações morfofisiológicas associadas à infecção por vírus de RNA de fita dupla no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

O Brasil é o país líder no uso do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle pragas agrícolas. Pouco se conhece sobre a diversidade e o impacto dos micovírus em *M. anisopliae* sensu stricto. Este trabalho mostra a riqueza dos micovírus associados a isolados de *M. anisopliae* da coleção de entomopatógenos da Universidade de São Paulo, usinas sucroalcooleiras e produtos microbianos à base do entomopatógeno. RNAfd foram encontrados em 55% dos 36 isolados de *Metarhizium* e apresentaram 16 diferentes padrões eletroforéticos consistindo de 3 a 18 bandas de RNAfd em gel de poliacrilamida. RNAfd não foram detectados em nenhum dos produtos comerciais utilizados no presente estudo. Os diferentes padrões de vírus encontrados nos isolados aqui estudados, aparentemente, não têm relação com os locais onde foram coletados. O inibidor de síntese protéica ciclohexamida não foi eficiente na eliminação dos vírus de RNAfd em nenhum dos isolados de fungos testados. Colônias dos isolados de *M. anisopliae* ESALQ 866, *M. anisopliae* ESALQ 1256 e *M. anisopliae* CTC F8 foram curadas por meio do cultivo monoconidial ou isolamento de ponta de hifas. Alguns segmentos do isolado *M. anisopliae* PL26 foram perdidos após o subcultivo de ponta das hifas. Colônias de *M. anisopliae* ESALQ PL26 obtidas por meio do cultivo monoconidial ou subcultivo de ponta de hifas apresentaram grande variabilidade morfológica, no entanto, essa variação não foi correlacionada com a presença de micovírus. Colônias isogênicas de *M. anisopliae* ESALQ 1256 mostraram diferenças no crescimento, na produção de conídios e na virulência, no entanto, essas diferenças não foram associadas à presença de RNAfd. Não foram observadas diferenças na tolerância aos raios ultravioleta e ao calor entre as colônias de *M. anisopliae* ESALQ 1256, com e sem vírus de RNAfd. Colônias oriundas de setores formados no isolado *M. anisopliae* PL26 produziram menor quantidade de conídios e apresentaram menor quantidade de vírus RNAfd em comparação com as colônias oriundas de outras regiões das colônias originais com características normais. A repicagem sucessiva dos isolados de *M. anisopliae* ESALQ PL26, ESALQ 1256, CTC F8 e CTC F15, infectados por diferentes vírus de RNAfd, nos meios de cultura BDA, SDAY e meio de arroz, bem como a passagem dos fungos em larvas de *Tenebrio molitor*, em geral, não afetaram a replicação dos micovírus.

Palavras-chave: Micovírus; controle microbiano; Virulência; Tolerância a UV; Tolerância ao calor; Nutrição de fungos

ABSTRACT

Richness and morphophysiological changes associated with infection by double-stranded RNA virus in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*

Brazil is the leading country in the use of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against agricultural pests. Little is known about the diversity and the impact of mycovirus in *M. anisopliae* sensu stricto. This study shows the richness of mycovirus associated with *M. anisopliae* isolates from the collections of entomopathogens of the University of São Paulo, from sugar-alcohol factories and microbial based products. dsRNA were found in 55% of the 36 *Metarhizium* isolates and showed 16 different electrophoretic patterns consisting of 3 to 18 dsRNA bands in polyacrylamide gels. dsRNA was not detected in any of the commercial products used in this study. The different viral patterns found in the isolates studied here apparently have no relation to the locations where they were collected. The inhibitor of protein synthesis cycloheximide culture was efficient in eradicating dsRNA virus from fungi. Colonies of isolates of *M. anisopliae* ESALQ 866, *M. anisopliae* ESALQ 1256 and *M. anisopliae* F8 were cured by monoconidial or by hyphal tip isolation of. Some segments of the *M. anisopliae* PL26 isolate were lost following hyphal tip subculture. Colonies both from monoconidial culture and hyphal tip subculture of *M. anisopliae* ESALQ PL26 showed great morphological variability; however, this variation was not correlated with the presence of mycoviruses. Isogenic colonies of *M. anisopliae* ESALQ 1256 showed differences in growth, conidia production and virulence; however, these differences were not associated to the presence of the dsRNA. No difference was observed regarding tolerance to ultraviolet rays and heat among the colonies of *M. anisopliae* ESALQ 1256, with and without the dsRNA virus. Sectors formed in the isolate *M. anisopliae* PL26 produced a smaller number of conidia and fewer dsRNA virus in comparison to the original colonies with normal characteristics. The repeated subculture of isolates of *M. anisopliae* ESALQ PL26, ESALQ 1256, CTC F8 and CTC F15, infected by different virus of dsRNA, in the PDA, SDAY culture media and in rice, as well as the fungi passage in larvae of *Tenebrio molitor*, in general, did not affect the replication of the mycovirus.

Keywords: Mycovirus; microbial control; Virulence; UV tolerance; Heat tolerance; Fungi nutrition

1 INTRODUÇÃO

O sucesso do uso de *Metarhizium anisopliae* para o controle de pragas no Brasil é representado pelo grande volume de produção e comercialização deste agente de controle por várias empresas de biopesticidas privadas e laboratórios ligados às usinas de cana-de-açúcar que produzem os fungos para consumo próprio.

Um dos problemas enfrentados na utilização dos agentes de controle microbiano, em especial, do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* para o controle de pragas, é a inconstância na eficiência de controle. No Brasil, a produção em larga escala, transporte e aplicação de micopesticidas ainda apresentam vários problemas que têm limitado o aumento do uso do controle microbiano com fungos, não só na cana-de-açúcar, mas em várias culturas.

Para serem utilizados no controle microbiano como biopesticidas, os fungos entomopatogênicos precisam estar disponíveis em grande quantidade e apresentar boa qualidade. Conídios de fungos com qualidade são obtidos com medidas tomadas antes mesmo do processo de produção. Para escolher o isolado adequado é necessário realizar uma seleção prévia, sendo que uma das características mais importante de um isolado é uma alta virulência em relação à praga-alvo. Outra importante característica é a produção de conídios. É fundamental que o isolado utilizado na produção seja capaz de produzir grande quantidade de conídios. A tolerância ao calor e aos raios UV também devem ser levadas em consideração especialmente nas regiões tropicais Brasileiras.

Os micovírus que infectam o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* ainda não foram caracterizados molecularmente e poucos estudos foram realizados para identificar seus efeitos nos fungos. Alguns estudos demonstraram que a presença de vírus de RNAfd em algumas espécies de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosoroseus* e *Metarhizium* spp. pode resultar em alterações morfofisiológicas como a redução na produção de conídios, a redução do crescimento micelial, alterações de coloração e, em alguns casos na redução da virulência do entomopatógeno.

Este trabalho teve como principais objetivos estudar a diversidade dos vírus de RNAfd em isolados brasileiros de *Metarhizium* spp., bem como, identificar formas de eliminação dos vírus a fim de estudar os possíveis efeitos nos fungos e suas conseqüências para o controle microbiano de pragas. Outro objetivo foi avaliar os efeitos das condições nutricionais para o cultivo de *M. anisopliae* na replicação dos micovírus.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Utilização do fungo *Metarhizium* para o controle de pragas

Os fungos do gênero *Metarhizium* são amplamente distribuídos na natureza e podem ser facilmente encontrados no solo, onde sobrevivem por longos períodos. Os insetos atacados tornam-se duros e cobertos por uma camada pulverulenta de conídios. No final da conidiogênese, o cadáver pode mostrar tons de verde que variam de claro a escuro, acinzentados ou ainda esbranquiçados com pontos verdes. Os conídios são normalmente uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre conidióforos simples, que justapostos, resultam em uma massa regular sobre o inseto. As fiálides clavadas ou cilíndricas são originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra (ALVES et al., 1998). Os conídios e conidióforos são os principais caracteres taxonômicos utilizados na identificação de espécies. Recentemente, além dos caracteres morfológicos, têm sido utilizadas técnicas moleculares para separar as diferentes espécies de *Metarhizium*, sendo que a mais confiável é o seqüenciamento gênico de determinadas regiões do genoma do fungo (ITS, EF, etc.).

No passado, apenas duas espécies do gênero *Metarhizium* eram conhecidas, *M. flavoviride* e *M. anisopliae*, sendo a última dividida em var. *majus* ou var. *anisopliae* (TULLOCH, 1976). Recentemente, Bischoff et al. (2009), fizeram significativas alterações na classificação do complexo *M. anisopliae*. Os autores elevaram ao nível de espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. brunneum* e descreveram outras duas novas espécies, *M. globosum* e *M. robertsii*. As espécies *M. anisopliae* e *M. robertsii* apresentam morfologia idêntica, sendo necessário o conhecimento dos caracteres moleculares para uma identificação correta.

Com base nos resultados dos estudos de Bischoff et al. (2006 e 2009) foi determinado que a região 5' do gene para o fator de alongamento da tradução (EF-1 α) é a região mais informativa para o uso rotineiro na identificação de espécies dentro do gênero. Esta região exige apenas dois primers e é facilmente amplificada. Apesar deste segmento não ser suficiente para resolver completamente a genealogia de *Metarhizium*, é atualmente o locus mais apropriado para o diagnóstico de grupos terminais, inclusive para outros complexos de espécies fúngicas (GEISER et al., 2004).

No Brasil, vários isolados de *Metarhizium* spp. têm sido utilizados para o controle de insetos, especialmente, cigarrinhas na cultura da cana-de-açúcar e pastagens. Esses isolados

normalmente são mantidos em bancos de entomopatógenos de empresas de pesquisa como a EMBRAPA, universidades ou nas próprias empresas privadas e usinas sucroalcooleiras que produzem fungos para consumo próprio.

A maioria dos programas de controle microbiano com fungos estabelecidos na América Latina utiliza as estratégias de incrementação e introdução inundativa, nas quais o patógeno é aplicado em concentrações relativamente elevadas, na forma de um produto microbiano (micoinseticida). Assim, os métodos de produção massal de fungos devem visar à obtenção econômica de grandes quantidades do patógeno, para atender às necessidades imediatas dos produtores (ALVES et al., 2008). Vários produtos à base de *M. anisopliae* são comercializados para o controle de pragas em toda a América Latina (Tabela 1).

Tabela 1 - Produtos à base de *Metarhizium anisopliae* comercializados na América Latina (ALVES et al., 2008) (Continua)

Produto	Praga visada	Empresa/ Local
Agobiocontrol	Coleoptera,	Agobiocontrol, Colômbia
<i>Metarhizium</i> 50	Lepidoptera	
Bio-Blast	Cupins	Eco Science, EUA*
Biocontrol PM	Cercopidae	Agroceres, Brasil
BioCerto	Cercopidae	BioCerto, Brasil
Biomax	Cercopidae	Labormax, Brasil
Biorhizium	Hemiptera e Coleoptera	Hortitec Colombia S.A., Colômbia
Biotech	Cercopidae	Biotech, Brasil
Cobican–	<i>Aeneolamia</i> sp.	Probiagro, Venezuela
DeepGreen	<i>Ancognatha</i> e <i>Empoasca</i>	LST S.A. Colômbia
Dextruxin	Diversas	Laverlam S.A., Colômbia
Fitosan-M	Gafanhotos	Ceseveg, México
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	BioCana, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	BioCerto, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	BTA, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	Fitossan, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	Prefeitura de São José do Rio Claro, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	BioAgro Controle Biológico, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	Empaer, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	Funan, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	Pesagro-Rio, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	<i>Aeneolamia</i> sp.	Nihert, Trinidad y Tobago
<i>M. anisopliae</i>	Diversas	Edafon, Colômbia
<i>M. anisopliae</i> ¹	Cercopidae	Esalq/USP, Brasil
<i>M. anisopliae</i> ¹	Cercopidae	IPA, Brasil
<i>M. anisopliae</i>	Cercopidae	Asplana, Brasil
MET-92	Diversas	Agrícola El Sol, Guatemala

Tabela 1 - Produtos à base de *Metarhizium anisopliae* comercializados na América Latina (ALVES et al., 2008) (Conclusão)

Produto	Praga visada	Empresa/ Local
Metabiol	Cercopidae	Tecnicontrol, Brasil
Metabiol	Cercopidae	Empresa Prave Agrobiotécnica S.A., Venezuela
Metadieca	Cercopidae	Laica/ Dieca, Costa Rica
Metaquino ¹	Cercopidae	Codecap, Brasil
Metarhisa WP	Cercopidae	Nicarágua Sugar State, Nicarágua
Metaril	Diversas	Productos Biologicos Perkins Ltda., Colômbia
Metarril WP E9	Cercopidae	Itaforte Bioprodutos, Brasil
Metarril SC 1037		
Metarriz Biocontrol	Cercopidae	Biocontrol, Brasil
Metasave-11	Diversas	Ecosave/ Inisav, Cuba
Meta-Sin	Diversas	Agrobionsa, México
Methavida	Cercopidae	Methavida Controle Biológico Agrícola, Brasil
Metazam	Diversos	CCBC Zamorano, Honduras
Mirabiol	<i>H. hampei</i>	UCA Miraflor, Nicarágua
Probiomet	Coleoptera, Lepidoptera	Probioma, Bolívia
TechnoGreen	Hemiptera	Biolab S.A., Costa Rica
<i>Metarhizium</i>		
Salivasave ¹	Hemiptera	Produtos Ecológicos, Guatemala
Zero-QK	Baratas	Agrícola El Sol, Guatemala

¹ Atividades de produção e comercialização encerradas.

* Produtos importados

O fungo é aplicado no campo na forma de conídios, seja em suspensão aquosa, junto ao substrato (arroz), ou em óleo. As condições ideais para a aplicação do entomopatógeno são alta umidade atmosférica e temperatura amena (PINTO et al., 2006). Contudo, para que os resultados de controle sejam bons, várias características devem ser observadas como, a

qualidade dos fungos produzidos (quantidade, virulência, estabilidade no campo, tolerância aos raios UV, etc.), os métodos de armazenamento e a tecnologia de aplicação.

2.2 Vírus de RNAfd associados aos fungos entomopatogênicos

Dentre os vários fatores que podem interferir na qualidade dos fungos entomopatogênicos produzidos, tem sido citado por alguns autores a ocorrência de vírus de RNA de fita dupla (RNAfd). Schrank et al. (1992) detectaram pela primeira vez partículas virais em isolados de *M. anisopliae*. No ano de 1996, Bogo e colaboradores constataram a ocorrência de viroses de RNAfd em micélios e esporos nesta espécie de fungo.

Melzer e Bidochka (1998) realizando um estudo com 73 isolados de *M. anisopliae*, verificaram a presença de vírus em 28 deles (38,4%). No mesmo estudo, os autores verificaram que quando comparados isolados isogênicos do fungo (com e sem os vírus), os isolados livres dos vírus apresentaram maior virulência, maior crescimento micelial e maior produção de conídios do que as linhagens infectadas. Resultados semelhantes foram verificados por Tiago et al. (2004) que comparando isolados isogênicos de *M. anisopliae* var. *acridum* com e sem vírus de RNAfd observaram que os isolados livres das partículas virais apresentaram maior produção de conídios em comparação às linhagens infectadas.

Giménez-Pecchi et al. (2002) detectaram vírus do tipo RNAfd em alguns isolados de *M. anisopliae* e verificaram que aqueles livres de partículas virais apresentaram maior secreção de endoquitinases, que são enzimas importantes no processo de infecção dos fungos no tegumento dos insetos. De acordo com as características morfológicas e moleculares dos vírus, os autores classificaram estes como pertencentes às famílias *Totiviridae* e *Partitiviridae*.

Em estudos preliminares realizados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/ USP, constatou-se que isolados de *Metarhizium anisopliae* apresentam infecção por vírus de RNA de fita dupla. Entretanto, os efeitos destas viroses sobre os aspectos morfológicos e fisiológicos dos fungos não foram estudados (MACEDO, 2005).

2.3 Características dos micovírus

A presença dos micovírus, ou vírus que infectam os fungos, foi relatada pela primeira vez em cogumelos da espécie *Agaricus bisporus* (HOLLINGS, 1962). Posteriormente, foram encontrados também nas leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* (SWEENEY et al., 1976) e nos fungos filamentosos, *Cryphonectria parasitica* (DAY et al., 1977). No entanto, acredita-se que os micovírus da família Totiviridae possuem origens muito antigas no universo, e que os grupos de moléculas de RNAfd originais infectavam as células antes mesmo da divergência evolutiva entre os animais e os fungos. Essa teoria é suportada pelo fato de que os vírus encontrados no fungo fitopatogênico *Helminthosporium victoriae*, é mais aparentado com um vírus encontrado em protozoários do gênero *Leishmania* do que com os vírus das leveduras, indicando que estes, existiam antes da divergência entre os protozoários e os fungos (GHABRIAL, 1998).

Os vírus que infectam fungos são normalmente constituídos por uma cápsula protéica, o capsídeo, envolvendo o seu genoma que é formado por um ou mais segmentos de RNA de fita dupla (RNAfd) (MURPHY et al., 1995) (Figura 1). Já foram citados também vírus cujo genoma é formado por um segmento de RNA de fita simples infectando fungos, tais como, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FAUQUET et al., 2005) e cogumelos (REVILL et al., 1998). Outros vírus não apresentam o capsídeo, e sim, uma vesícula envolvendo o genoma, como é o caso dos vírus da família *Hypoviridae*, amplamente estudados devido a sua capacidade de causar hipovirulência no fungo fitopatogênico *Cryphonectria parasitica* (FAHIMA et al., 1993) (Figura 1). Vários micovírus não codificam as proteínas que formam o capsídeo, e, portanto, estes vírus não apresentam forma ou partículas, são moléculas nuas de RNAfd (NUSS, 2005; BARROSO; LABARÈRE, 1993; COMPEL et al., 1998).

Figura 1 - Forma dos vírus de RNAfd que infectam os fungos (NUSS, 2005)

Os micovírus são transmitidos na natureza intracelularmente por anastomose hifal e heterocariose (transmissão lateral), e são disseminados via esporos (transmissão em série) (Figura 2). Estes vírus não têm fase extracelular em seus ciclos de vida, mas apesar disto, a disseminação destes é ampla e ocorre na maioria dos táxons de fungos (GHABRIAL, 1998).

Figura 2 - Vias de transmissão de vírus de RNAfd entre os fungos (NUSS, 2005)

Os vírus que apresentam o seu genoma constituído por RNAfd são classificados nas famílias, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Reoviridae* e *Hypoviridae*. As principais características que diferenciam as famílias destes vírus é a organização do seu genoma, ou seja, o número de pares de bases e de segmentos que os constituem, o número e tamanho de virions (FAUQUET et al., 2005) (Tabela 2).

Tabela 2 - Principais características utilizadas para diferenciar as famílias de vírus de RNAfd associados à fungos (adaptado de FAUQUET et al., 2005)

Família	Número de segmentos	kpb	Número de virions	Tamanho dos virions
<i>Totitiviridae</i>	1	4.6-7.0	1	40 nm
<i>Partitiviridae</i>	2	1.4-3.0	2	30-40 nm
<i>Chrysoviridae</i>	4	2.4-3.6	4	30-40 nm
<i>Reoviridae</i>	10, 11 ou 12	0.8-3.9	1	80 nm
<i>Hypoviridae</i>	1	9-13	vesícula	50-80 nm

Como todos os vírus, os micovírus são unidades submicroscópicas e parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, eles dependem das células dos fungos hospedeiros para a sua multiplicação. As partículas dos vírus são produzidas a partir da montagem de componentes pré-moldados, o que diferem esses elementos dos demais seres vivos que

crecem a partir de um aumento na soma integrada de seus componentes e se reproduzem por divisão. As partículas de vírus (virions) não crescem ou se dividem; não têm a informação genética necessária para a geração de energia metabólica ou para síntese de proteínas (ribossomos) (CANN, 2005). Por estas e outras características, até hoje, os cientistas discutem se os vírus são ou não seres vivos (MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA, 2009).

Os micovírus de RNAfd são replicados no citoplasma nas células dos fungos (Figura 3) e não se inserem no núcleo ou no DNA dos hospedeiros, como ocorre com outros vírus. Cada segmento do RNA viral é transcrito separadamente para produzir RNAs mensageiros individuais monocistronicos, ou seja, que são transcritos de um único gene e codificam um único polipeptídeo (Cann, 2005). Após a replicação dos ácidos nucleicos e das proteínas dos capsídeos, as partículas virais são montadas no citoplasma dos fungos, unindo-se por afinidade, podendo ser em seguida transmitidas para outros fungos, por meio da anastomose, conforme esquematizado na figura 2.

Figura 3 - Representação esquemática do padrão de replicação de vírus de RNAfd (Adaptado de CANN, 2005)

O genoma dos vírus de RNAfd apresentam duas regiões principais, a região CP e a região RdRp. A região CP codifica as proteínas do capsídeo, enquanto que a região RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), é a região responsável pela replicação dos vírus de RNA (FAUQUET et al., 2005). Os vírus segmentados, como os da família *Reoviridae* apresentam vários segmentos que são responsáveis pela síntese das diferentes proteínas que constituem o seu capsídeo. Os vírus satélites encontrados nas leveduras *S. cerevisiae*, codificam também proteínas que não formam capsídeos, denominadas “proteínas ou toxinas killer”, com propriedades antibióticas.

Os vírus de RNA apresentam a taxa de mutação mais alta de todos os seres vivos, pois suas RdRp's não possuem atividade de revisão após a inserção de nucleotídeos durante a replicação de seus genomas (DRAKE, 1993; MALPICA et al., 2002). A recombinação genética também é considerada um dos maiores mecanismos agindo na evolução dos vírus, pois podem acontecer por meio da recombinação homóloga entre dois RNA's muito parecidos ou recombinação não-homóloga, entre dois RNA's com algum segmento complementar (ZACOMMER et al., 1995). Por isso, a variabilidade genética entre os diferentes vírus é muito grande, mesmo entre os vírus de uma mesma família ou hospedeiro.

2.4 Efeitos dos micovírus aos fungos

O número de trabalhos relacionados aos micovírus em fungos fitopatogênicos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. De maneira geral, os autores mencionam que estes vírus não afetam a biologia ou a fisiologia dos fungos, ou seja, são assintomáticos, mas o número de relatos associando efeitos negativos à infecção por vírus de RNAfd é crescente (ELLISTON, 1985; HAMMAR et al., 1989; CHEN et al., 1994; CHEN et al., 1996; AHN; LEE, 2001; VAN HEERDEN et al., 2001; CHU et al., 2002; GOLUBEV et al., 2003; CASTRO et al., 2003; VAN DIEPENINGEN et al., 2006; AOKI et al., 2009; URAYAMA et al., 2010; AMINIAN et al., 2011).

Como a maioria dos micovírus são latentes ou assintomáticos em seus hospedeiros, é provável de que os fungos e os seus vírus co-evoluíram e se adaptaram num grau considerável (GHABRIAL, 1998). A morte das células hospedeiras pode levar a eliminação viral, já que estes vírus não apresentam estruturas apropriadas para a infecção extracelular. Portanto, não são esperadas alterações drásticas que afetem a sobrevivência ou disseminação dos fungos devido às infecções por micovírus.

Na fitopatologia, alguns vírus de RNAfd são caracterizados como benéficos, pois, podem ser utilizados como agentes de controle biológico de determinados fungos que causam doenças em plantas cultivadas. Os fungos que contém infecção por estes vírus são multiplicados em laboratório e disseminados na natureza. Como os vírus podem ser passados via anastomose, como vimos na figura 1, os fungos infectados transmitem os vírus para os fungos sadios na natureza e desta forma reduzem os danos dos fungos às plantas. Por isso, nos últimos anos tem-se buscado isolados que apresentem infecção por vírus de RNAfd e que sejam capazes de causar hipovirulência nos fungos.

O exemplo clássico da utilização de um micovírus para o controle biológico de fungos é o do hipovírus de *Cryphonectria parasitica*. Este vírus da família *Hypoviridae* tem sido amplamente estudado e utilizado para o controle do fungo fitopatogênico *C. parasitica* que é o causador do cancro-do-castanheiro. As árvores infectadas com os fungos livres de vírus podem morrer devido às infecções, no entanto, quando os fungos estão infectados com os vírus, as lesões são bem menores, e não são capazes de ocasionar a morte das mesmas (SHAPIRA et al., 1991; HILLMAN et al., 1992; CHEN; NUSS, 1999; SMART et al., 1999; LINDER-BASSO et al., 2005).

Pesquisadores que trabalham nesta linha já desenvolveram inclusive um sistema baseado em cDNA infeccioso (genética reversa) para os membros da família de micovírus da família *Hypoviridae* que permitiu a análise de aspectos básicos dessa interação vírus-fungo-planta, incluindo interações vírus-hospedeiro, os mecanismos subjacentes à patogenicidade, silenciamento de RNA, entre outros (NUSS, 2005). Foi comprovado que a presença deste vírus em *C. parasitica* causa inúmeras alterações fisiológicas nos fungos, tais como menor produção de pigmentos, hipovirulência, menor crescimento e reprodução (VAN HEERDEN et al., 2001; CHEN et al., 1996; CHEN et al., 1994).

O meio de cultura e as condições nutricionais durante o cultivo também exercem forte influência sobre a virulência dos fungos. Em conídios de *M. anisopliae*. Shah et al. (2005) observaram que conídios mais virulentos foram obtidos quando o fungo foi cultivado no inseto hospedeiro (*Tenebrio molitor*), em meio de estresse osmótico (5,5% de ágar, 8% de glucose, 2% de peptona e 5,5% de cloreto de potássio), em meio com baixa relação carbono nitrogênio de 1:10 (0,6% de glucose, 1% de peptona e 2% de ágar) e em meios pobres em nutrientes (2% de ágar e 1% de extrato de levedura ou 2% de peptona), sendo a maior virulência apresentada por conídios cultivados em meio pobre com 1% de extrato de levedura. Adicionalmente observou-se que a virulência estava relacionada à maior expressão dos genes *pr1A*, *chyl* e *stel*. Já foi demonstrado também que o subcultivo em meios de culturas por

repetidas vezes pode reduzir a virulência dos fungos (SHAH et al., 2007). Entretanto, a influência das condições nutricionais e subcultivos na replicação dos vírus de RNAfd em *M. anisopliae* é desconhecida.

Efeitos positivos dos vírus de RNAfd também já foram relatados para os fungos fitopatogênicos. Em *Saccharomyces cerevisiae* os vírus produzem toxinas que são letais para outros isolados da mesma espécie (WICKNER, 1996). Um estudo recente demonstrou que a presença de vírus de RNAfd no fungo *Curvularia protuberata* aumentou a sua tolerância ao calor. Quando os vírus foram eliminados dos fungos, estes se tornaram mais sensíveis às temperaturas mais elevadas (MÁRQUEZ et al., 2007).

Os estudos relacionados aos micovírus entomopatogênicos são escassos. Assim como tem sido observado para os demais micovírus, a maior parte deles, não apresenta qualquer efeito aparente nos fungos. Os fungos entomopatogênicos, ao contrário dos fitopatogênicos, são benéficos, portanto, o principal interesse para a entomologia é verificar se de fato, estes vírus podem acarretar em prejuízos para a produção e eficiência dos fungos no controle de pragas e, nestes casos, eliminá-los quando necessário.

Melzer e Bidochka (1998) ressaltam que os trabalhos feitos com micovírus associados aos fungos entomopatogênicos, são realizados normalmente com isolados que foram obtidos de cadáveres infectados, ou seja, com fungos que foram capazes de causar infecção nos insetos e causaram a sua mortalidade. Os fungos que não foram capazes de infectar os insetos, dificilmente são estudados. Desta forma, a possibilidade de obter-se um fungo isolado de insetos com hipovirulência causada pelos micovírus é reduzida.

Contudo, como já foi mencionado, a diversidade destes vírus é relativamente grande, assim como, a taxa de mutação é alta, portanto, os efeitos dos micovírus aos fungos hospedeiros podem ser imprevisíveis.

2.5 Formas de detecção dos micovírus

Diferentes métodos de detecção de vírus de RNAfd em fungos têm sido utilizados. Alguns pesquisadores optam por fazer a extração dos ácidos nucléicos total, ou seja, extraem o DNA e RNA total, e, em seguida, realizam a digestão das moléculas de DNA e RNA de fita simples, por meio da utilização de enzimas (DNase, RNase, S1nuclease,) (BOGO et al., 1996, AZEVEDO et al., 2000, DALZOTO, et al., 2006, MARTINS et al., 1999).

Outros optam por utilizar metodologias para a extração específica de RNA de fita dupla, descartando no momento da extração os demais ácidos nucléicos (DNA e RNA de fita

simples) (MORRIS; DODDS, 1979, GILLINGS et al., 1993, ELIAS, COTTY, 1996, MELZER; BIDOCHKA, 1998). Neste tipo de extração é comum a utilização de fibras de celulose (CF-11), as quais apresentam afinidade por este ácido nucléico na presença de tampão e álcool. Adaptações foram feitas por outros autores a fim de facilitar este procedimento e garantir a detecção dos vírus de RNAfd (CASTILLO et al., 2011).

Os vírus são detectados por meio da visualização dos segmentos (ou do segmento único, no caso dos vírus da família Totiviridae ou vírus satélites), em gel após eletroforese. Alguns autores utilizam a eletroforese em gel de agarose para a visualização do RNAfd extraído (BOGO et al., 1996, ELIAS, COTTY, 1996, MELZER; BIDOCHKA, 1998, AZEVEDO et al., 2000, DALZOTO, et al., 2006, CHU et al., 2002), enquanto que outros, optam pelo gel de poliacrilamida que é mais indicado para a separação de moléculas pequenas de ácidos nucléicos (MORRIS; DODDS, 1979, FULBRIGHT, 1984, HAMMAR et al., 1989, HOWITT et al., 1995, CASTRO et al., 2003).

2.6 Formas de eliminação dos micovírus

A maioria dos processos de eliminação dos vírus nos fungos é muito trabalhosa. Alguns autores citam que o inibidor de síntese protéica ciclohexamida eliminou micovírus de fungos fitopatogênicos (ELIAS; COTTY, 1996; FULBRIGHT, 1984; BHATTI et al., 2011), bem como de fungos entomopatogênicos, como, *Metarhizium anisopliae* (MELZER; BIDOCHKA, 1998) e *Beauveria bassiana* (DALZOTO et al., 2006). Contudo, outros trabalhos mostraram que a ciclohexamida não foi eficiente para eliminar os micovírus (MARTINS et al., 1999; VAN DIEPENINGEN et al., 2006). É importante mencionar que a ciclohexamida é um composto não-específico e utilizado para o controle de vários organismos, inclusive, para a inibição de várias espécies de fungos, portanto, quando utilizados em doses altas pode interferir negativamente na fisiologia dos fungos.

Outras estratégias têm sido utilizadas para a obtenção de isolados isogênicos sem vírus de RNAfd. Uma delas é o cultivo monoconidial. Alguns autores mencionam que a transmissão via esporos, ou conídios, como mencionado na figura 1, pode não ocorrer em 100% dos casos. Então, a seleção de um esporo, ou conídio sem vírus de RNAfd, pode dar origem à colônias livres destes elementos (MARTINS et al., 1999; ELIAS; COTTY, 1996; LIMA et al., 2010; VAN DIEPENINGEN et al., 1997).

A transferência de ponta de hifas também é utilizada como uma estratégia de obtenção de colônias sem vírus de RNAfd. A técnica consiste em isolar um fragmento da hifa em

crecimento, e desta forma, se o fragmento selecionado não apresentar partículas ou ácidos nucleicos virais, as colônias formadas apresentarão as mesmas características genéticas do isolado original, porém, sem a infecção por micovírus.

Estudos demonstraram que os vírus foram parcialmente perdidos ou menos abundantes em setores (áreas da colônia em meio de cultura que apresenta características anormais) formados em fungos (MÁRQUEZ et al., 2007; VAN DIEPENINGEN et al., 1997). De acordo com Wang e colaboradores (2005), várias alterações morfológicas e fisiológicas ocorrem nos setores e são sinais de degeneração dos fungos que estão sob forte estresse oxidativo. Estes setores são comuns em *Metarhizium anisopliae*, entretanto, a participação dos vírus nas mudanças morfofisiológicas, bem como a estabilidade dos vírus em setores dos fungos desta espécie ainda não foram estudadas.

Referências

- AHN, II-P.; LEE Y.H. A viral Double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, n.4, p. 496-507, Apr., 2001.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998, cap. 11, p. 289-382.
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414p.
- AMINIAN, P.; AZIZOLLAH, A.; ABBAS, S.; NASER, S. Effect of double-stranded RNAs on virulence and deoxynivalenol production of *Fusarium graminearum* isolates. **Journal of Plant Protection Research**, Poland, v. 51,n.1, p. 29-37, Jan., 2011.
- AOKI, N.; MORIYAMA, H.; KODAMA, M.; ARIE, T.; TERAOKA, T.; FUKUHARA T. A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. **Virus Research**, London, v. 140, p. 179-187, Mar., 2009.
- BARROSO, G.; LABARÈRE, J. Transcription of naked double-stranded RNA molecules in a fraction containing large vesicles plus mitochondria from the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. **Journal of General Microbiology**, Inglaterra, v. 139, p. 287-293, Feb., 1993.
- BHATTI, M.F.; JAMAL, A.; PETROU, M.A.; CAIRNS, T.C.; BIGNELL, E.M.; COUTTS, R.H.A. The effects of dsRNA mycoviruses on growth and murine virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics Biology**, San Diego, v. 48, p. 1071-1075, Nov., 2011.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, n. 4, p. 512-530, July/Aug, 2009.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 98, p. 737-745, Sep./ Oct., 2006.

BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; GIMENEZ, M.P.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 100, p. 1468-1472, Sept., 1996.

CANN, A.J. **Principles of molecular virology**. 2.ed. Cidade: University of Leicester, 2005. 315p.

CASTILLO, A.; COTTET, L.; CASTRO, M.; SEPÚLVEDA, S. Rapid isolation of mycoviral double-stranded RNA from *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Virology Journal**, London, v. 38, n.8, p. 4-7, Jan., 2011.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; CASTILHO, A. A Double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 228, p. 87-91, Nov., 2003.

CHEN, B.; CHEN, C.; BOWMAN, B.H.; NUSS, D.L. Phenotypic changes associated with wild-type and mutant hypovirus RNA transfection of plant pathogenic fungi phylogenetically related to *Cryphonectria parasitica*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 86, n.3, p. 301-310, 1996.

CHEN, B.; CHOI, G.H.; NUSS, D.L. Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. **Science**, New York, v. 264, p. 1762-1764, Jun., 1994.

CHEN, B.; NUSS, D.L. Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1/ Euro 7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chesnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 985-992, Feb., 1999.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H.; LEE, Y.W.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2529-2534, May, 2002.

COMPEL, P.; PAPP, I.; BIBÓ, M.; FEKETE, C. HORNOK, L. Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. **Virus Genes**, NorWell, v. 18, n.1, p. 49-56, Jan., 1998.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J.Z.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 1475-1481, Dec., 2006.

DAY, P.R.; DODDS, J.A.; ELLISTON, J.E.; JAYNES, R.A.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, Berlin, v. 67, p. 1393-1396, Jun., 1977.

DRAKE, J.W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Kirksville, v. 90, p. 4171-4175, May, 1993.

ELLISTON, J.E. Characteristic of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. **Phytopathology**, St Paul, v. 75, p. 151-158, Nov., 1985.

ELIAS, K.S.; COTTY, P.J. Incidence and stability of infection by double-stranded RNA genetic elements in *Aspergillus section flavi* and effects on aflatoxigenicity. **Canadian Journal of Botany**, Canadá, v. 74, p. 716-725, 1996.

FAHIMA, T.; KAZMIERCZAK, P.; HANSEN, D.R.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN N.K. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Virology**, New York, v. 195, p. 81-89, Jul., 1993.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses**. San Diego: Elsevier, 2005. p.571-601.

FULBRIGHT, D.W. Effect of eliminating dsRNA in Hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, Berlin, v. 74 ,n.6, p. 722-724, Jun., 1984.

GHABRIAL, S.A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. **Virus Genes**, NorWell, v. 16, p. 119-131, 1998.

GILLINGS, M.R., TESORIERO, L.A., GUNN, L.V. Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. **Plant Pathology**, Chichester, v. 42, p. 6-15, Feb., 1993.

GEISER, D.M.; JIMENEZ-GASCO, M.D.; KANG, S.C.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T.J.; ZHANG, N.; KULDAU, G.A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 473-479, June, 2004.

GIMÉNEZ-PECCI, M.D.L.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; MORAES, C.K.; CORRÊA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 334-339, Nov., 2002.

GOLUBEV, W.I.; PFEIFFER, I.; CHURKINA, L.G. GOLUBEVA, E.W. Double-stranded RNA viruses in an mycotoxinogenic strain of *Cystofilobasidium infirmominiatum*. **FEMS Yeast Research**, Holanda, p. 63-68, Mar., 2003.

HAMMAR, S.; FULBRIGHT, D.W.; ADAMS, G.C. Association of double-stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology**, St Paul, v. 79, n.5, p. 568-572, May., 1989.

HILLMAN, B.I.; TIAN, Y.; BEDKER, P.J.; BROWN, M.P.A. North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. **Journal of Genetic Virology**, Spencers Wood, v. 73, p. 681-686, Mar., 1992.

- HOLLINGS, M. Viruses associated with dieback disease of cultivated mushrooms. **Nature**, London, v. 196, p. 962-965, Dec., 1962.
- HOWITT, R.L.J.; BEEVER, R.E.; PEARSON, M.N.; FORSTER, L.R.S. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 99, p. 1472-1478, Dec., 1995.
- LIMA, S.S.; ABADIO, A.K.R.; ARAÚJO, E.F.; KITAJIMA, E.W.; SARTORATO, A.; QUEIROZ, M.V. Mycovirus in *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of angular leaf spot in common bean. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v. 56, p. 359-365, May., 2010.
- LINDER-BASSO, D.; DINEK, J.N.; HILLMAN, B.I. Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus* 4, the most common hypovirus species in North America. **Virology**, New York, v. 33, n.1, p. 192-203, Jun., 2005.
- MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar.** 2005. 87p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MALPICA, J.M.; FRAILE, A.; MORENO, I.; OBIES, C.I.; DRAKE, J.W.; GARCÍA-ARENAL, F. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. **Genetics**, Bethesda, v. 162, p. 1505-1511, Dec., 2002.
- MÁRQUEZ, L.M.; REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J.; ROSSINCK, M.J. A virus in a fungus in a plant: Three-Way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, New York, v. 315, p. 513-515, Jan., 2007.
- MARTINS, M.K.; FURNALETO, M.C.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, Berlin, v. 36, p. 94-97, Aug., 1999.
- MELZER, M.J.; BIDOCHKA, M.J. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**, Lawrence, v. 90, p. 586-594, Jul./Aug., 1998.
- MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCIA, P. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 306-311, Apr., 2009.
- MORRIS, T.J.; DODDS, J.A. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69,n.8, p. 854-858, 1979.
- MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. **Virus Taxonomy**: Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Springer-Verlag, 1995. 586p.
- NUSS, D.L. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. **Nature**, London, v. 3, p. 632-642, Aug., 2005.

PINTO, A.S.; GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M. Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D.T. **Controle biológico de pragas**. Piracicaba: FEALQ, 2006. 287p.

REVILL, P.A.; DAVIDSON, A.D.; WRIGHT, P.J. Mushroom Bacilliform Virus RNA: The Initiation of Translation at the 5' End of the Genome and Identification of the VPg. **Virology**, New York, v. 249, p. 231-237, Sept., 1998.

SCHRANK, A.; BOGO, M.R.; OLIVEIRA, D.; AZEVEDO, J.L. Mycoviruses infecting isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In: FIRST EUROPEAN CONFERENCE ON FUNGAL GENETICS, 1., 1992, Nottingham. **Abstracts...** University of Nottingham, p. 32.

SHAH, F.A.; CHRIS, N.A.; WRIGHT, J.; BUTT, T.M. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 276, p. 60-66, Nov., 2007.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 51, n. 2), p. 259-266, Oct., 2005.

SHAPIRA, R.; NUSS, D.L. Gene expression by a hypovirulence-associate vírus of chesnut blight fungus involves two papain-like protease activities. **Journal of Biology Chemicals**, Heidelberg, v. 266, p. 19419-19425, Oct., 1991.

SMART, C.D.; YUAN, W.; FOGLIA, R.; NUSS, D.D.; FULBRIGHT, D.W.; HILLMAN, B.I. *Cryphonectria hypovirus 3*, a vírus species in the family hypoviridae frame. **Virology**, New York, v. 265, n.1, p. 66-73, Dec., 1999.

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

TULLOCH, H. The genus *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 407-411, June, 1976.

URAYAMA, S.; KATO, S.; SUZUKI, Y.; AOKI, N.; TUONG, L.E.M.; ARIE, T.; TERAOKA, T.; FUKUHARA, T.; MORIYAMA, H. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Journal of General Virology**, London, v. 91, p. 3085-3094, Dec., 2010.

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 43, p. 446-452, Jun., 2006.

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Heterokaryon incompatibility blocks virus transfer among natural isolates of black *Aspergilli*. **Current Genetics**, Berlin, v. 32, p. 209-217, Sept., 1997.

VAN HEERDEN, S.W.; GELETKA, L.M.; PREISIG, O.; NUSS, D.L.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Characterization of South African *Cryphonectria cubensis* isolates infected with a *C. parasitica* hypovirus. **Phytopathology**, St Paul, v. 91 n.7, p. 628-632, Jul., 2001.

WANG, C.; BUTT, T.M.; ST LEGER, R.J. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 151, p. 3223-3236, Oct., 2005.

WICKNER, R.B. Double-Stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60,n.1, p. 250-265, Mar., 1996.

ZACOMMER, B.; HAENNI, A.; MACAYA, G. The remarkable variety of plant RNA virus genomes. **Journal of General Virology**, London, v. 76, p. 231-247, Feb., 1995.

3 VÍRUS DE RNA DE FITA-DUPLA EM ISOLADOS BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae*

Resumo

O Brasil é o país líder no uso do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle de pragas agrícolas. Estudos relatam a presença de partículas infecciosas de RNAfd, denominadas micovírus, que são em alguns casos associadas a doenças nos fungos hospedeiros. Pouco se sabe sobre a diversidade e o impacto dos micovírus em isolados de *M. anisopliae* sensu stricto. Este estudo mostra a riqueza de micovírus associados a isolados de *M. anisopliae* obtidos da Coleção de Entomopatógenos da Universidade de São Paulo, de usinas sucroalcooleiras e de produtos comerciais a base deste entomopatógeno. Os vírus foram detectados em 55% dos 36 isolados de *Metarhizium* e 16 diferentes padrões eletroforéticos de RNAfd variando de 3 a 18 bandas em géis de poliacrilamida foram encontrados. RNAfd não foi detectado em nenhum dos produtos comerciais utilizados neste estudo. Os diferentes padrões virais presentes neste estudo, aparentemente, não têm relação com os locais ou hospedeiros onde foram coletados.

Palavras-chave: Vírus; RNA de fita dupla; Riqueza; Entomopatógeno

Abstract

Double-stranded RNA virus in Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium* spp.

Brazil is the leading country in the use of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against agricultural pests. Studies have reported the presence of infectious particles of dsRNA, called mycovirus, which in some cases are associated with fungal diseases in the host. Little is known about the diversity and the impact of mycoviruses in *M. anisopliae* sensu stricto. This study shows the richness of mycoviruses associated with *M. anisopliae* isolates from the collections of entomopathogens of the University of São Paulo, from sugar-alcohol factories and microbial based products. dsRNA viruses were found in 55% of the 36 *Metarhizium* isolates and showed 16 different electrophoretic patterns consisting of 3 to 18 dsRNA bands in polyacrylamide gels. dsRNA was not detected in any of the commercial products used in this study. The different viral patterns found in the isolates studied here apparently have no relation to the locations or hosts where they were collected.

Keywords: Virus; dsRNA; Richness; Entomopathogen

3.1 Introdução

Vírus que infectam fungos podem apresentar o seu genoma constituído por RNA de fita dupla (RNAfd) ou RNA de fita simples (RNAfs). Os vírus que apresentam o seu genoma constituído por RNAfd são classificados nas famílias, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Reoviridae* e *Hypoviridae*. A principal característica que diferencia as famílias

destes vírus é a organização do seu genoma, ou seja, o número de pares de bases e de segmentos que os constituem (FAUQUET et al., 2005).

Os vírus que infectam fungos são normalmente constituídos por uma cápsula protéica, o capsídeo, envolvendo o seu genoma que é formado por um ou mais segmentos de RNA de fita dupla (RNAfd) (MURPHY et al., 1995). Já foram citados também vírus cujo genoma é formado por um segmento de RNA de fita simples infectando fungos, tais como, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FAUQUET et al., 2005) e cogumelos (REVILL et al., 1998). Outros vírus não apresentam o capsídeo, e sim, uma vesícula envolvendo o genoma, como é o caso dos vírus da família *Hypoviridae*, amplamente estudados devido a sua capacidade de causar hipovirulência no fungo fitopatogênico *Cryphonectria parasitica* (FAHIMA et al., 1993). Vários micovírus associados à hipovirulência não codificam as proteínas que formam o capsídeo, e, portanto, estes vírus não apresentam forma ou partículas (NUSS, 2005).

Os micovírus são mais amplamente estudados em fungos fitopatogênicos, porém, já foram citados infectando os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (BOGO et al., 1996; MELZER; BIDOCHKA, 1998; TIAGO et al., 2004), *Metarhizium flavoviridae* (MARTINS et al., 1999), *Beauveria bassiana* (DALZOTO et al., 2006; HERRERO et al., 2012) e *Isaria fumosorosea* (AZEVEDO et al., 2000). A presença dos vírus de RNA de fita dupla em fungos, em estudos iniciais, é geralmente determinada por meio da detecção dos ácidos nucleicos que os constituem (RNAfd).

Foi relatada uma grande riqueza de vírus de RNAfd infectando isolados de *M. anisopliae* (MELZER; BIDOCHKA, 1998), no entanto, os possíveis efeitos que estes diferentes vírus apresentam nos fungos não são muito conhecidos. Os vírus de fungos são, em geral, associados com infecções latentes de seus hospedeiros (GHABRIAL, 1998). Bioensaios de virulência realizados com *M. flavoviridae* CG442 sob o gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* mostraram que a presença de vírus de RNAfd não causou a hipovirulência do fungo (MARTINS et al., 1999). Resultados semelhantes foram observados para o fungo *I. fumosorosea* P92 infectado com vírus de RNAfd, em comparação a mesmo isolado livre dos vírus, que quando testados contra a mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B não apresentaram diferenças em relação à virulência (AZEVEDO et al., 2000).

Entretanto, alguns autores relatam os efeitos dos vírus de RNAfd, como, menor crescimento micelial, menor produção de conídios e hipovirulência em fungos infectados. Isolados de *M. anisopliae* infectados com vírus via anastomose hifal entre os mutantes auxotróficos *M. anisopliae* CG291arg e *M. anisopliae* CG442met apresentaram menor produção de conídios em comparação ao isolado *M. anisopliae* 442 livre de vírus (MARTINS

et al., 1999). Colônias de *B. bassiana* CG25 livres de vírus de RNAfd produziram mais conídios e causaram mortalidade mais rápida de percevejos *Euschistus heros* em comparação ao mesmo isolado do fungo infectados com vírus (DALZOTO et al., 2006). Outro estudo mostrou que um isolado isogênico de *M. anisopliae* não-infectado com vírus apresentou maior crescimento micelial, esporulação e virulência em comparação ao não-infectado (MELZER; BIDOCHKA, 1998).

O Brasil tem o maior programa mundial de uso de *M. anisopliae* em uma única cultura; este fungo vem sendo utilizado a décadas para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae) e *Mahanarva posticata* Stal, 1855 (Hemiptera: Cercopidae). Entretanto, pouco se conhece sobre a riqueza e os efeitos dos micovírus associados aos isolados brasileiros de *M. anisopliae*. Também não é conhecido o efeito dos micovírus na produção em larga escala de *M. anisopliae* em fermentação sólida e na virulência destes entomopatógenos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a riqueza de vírus de RNAfd presentes em isolados de *M. anisopliae* nativos, bem como, estudar estratégias de eliminação dos micovírus nos fungos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Multiplicação e armazenamento de isolados de *Metarhizium* spp.

Os isolados de *Metarhizium* foram obtidos do banco de isolados do Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, bem como, de usinas sucroalcooleiras e de produtos comerciais (Tabela 1). Os conídios dos fungos foram inicialmente inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura à base de batata, dextrose e ágar (BDA Difco®) que foram mantidas em câmara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de sete a dez dias para o crescimento e conidiogênese.

Dois círculos de um centímetro de diâmetro do meio de cultura de cada um dos isolados foram transferidos para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido à base de batata (200g/ L) e dextrose (20g/ L) (BD). Os erlenmeyers com os diferentes isolados de *Metarhizium* foram mantidos por quatro ou cinco dias em agitadores a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (150 rpm).

O meio BD contendo micélio de *Metarhizium* foi filtrado em filtro Büchner acoplado a uma bomba de vácuo, forrado com discos de papel filtro, secado em câmara de fluxo por

aproximadamente trinta minutos e armazenados em freezer a -80°C até o momento da extração dos ácidos nucleicos.

3.2.2 Extração dos ácidos nucleicos dos vírus

Para extração dos ácidos nucleicos foi utilizada uma metodologia para a extração de RNAfd em isolados de *Metarhizium anisopliae* com modificações (MELZER; BIDOCHKA, 1998). Foram macerados entre 0,3 a 0,5g de micélio de diferentes isolados de *Metarhizium* (Tabela 1) com o auxílio de grau e pistilo contendo nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um tubo de microcentrifuga contendo 700 μL de tampão STE 1x (0,1 M NaCl; 0,05 M Tris; 0,001 M EDTA, pH 6.8) e 80 μL de SDS 10%. Os tubos foram mantidos em banho-maria por 30 minutos a 37°C . Em seguida, acrescentou-se 400 μL de fenol saturado e o sobrenadante foi coletado após centrifugação por 7 minutos (12.000 rpm). Outras duas centrifugações foram realizadas com fenol saturado e clorofórmio (1:1) e clorofórmio puro, coletando-se o sobrenadante. A fase aquosa final obtida foi ajustada a uma concentração final de 16% de etanol e transferida para um novo tubo contendo 0,25g de fibras de celulose CF-11 (Whatman®) equilibrada com STE 1x 16% etanol. Centrifugou-se por 8 minutos (8000g) e descartou-se o sobrenadante. Foi acrescentado 1mL de STE 1x 16% etanol e descartado após centrifugação por 3 minutos (8000g) por quatro vezes consecutivas, sempre descartando o sobrenadante. Acrescentou-se 550 μL de STE 1x sem etanol e coletou-se o sobrenadante após centrifugação por 8 minutos (8000g). Foram transferidos 400 μL do sobrenadante para um novo tubo contendo 1 mL de etanol absoluto e 40 μL de Na-acetato 3M. Os tubos foram mantidos por 30 minutos em freezer a -80°C e centrifugados por dez minutos (12800 rpm). O pellet foi seco ao ar por 15 minutos e ressuspensionado em 25 μL de água milli-Q tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato). Todas as centrifugações foram realizadas em temperatura ambiente.

Os produtos de extração obtidos foram armazenados em freezer a -80°C até o momento da utilização para eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Todas as soluções tampão utilizadas nos protocolos de extração foram preparadas com água milli-Q tratada com DEPC.

Para a eletroforese foram misturados 15 μL da amostra com 10 μL de mistura dissociante (Tris-HCl 0,062M; uréia 5M; 2-Mercaptoetanol 5%; SDS 3%; azul de bromofenol 0,01%), incubados a 56°C por 15 minutos e então aplicados em um gel de poliacrilamida a 7,5% (HERRING et al., 1982). A impregnação do gel de poliacrilamida foi realizada com

nitrato de prata (SAMMONS et al., 1981). Como controle positivo da reação e marcador do peso molecular para EGPA, foi utilizada a amostra padrão de rotavírus de símio do grupo A (SA11) cultivada em células MA104 ou CaCo-2 (LÓPEZ et al., 1985).

3.2.3 Identificação das espécies de *Metarhizium*

Para a identificação das espécies de *Metarhizium* (Tabela 1), foi realizada a extração de DNA do micélio dos fungos (SOKOLOVSKY et al., 1990). O processo consiste, resumidamente, na maceração do micélio com nitrogênio líquido, seguida de sucessivas centrifugações, com fenol e clorofórmio (1:1), clorofórmio, isopropanol e álcool 70%, respectivamente.

A reação de PCR foi realizada utilizando-se para a amplificação os primers da região 5' EF-1 α EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (REHNER; BUCKLEY, 2005). A reação de amplificação foi realizada num volume final de 50 μ L, contendo 5 μ L de PCR Buffer 10X (Invitrogen^{TM}), 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1,0 μ L de dNTPmix (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 1,5 μ L de cada um dos primers de amplificação, 0,3 μ L de TaqDNA Polimerase (Invitrogen^{TM}), 5 μ L de DNA genômico e 34,2 μ L de água mili- Q. As amostras foram amplificadas em 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, 36 ciclos de 2 minutos subdivididos em 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C para extensão. O último ciclo foi constituído por dez minutos em aquecimento final de 72° C.

Os produtos de PCR foram submetidos a um processo de purificação, no qual se utilizou o KitWizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). As amostras purificadas foram enviadas ao Centro de Estudos Genoma Humano da Universidade de São Paulo, onde foram sequenciadas. Todas as sequências foram editadas no programa CodonCodeAligner 3.7.1. A identificação da espécie foi realizada através da comparação com sequências já caracterizadas no GenBank, por intermédio da ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

3.3 Resultados

3.3.1 Detecção de vírus de RNAfd em isolados de *Metarhizium*

Dentre os trinta e seis isolados de *Metarhizium* que foram utilizados neste estudo, vinte (55 %) estavam infectados com vírus de RNAfd. O único isolado estudado da espécie *M. robertsii* (ESALQ 1426) não apresentou infecção por vírus de RNAfd (Tabela 1).

Tabela 1 - Isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo (continua)

Isolado	Local de Coleta ¹	Hospedeiro	Vírus ⁵
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1387	Jaú - SP	<i>Atta</i> sp.	1
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 860	Piracicaba - SP	<i>Macrospis</i> sp.	1
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 866	Goiânia - GO	<i>Atta</i> sp.	1
<i>M. anisopliae</i> ESALQ RJC	Rio de Janeiro - RJ	<i>Deois flavopicta</i>	2
<i>M. anisopliae</i> CTC F28	Pradópolis - SP	<i>M. fimbriolata</i>	3
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 867	Goiânia - GO	<i>Atta</i> sp.	4
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 798	Cuiabá - MT	<i>Solenopsis invicta</i>	5
<i>M. anisopliae</i> CB 353	Campinas - SP	<i>M. fimbriolata</i>	6
<i>M. anisopliae</i> ESALQ PL26	Campinas - SP	<i>M. fimbriolata</i>	7
<i>M. anisopliae</i> ESALQ RJD	Rio de Janeiro - RJ	<i>Deois flavopicta</i>	8
<i>M. anisopliae</i> CB 391	Campinas - SP	<i>M. fimbriolata</i>	8
<i>M. anisopliae</i> CTC F15	Motuca - SP	<i>M. fimbriolata</i>	8
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1204	Piracicaba - SP	<i>M. fimbriolata</i>	9
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1256	Concórdia - SC	cigarrinha	10
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 818	Piracicaba - SP	solo	11
<i>M. anisopliae</i> CTC F8a	Iracemápolis - SP	<i>M. fimbriolata</i>	12
<i>M. anisopliae</i> CTC F8b	Iracemápolis - SP	<i>M. fimbriolata</i>	13
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 816	Piracicaba - SP	solo	14
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1097	Lavras - MG	Solo	15
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1037	Porto Alegre - RS	<i>Solenopsis</i> sp.	16
<i>M. anisopliae</i> CTC F111	Nova Europa - SP	<i>M. fimbriolata</i>	-
<i>Metarhizium</i> sp. CB 380	Campinas - SP	<i>M. fimbriolata</i>	-
<i>M. robertsii</i> ESALQ 1426	Londrina - PR	solo	-

<i>M. anisopliae</i> CB 425	Campinas - SP	<i>M. fimbriolata</i>	-
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 959	Rio de Janeiro - RJ	<i>Deois</i> sp.	-
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 319	Goiana - PE	<i>M. posticata</i>	-
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1116	Piracicaba - SP	escarabeídeo	-
<i>M. anisopliae</i> ESALQ PL43	Flexeiras - AL	<i>M. posticata</i>	-
<i>M. anisopliae</i> CB 333	Campinas - SP	<i>M. fimbriolata</i>	-
<i>M. anisopliae</i> CTC F20	Serrana - SP	<i>M. fimbriolata</i>	-
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1374	Goiás	<i>Scaptocoris</i> sp.	-
<i>Metarhizium</i> sp. ESALQ 1392	Jaú - SP	<i>Atta</i> sp.	-
<i>M. anisopliae</i> ESALQ 1391	Jaú - SP	<i>Atta</i> sp.	-
Produto comercial A ²	-	-	-
Produto comercial B ³	-	-	-
Produto comercial C ⁴	Porto Alegre - RS	<i>Solenopsis</i> sp.	-

¹ Cidade e Estado do Brasil, ² pó molhável a base de *M. anisopliae*, ³ pó molhável a base de *M. anisopliae*, ⁴ arroz + conídios de *M. anisopliae*, ⁵ padrão eletroforético de RNAfd de acordo com a figura 1.

Figura 1 - Padrões eletroforéticos de segmentos do genoma dos vírus de RNAfd observados nos isolados de *Metarhizium* e amostra padrão de rotavírus SA-11 (M)

Foram verificados 16 padrões eletroforéticos diferentes de vírus nos fungos (Figura 1 e Tabela 1). Os isolados *M. anisopliae* ESALQ 860 e ESALQ 1387 apresentaram o mesmo padrão verificado no isolado ESALQ 866 (Figura 1: 1) e os isolados ESALQ RJD e CTC F15 apresentaram o mesmo padrão do isolado CB 391 (Figura 1: 8). Os padrões eletroforéticos consistiram de 3 até 18 bandas de RNAfd.

3.4 Discussão

Através da EGPA foi possível identificar, em todos os isolados, a presença de mais de um segmento de RNAfd, indicando a presença de mais de um vírus ou a presença de vírus de genoma segmentado. Estes isolados também podem estar infectados com vírus ainda não classificados. A infecção de fungos por vírus de RNAfd é comum e já foi relatada para algumas espécies de fungos entomopatogênicos, bem como para diversas espécies de fungos fitopatogênicos. A taxa de infecção é variável entre as diferentes espécies de fungos e entre

diferentes locais (MELZER; BIDOCHKA, 1998; DALZOTO et al., 2006; AZEVEDO et al., 2000; IKEDA et al., 2004; VAN DIEPENINGEN et al., 2006).

Não foi detectada a presença de vírus de RNAfd em nenhum dos produtos comerciais utilizados neste estudo. O produto C (Tabela 1) é obtido por meio da multiplicação em larga escala do isolado *M. anisopliae* ESALQ 1037, mantido em preservação a -20°C no Banco de Entomopatógenos da ESALQ/ USP. Os vírus de RNAfd foram detectados no isolado mantido em preservação, mas não foram detectados no produto comercial. É possível que estes vírus tenham sido eliminados durante o processo de produção. O isolado *M. anisopliae* V291B mantido em preservação em nitrogênio líquido apresentou RNAfd, bem como partículas virais, que não foram observadas em um clone que foi subcultivado sucessivamente em meio de cultura sólido, demonstrando que o subcultivo sucessivo pode eliminar a perda dos vírus (LEAL et al, 1994).

Alguns isolados do banco de entomopatógenos, como por exemplo, os isolados CTC F8, CTC F28 e CTC F15 que são utilizados na produção em larga escala por usinas sucroalcooleiras do Estado de São Paulo para o controle de cigarrinhas apresentaram infecção por vírus de RNAfd. Todos estes isolados apresentam coloração verde, grande produção de conídios e são virulentos contra cigarrinhas da cana-de-açúcar. No entanto, não foi avaliado se os produtos gerados a partir destes isolados apresentam o mesmo padrão de vírus e pouco se conhece sobre a dinâmica destes micovírus em condições de campo.

Dentre os isolados utilizados neste estudo, quatro são provenientes de coletas de solo, enquanto que os demais foram isolados de insetos infectados. Dentre os quatro isolados de solo, três destes (ESALQ 816, ESALQ 818 e ESALQ 1097), estavam infectados com vírus de RNAfd com padrões eletroforéticos distintos entre si e dos demais vírus dos outros isolados infectados.

Em um estudo realizado com isolados de *M. anisopliae* coletados no Canadá, foi constatada a presença de vírus de RNAfd em 38,4% (N=73) dos fungos (MELZER; BIDOCHKA, 1998), com diferentes padrões eletroforéticos, no entanto, com um número de bandas variando de uma até no máximo cinco bandas em um mesmo isolado visualizadas no gel de agarose. Nos isolados Brasileiros, observamos até 18 bandas de RNAfd em uma única amostra em gel de poliacrilamida. Treze bandas de RNAfd já haviam sido detectadas no isolado *M. anisopliae* V215 e nove bandas no isolado *M. anisopliae* V291 em gel de agarose (LEAL et al., 1994). Em *M. flavoviridae*, cinco padrões eletroforéticos distintos foram observados e os segmentos apresentavam peso molecular variando entre 1,4 a 6,2 kpb (MARTINS et al., 1999). Comparações realizadas em estudos preliminares em nosso

laboratório revelaram uma maior eficiência de detecção de bandas de RNAfd em gel de poliacrilamida em relação a gel de agarose (dados não apresentados).

Nos isolados de *M. anisopliae* ESALQ 866, ESALQ 860, ESALQ RJC, ESALQ 1387, CTC F15, CTC F28 e ESALQ 867, foram observados dois pares de segmentos semelhantes de vírus, sendo que o primeiro par de segmentos apresentou aproximadamente 1,56 e 1,59 kpb e o segundo par com segmentos de 2,4 e 2,58 kpb. É possível que estes isolados apresentem infecção por dois vírus de RNAfd da família *Partitiviridae* (FAUQUET et al., 2005). Apesar dos segmentos destes vírus nos diferentes isolados mencionados acima, apresentarem pesos moleculares iguais, estes podem apresentar seqüências de nucleotídeos diferentes, sendo necessário, portanto, o sequenciamento dos segmentos de RNAfd para uma comparação e classificação correta. Vírus da família *Partitiviridae* já foram observados nos isolados de *M. anisopliae* MaV-RJ e MaV-A1, enquanto que no isolado MaV-M5 foi observado um vírus da família *Totiviridae* (GIMÉNEZ-PECCI et al., 2002).

Foram observadas ainda várias outras bandas extras com diferentes pesos moleculares em diferentes isolados. Bandas únicas com peso molecular entre 4,6 e 7,0 kpb, são características dos vírus da família *Totiviridae* (FAUQUET et al., 2005). Entretanto, segmentos simples de RNAfd com diferentes pesos moleculares, são também características dos vírus satélites ou defectivos, presentes em abundância nos fungos e resultando em uma complexidade nos padrões de bandas de RNAfd, que em alguns casos, causam confusão na interpretação e organização dos genomas dos vírus (GHABRIAL, 1998).

Nos isolados de *M. anisopliae* ESALQ 798, ESALQ 353, ESALQ RJD, CB 391, CTC F15 e ESALQ 1204 foram observados vírus com quatro segmentos de RNAfd entre 2,5 a 2,75 kpb, sendo provavelmente pertencentes à família *Chrysoviridae* (FAUQUET et al., 2005).

Nos isolados *M. anisopliae* ESALQ PL26, ESALQ 1204 e ESALQ 1037 foram observados vários segmentos de RNAfd, indicando a presença de coinfeção ou de vírus com muitos segmentos. Dentre os vírus de RNAfd, os que apresentam maior número de segmentos são os da família *Reoviridae*, podendo variar de dez a doze (FAUQUET et al., 2005). A diversidade de bandas sugere também que estes fungos podem estar infectados por vírus satélites e/ou defectivos (GHABRIAL, 1998; FAUQUET et al., 2005; LIMA et al., 2010; VAN DIEPENINGEN et al., 2006; LEAL et al., 1994).

Em alguns isolados como *M. anisopliae* ESALQ 1204, ESALQ 818, ESALQ PL26 e ESALQ 867 fica evidente a infecção por mais de um vírus de RNAfd, pois, algumas bandas visualizadas na EGPA apresentaram maior intensidade em relação à outras. É esperado que segmentos de RNAfd que constituem um mesmo vírus apresentem a mesma capacidade de

replicação no hospedeiro e, conseqüentemente, a mesma intensidade de banda (quantidade de RNAfd) no gel.

Os diferentes padrões de vírus observados nos isolados aqui estudados aparentemente não têm relação com as localidades onde foram coletados, ou seja, padrões eletroforéticos semelhantes foram observados em fungos coletados em diferentes Estados brasileiros (Tabela 1 e Figura 1). Os isolados *M. anisopliae* ESALQ 860, ESALQ 1204, ESALQ 818 e ESALQ 816 provenientes da cidade de São Paulo apresentaram padrões eletroforéticos diferentes, enquanto que, os isolados ESALQ 866, ESALQ 860 e ESALQ 1387 apresentaram o mesmo padrão eletroforético e foram coletados em cidades diferentes (Goiânia/ GO, Piracicaba/ SP e Jaú/ SP, respectivamente). Da mesma forma, os isolados CB 391, ESALQ RJD e CTC F15 apresentaram padrões eletroforéticos iguais e são provenientes de Estados brasileiros diferentes (Mato Grosso, Rio de Janeiro e São Paulo, respectivamente).

Concluimos que a infecção por micovírus é comum entre os isolados de *M. anisopliae*. Existe uma grande riqueza de vírus de RNAfd que infectam os diferentes isolados, o que demanda uma investigação mais profunda à respeito do papel de cada uma dessas espécies de vírus de RNAfd na fisiologia e biologia dos fungos entomopatogênicos.

Referências

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYRERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular of Biology**, London, v. 215, p. 403-410, Oct., 1990.
- AZEVEDO, A.C.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hypomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, p. 61-63, Mar., 2000.
- BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; GIMENEZ, M.P.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 100, p. 1468-1472, Jul., 1996.
- DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J.Z.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 110, p. 1475-1481, Dec., 2006.
- FAHIMA, T.; KAZMIERCZAK, P.; HANSEN, D.R.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN N.K. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Virology**, New York, v. 195, p. 81-89, Jul., 1993.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. 2005. **Virus Taxonomy**: Classification and nomenclature of viruses. San Diego: Elsevier, 2005. p.571-601.

GHABRIAL, S.A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. **Virus Genes**, NorWell, v. 16, p. 119-131, 1998.

GIMÉNEZ-PECCI, M.D.L.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; MORAES, C.K.; CORRÊA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 334-339, Nov., 2002.

HERRERO, N.; DUEÑAS, E.; QUESADA-MORGA, E.; ZABALGOGEAZCOA, I. Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79,n.24, p. 8523-8530, Sept., 2012.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v. 16, p. 473-477, Sept., 1982.

IKEDA, K.; NAKAMURA, H.; ARAKAWA, M.; MATSUMOTO, N. Diversity and vertical transmission of double-stranded RNA elements in root rot pathogens of trees, *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 108, p. 626-634, Jun., 2004.

LEAL, S.C.M.; BERTOLI, D.J.; BALL, B.V.; BUTT, T.M. Presence of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 89-94, Sept., 1994.

LIMA, S.S.; ABADIO, A.K.R.; ARAÚJO, E.F.; KITAJIMA, E.W.; SARTORATO, A.; QUEIROZ, M.V. Mycovirus in *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of angular leaf spot in common bean. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v. 56, p. 359-365, May., 2010.

LÓPEZ, S.; ARIAS, C.F.; BELL, J.R.; STRAUS, J.H.; ESPEJO, R.T. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA-11 infectivity. **Virology**, Maryland Heights, v. 144, p. 11-19, Jul., 1985

MARTINS, M.K.; FURNALETO, M.C.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, Berlin, v. 36, p. 94-97, Aug., 1999.

MELZER, M.J.; BIDOCHKA, M.J. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**, Lawrence, v. 90, p. 586-594, Jul., 1998.

MURPHY, F.A.;FAUQUET, C.M.;BISHOP, D.H.L.;GHABRIAL, S.A.;JARVIS, A. W.;MARTELLI, G. P.;MAYO, M. A.;SUMMERS, M. D. **Virus Taxonomy**: Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Springer-Verlag, 1995. 586p.

NUSS, D.L. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. **Nature**, London, v. 3, p. 632-642, Aug., 2005.

REHNER, S.A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, Lawrence, v. 97, p. 84-98, Jan./ Feb., 2005.

REVILL, P.A.; DAVIDSON, A.D.; WRIGHT, P.J. Mushroom Bacilliform Virus RNA: The Initiation of Translation at the 5' End of the Genome and Identification of the VPg. **Virology**, New York, v. 249, p. 231-237, Sept., 1998.

SAMMONS, D.N.; ADDANS, L.D.; MISHIKAWA, E.E. Ultrasensitive silver base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 2, p. 135-141, Feb., 1981.

SIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. Inhibition of protein synthesis *in vitro* by cycloheximide. **Nature**, London, v. 4907, p. 675-676, Nov., 1963.

SOKOLOVSKVY, V.; KALDENHOFER, Y.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics Newsletters**, Kansas City, v.37, p. 39-40, 1990.

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

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. **Fungal Genetics Biology**, San Diego, v. 43, p. 446-452, Jun., 2006.

4 EFEITOS DA ELIMINAÇÃO DE VÍRUS DE RNAfd NO FUNGO ENTOMOPATOGENICO *Metarhizium anisopliae*

Resumo

Uma grande riqueza de vírus de RNA de fita dupla é relatada em isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos destes vírus aos fungos. Neste estudo, verificamos que o inibidor de síntese protéica ciclohexamida não foi eficiente para eliminar os vírus de RNAfd de nenhum dos isolados de *M. anisopliae* estudados. Colônias dos isolados *Metarhizium anisopliae* ESALQ 866, *M. anisopliae* ESALQ 1256 e *M. anisopliae* CTC F8, foram curadas por meio do cultivo monoconidial ou por meio do isolamento de ponta de hifas, entretanto, nenhuma colônia livre do vírus do isolado CTC 118 foi obtida por estes métodos. Alguns segmentos do isolado *M. anisopliae* PL26 foram perdidos após o subcultivo de ponta de hifas. Tanto o cultivo monoconidial quanto o subcultivo de ponta de hifas resultaram em grande variabilidade morfológica das colônias de *M. anisopliae* PL26 provenientes dos subcultivos por meio destas técnicas, entretanto, nenhuma evidência da participação dos micovírus foi observada. Colônias isogênicas de *M. anisopliae* ESALQ 1256, apresentaram diferenças no crescimento, na produção de conídios e na virulência contra larvas de *T. molitor*, entretanto, estas diferenças não foram associadas à presença de vírus de RNAfd. Nenhuma diferença foi observada quanto à tolerância ao calor e aos raios ultravioletas entre colônias de *M. anisopliae* ESALQ 1256, com e sem vírus de RNAfd.

Palavras-chave: Micovírus; Cura de micovírus; Produção de conídios; Virulência; Tolerância à UV; Tolerância ao calor

Abstract

EFFECTS OF THE ELIMINATION OF THE dsRNA VIRUS ON THE ENTOMOPATHOGEN *Metarhizium anisopliae*

A great richness of dsRNA virus is associated with isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. However, little is known the effects of viruses to fungi. This study, we found that the inhibitor of protein synthesis cycloheximide was not effective in eradicating dsRNA viruses in none of the fungal isolates. Colonies of isolates of *Metarhizium anisopliae* ESALQ 866, *M. anisopliae* ESALQ 1256 and *M. anisopliae* CTC F8 were cured by the monoconidial or hyphal tip isolation of , however, no virus free colony of isolate CTC 118 was obtained by these methods. Some segments of the *M. anisopliae* PL26 isolate were lost following hyphal tip subculture. Colonies both from monoconidial culture and hyphal tip subculture showed great morphological variability; however, this variation was not correlated with the presence of mycoviruses. Isogenic colonies of *M. anisopliae* ESALQ 1256 showed differences in growth and conidia production, heat tolerance and virulence against *T. molitor* larvae; however, these differences were not associated to the presence of the dsRNA virus. No difference was observed regarding tolerance to ultraviolet rays among the colonies of *M. anisopliae* ESALQ 1256, with and without the dsRNA virus.

Keywords: Mycovirus; Mycovirus cure; Conidia production; Virulence; UV tolerance; Heat tolerance

4.1 Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* tem grande importância como agente de controle biológico de pragas no Brasil, sendo utilizado principalmente para cigarrinhas na cultura da cana-de-açúcar e em pastagens. Devido à grande demanda, este fungo é produzido em larga escala por empresas, instituições de pesquisas, universidades e também por usinas sucroalcooleiras que produzem o patógeno para consumo próprio. Vários fatores como a alta virulência, a capacidade para a produção de grande quantidade de conídios viáveis, a tolerância ao calor e a irradiação ultravioleta, são características que devem ser levadas em consideração desde o momento de seleção de um isolado de *M. anisopliae* para a produção em larga escala e utilização no controle de pragas.

Vírus de RNA de fita dupla (RNAfd), têm sido estudados nos últimos anos em várias espécies de fungos. Esses elementos têm sido associados a algumas espécies de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *Metarhizium* spp. (SCHRANK et al., 1992; BOGO et al., 1996; MELZER & BIDOCHKA, 1998; MARTINS et al., 1999; AZEVEDO et al., 2000; GIMENEZ-PECCI et al., 2002; TIAGO et al., 2004; DALZOTO et al., 2006; HERRERO et al., 2012). Em alguns casos, a infecção por estes vírus resultou em alterações morfofisiológicas como a redução na produção de conídios, a redução do crescimento micelial, alterações de coloração e hipovirulência (MELZER & BIDOCHKA, 1998; TIAGO et al., 2004; DALZOTO et al., 2006). Contudo, os resultados são variáveis entre as diferentes espécies e isolados de fungos estudados. A influência dos vírus de RNAfd na tolerância dos fungos entomopatogênicos à temperatura e aos raios ultravioletas ainda não foi estudada.

Os vírus de RNAfd que infectam fungos podem ser classificados nas famílias, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Reoviridae* e *Hypoviridae* (FAUQUET et al., 2005). Estes elementos são normalmente constituídos por uma cápsula protéica, o capsídeo, que envolve o seu genoma, formado por um ou mais segmentos de RNA de fita dupla (RNAfd) (MURPHY et al., 1995). Os vírus da família *Hypoviridae* não apresentam o capsídeo, e sim, uma vesícula envolvendo o genoma e são amplamente estudados devido a sua capacidade de causar hipovirulência no fungo fitopatogênico *Cryphonectria parasitica* (FAHIMA et al., 1993). Vários micovírus não codificam as proteínas que formam o capsídeo, e, portanto, estes vírus não formam os virions ou partículas infecciosas (NUSS, 2005).

Dentre as estratégias para a eliminação dos micovírus, as mais utilizadas são, o tratamento das colônias com o inibidor de síntese protéica ciclohexamida, o cultivo

monoconidial e o isolamento de ponta de hifas (FULBRIGHT, 1984; ELIAS & COTTY, 1996; MELZER & BIDOCHKA, 1998; DALZOTO et al., 2006; LIMA et al., 2010; VAN DIEPENINGEN et al., 1997; URAYAMA et al., 2010; AMINIAN et al., 2011; VAN DIEPENINGEN et al., 2006; AOKI et al., 2009). A eliminação dos vírus de RNAfd dos fungos é uma etapa fundamental para o estudo dos possíveis efeitos destes elementos ao seu hospedeiro, sendo possível após a eliminação, realizar comparações entre o mesmo isolado infectado e não-infectado.

Em estudos preliminares realizados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/ USP, constatou-se que isolados de *Metarhizium* spp. apresentam infecção por vários vírus de RNA de fita dupla (SANTOS et al., 2013). Entretanto, são desconhecidos os efeitos destes micovírus sobre os aspectos morfológicos e fisiológicos dos fungos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as técnicas de cultivo monoconidial e transferência de ponta de hifas e a utilização do inibidor de síntese protéica ciclohexamida para a eliminação dos micovírus e comparar colônias isogênicas de *Metarhizium anisopliae* com e sem vírus de RNAfd com relação ao crescimento, produção de conídios, virulência contra larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), tolerância ao calor e aos raios ultravioleta.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Obtenção de isolados com e sem vírus de RNAfd

Foram selecionados seis isolados de *M. anisopliae* do Banco de Entomopatógenos da ESALQ/ USP infectados por vírus de RNAfd, sendo eles, ESALQ 866, ESALQ 1256, CTC F8, CTC F118, ESALQ 1037 e ESALQ PL26 (Figura 1). Com o objetivo de eliminar os micovírus destes isolados foram testadas três metodologias: o tratamento com ciclohexamida, o cultivo monoconidial e a transferência de ponta de hifas. Os isolados foram selecionados por apresentarem infecção por diferentes vírus de RNAfd detectados em estudos anteriores realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/ USP (SANTOS et al., 2013).

Figura 1 - Perfis eletroforéticos de RNAfd dos micovírus presentes nos isolados de *Metarhizium anisopliae* utilizados neste estudo. Amostra padrão de rotavírus SA-11 (M) e isolados de *M. anisopliae* ESALQ 866 (1), ESALQ 1256 (2), CTC F8 (3), CTC F118 (4), ESALQ 1037 (5) e ESALQ PL26 (6)

4.2.2 Tratamento com ciclohexamida visando a eliminação dos vírus nos fungos

Nestes bioensaios foram utilizados os isolados *M. anisopliae* ESALQ 1037, *M. anisopliae* ESALQ 1256, *M. anisopliae* ESALQ 866 e *M. anisopliae* ESALQ PL26 (Figura 1). Inicialmente, conídios dos fungos foram inoculados em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA Difco®, para a multiplicação. As placas foram mantidas em câmara climatizada por oito dias. Após a conidiogênese, os conídios presentes na placa foram utilizados para a preparação da suspensão a 1×10^7 conídios/ mL.

Foi inoculado 1 µL da suspensão contendo conídios no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio BDA Difco® com 0, 10, 20, 40, 80 e 160µg de ciclohexamida por mililitro de meio de cultura. Para cada tratamento (concentração de ciclohexamida) foram realizadas quinze repetições, cada uma delas constituída por uma placa de Petri contendo uma colônia de *M. anisopliae*. As placas foram mantidas em condições controladas ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas) por dez dias.

Após o crescimento das colônias, foram recortados dois círculos de 8 mm das bordas de cada colônia e transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril

para a preparação de uma nova suspensão. Em seguida, foi inoculado 1µL de suspensão com conídios provenientes de cada repetição em novas placas de Petri contendo 10 mL de BDA Difco® sem ciclohexamida. As colônias foram mantidas em condições controladas por dez dias e após o crescimento foram avaliadas e multiplicadas em meio líquido (BD) para a produção de micélio e extração dos ácidos nucleicos para a detecção dos vírus nas diferentes amostras. Este bioensaio foi repetido para os isolados ESALQ PL26 e ESALQ 866 para a confirmação dos resultados.

Para verificar se o inibidor de síntese protéica afeta o crescimento, a produção e a morfologia dos fungos, foram avaliados o diâmetro (cm) de dez colônias por tratamento dos isolados *M. anisopliae* ESALQ 1037 e *M. anisopliae* ESALQ PL26, o número estimado de conídios de cinco colônias por tratamento do isolado *M. anisopliae* ESALQ 1037 e a morfologia das colônias de todos os isolados estudados em todos os tratamentos. As colônias foram fotografadas para posterior comparação com o padrão eletroforético de RNAfd.

4.2.3 Cultivo monoconidial e transferência de ponta de hifas visando a eliminação dos vírus nos fungos

Os conídios dos isolados de *M. anisopliae* ESALQ 866, ESALQ 1256, CTC F8 e CTC 118 e ESALQ PL26 (Figura 1), foram inoculados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA Difco® que foram mantidas em condições controladas ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas) por oito dias. Após a conidiogênese, os conídios presentes na placa foram utilizados para a preparação de suspensões em série.

As diferentes suspensões contendo conídios foram pinceladas em lâminas de microscopia cobertas com meio ágar-ágar na concentração de 40g por litro. As lâminas foram mantidas em condições controladas para a germinação dos conídios por 24 horas.

Foram selecionadas para o bioensaio as lâminas com poucos conídios germinados para possibilitar a captura destes individualmente. Cada conídio germinado foi capturado com o auxílio de uma agulha (13 x 4,5 mm) fixa em um palito de bambu de 30 cm de comprimento x 3 mm de espessura e transferido individualmente para placas de Petri contendo 10 mL de meio de cultura BDA Difco®. Os conídios germinados foram capturados por meio da visualização em microscópio estereoscópio em aumento de 100 vezes, mantido no interior de uma câmara de fluxo no momento da transferência a fim de evitar a contaminação por outros fungos ou bactérias. As placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas por dez dias para o crescimento das colônias monoconidiais.

As colônias provenientes do cultivo monoconidial foram repicadas por meio da técnica de transferência de ponta de hifas. Um círculo de 3 mm de cada colônia do fungo foi recortado, e, invertido sobre um retângulo (26 x 76 mm) de papel celofane submerso em meio de cultura BDA Difco® 2% em uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro. O fungo foi mantido em contato com o papel celofane por 48 horas em condições controladas para o crescimento de hifas nas laterais do círculo das colônias. O papel celofane contendo o fungo foi transferido para uma lâmina de microscopia para a observação das hifas no microscópio estereoscópio em aumento de 100 vezes. As pontas das hifas foram recortadas com o auxílio de uma agulha (13 x 4,5 mm) fixa em um palito de bambu com 30 cm de comprimento e 3 mm de espessura e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA Difco®. Todo o procedimento acima foi realizado dentro de câmara de fluxo horizontal. As placas de Petri foram mantidas em condições controladas por dez dias para o crescimento das colônias de *M. anisopliae*.

As colônias do isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26 obtidas por meio do cultivo monoconidial e via transferência de ponta de hifas foram avaliadas de acordo com a morfologia das colônias e perfis eletroforéticos de RNAd devido a grande variabilidade morfológica verificada para este isolado. Foi confeccionada uma tabela (Tabela 2) com a descrição dos diferentes padrões morfológicos e uma figura (Figura 5) com os diferentes padrões moleculares observados nestas colônias.

4.2.4 Extração de RNAd e eletroforese para a detecção dos micovírus

Cada colônia obtida por meio dos métodos do tratamento com ciclohexamida, cultivo monoconidial ou transferência da ponta de hifas representou uma unidade experimental independente. Para confirmar se os métodos apresentaram efeito na eliminação dos vírus de RNA de fita dupla, foram recortados dois círculos de 8 mm das bordas de cada colônia e transferidos para erlenmeyers contendo meio de cultura líquido BD (caldo de 200g de batata + 20g de dextrose/ litro). O micélio produzido foi utilizado para a extração dos ácidos nucleicos.

Foi realizada a extração de RNAd pelo método de MELZER; BIDOCHKA (1998) modificado por SANTOS et al. (2013) que basea-se no uso de fibras de celulose CF-11 Whatman®. Os produtos de extração obtidos por ambos os métodos foram armazenados em freezer a -80°C até o momento da utilização para eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Todas as soluções tampão utilizadas nos protocolos de extração foram preparadas com água milli-Q tratada com DEPC.

Para a eletroforese foram misturados 15 µL da amostra com 10 µL de mistura dissociante (Tris-HCl 0,062M; uréia 5M; 2-Mercaptoetanol 5%; SDS 3%; azul de bromofenol 0,01%), incubados a 56°C por 15 minutos e então aplicados em um gel de poliacrilamida a 7,5% (SAMMONS et al., 1981). A impregnação do gel de poliacrilamida foi realizada com nitrato de prata (HERRING et al., 1982). Como controle positivo da reação e marcador do peso molecular para EGPA, foi utilizada a amostra padrão de rotavírus de símio do grupo A (SA11) cultivada em células MA104 ou CaCo-2 (LÓPEZ et al., 1985). A verificação da presença ou ausência dos micovírus foi realizada por meio da comparação com as bandas de RNAd presentes na amostra original (Figura 1) em gel de poliacrilamida.

4.2.5 Crescimento micelial e produção de conídios em colônias de *M. anisopliae* ESALQ 1256 com e sem micovírus

Foram utilizadas cinco colônias de *M. anisopliae* ESALQ 1256 obtidas por cultivo monoconidial, sendo em que duas delas os vírus haviam sido eliminados e três permaneciam infectadas por vírus de RNAd (Figura 4). Inicialmente o fungo foi inoculado em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA Difco® e mantido em câmara climatizada por oito dias. Após a conidiogênese, os conídios presentes na placa foram utilizados para a preparação de suspensões com os diferentes tratamentos e foram padronizadas na concentração de 1×10^6 conídios/mL.

O experimento foi constituído de cinco placas de Petri (60x15mm) contendo 10 mL de meio de cultura BDA Difco® para cada colônia com e sem os vírus. Foi inoculado 1µL da suspensão no centro de cada placa de Petri e as placas foram mantidas em condições controladas até o crescimento das colônias.

Os parâmetros avaliados foram o número médio de conídios e o diâmetro (cm) de cada colônia. Este experimento foi repetido três vezes no tempo para a confirmação dos resultados.

4.2.6 Virulência de *M. anisopliae* com e sem micovírus contra larvas de *Tenebrio molitor*

As colônias isogênicas de *M. anisopliae* ESALQ 1256 com e sem vírus de RNAd (Figura 4) foram multiplicadas em meio de cultura BDA Difco® para a obtenção de conídios. O delineamento experimental foi constituído de seis tratamentos, sendo eles: *M. anisopliae* ESALQ 1256 com vírus de RNAd (Figura 4: 1, 3 e 5); *M. anisopliae* ESALQ 1256 sem vírus de RNAd (Figura 4: 2 e 4) e uma testemunha (água destilada). Os fungos foram testados em

seis diferentes concentrações, 1×10^6 conídios/ mL, 5×10^6 conídios/ mL, 1×10^7 conídios/ mL, 5×10^7 conídios/ mL, 1×10^8 conídios/ mL e 5×10^8 conídios/ mL.

As suspensões foram preparadas com conídios produzidos em placas de Petri contendo meio BDA Difco® e suspensos em água destilada estéril com espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%. A aplicação de 2 mL de suspensão por placa de Petri foi realizada em uma torre de Potter com pressão de 15 libras/ pol². A viabilidade dos conídios foi determinada por meio da metodologia descrita por Oliveira (2009).

Cada tratamento foi constituído por cinco repetições representadas por placas de Petri contendo dez larvas de terceiro instar de *Tenebrio molitor*, totalizando 50 insetos por tratamento. Este experimento foi repetido duas vezes no tempo. As placas de Petri foram mantidas em condições controladas e as larvas foram alimentadas diariamente com pão e batata.

As avaliações foram realizadas diariamente durante 30 dias com a contagem e retirada dos insetos mortos. A confirmação da mortalidade por fungos foi realizada por meio da visualização dos conídios de *Metarhizium* sob os cadáveres dos insetos mantidos em câmara úmida.

4.2.7 Tolerância de *M. anisopliae* com e sem micovírus ao calor

As colônias isogênicas de *M. anisopliae* ESALQ 1256 com e sem vírus de RNAfd (Figura 4) foram multiplicadas em meio de cultura BDA Difco® para a obtenção de conídios. Suspensões padronizadas na concentração de 1×10^6 conídios/ mL dos diferentes tratamentos mantidas em tubos para microcentrífuga de 1,5 mL foram colocados em banho-maria a 40°C e 50°C por 0, 1, 4, 8 e 12 horas e a 45°C por 0, 0,5, 1, 2 e 3 horas. Em cada um desses intervalos, uma alíquota de 150 µL de cada tratamento foi retirada e utilizada para a verificação da viabilidade dos conídios de acordo com metodologia descrita por Oliveira (2009). Para cada tratamento (fungo/ hora) foram avaliadas quatro repetições.

4.2.8 Tolerância de *M. anisopliae* com e sem micovírus aos raios ultravioletas

Os fungos com e sem vírus de RNAfd (Figura 4) de *M. anisopliae* foram multiplicados em meio BDA Difco® para obtenção de conídios. Os conídios foram utilizados para o preparo de suspensões padronizadas na concentração de 1×10^6 conídios/ mL e inoculados em placas tipo Rodac® contendo meio de cultura (OLIVEIRA, 2009). A irradiação dos raios ultravioleta

sobre as placas foi realizada dentro de uma câmara (133 cm x 88 cm x 50 cm) contendo quatro lâmpadas fluorescentes UV-B 313 EL da Q-Lab Corporation (EUA). As placas foram submetidas à irradiação ultravioleta de $1.312,4 \text{ mW m}^{-2}$ por 0, 1, 2, 3 e 4 horas. As placas foram cobertas com um filtro de diacetato para permitir a passagem da irradiação ultravioleta (UV-A) e não permitir a passagem da irradiação UV-C e espectros de UV-B que não incidem na Terra. Após a irradiação, as placas foram incubadas por 24 horas em condições controladas com ausência total de luz e foi verificada a viabilidade dos conídios de acordo com a metodologia descrita por Oliveira (2009).

4.2.9 Análises dos resultados

Os dados de crescimento micelial, produção de conídios e viabilidade foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados da CL50 foram obtidos utilizando-se o software estatístico R (2009).

Para verificar se os vírus permaneceram presentes ou ausentes nos fungos utilizados nos procedimentos descritos nos itens 4.2.5, 4.2.6, 4.2.7 e 4.2.8, dois círculos de cada colônia inicial utilizada neste experimento foram inoculados em meio líquido BD (caldo de 200g de batata cozida + 20g de dextrose/ litro) para a produção do micélio e extração dos ácidos nucleicos (RNAfd). A presença dos vírus foi verificada por meio da detecção dos segmentos do genoma em gel de poliacrilamida após a eletroforese. Este procedimento foi repetido três vezes para a confirmação dos resultados.

4.3 Resultados

4.3.1 Tratamento com ciclohexamida visando à eliminação dos vírus nos fungos

Observou-se por meio da EGPA que os tratamentos com ciclohexamida não foram eficientes para eliminar os vírus em nenhum dos isolados estudados.

Não foram observadas diferenças morfológicas entre as colônias dos isolados *M. anisopliae* ESALQ 1037, ESALQ 866 e ESALQ 1256 tratadas com diferentes doses de ciclohexamida. Entretanto, observou-se uma relação significativa entre o aumento da dose de ciclohexamida e a redução da produção de conídios e do crescimento micelial do isolado *M. anisopliae* ESALQ 1037 (Tabela 1). A menor produção de conídios e o menor crescimento

micelial foram observados no tratamento de 160µg de ciclohexamida por mililitro de meio de cultura.

No bioensaio com o isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26, observou-se que as colônias tratadas com ciclohexamida apresentaram maior crescimento micelial (Tabela 1) e conseqüentemente maior produção de conídios (observação visual) (Figura 2).

Figura 2 - Colônias de *Metarhizium anisopliae* PL26 tratadas com ciclohexamida nas doses de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 40 (D), 80 (E) e 160 (F) µg de ciclohexamida por mL de BDA ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas)

Tabela 1 - Número médio de conídios de colônias de *Metarhizium anisopliae* ESALQ 1037 e diâmetro (cm) médio de colônias dos isolados *M. anisopliae* ESALQ 1037 e ESALQ PL26 cultivadas em meio de cultura (BDA) contendo ciclohexamida em diferentes concentrações ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas)

µg de ciclohexamida por mL de meio	Número de conídios por colônia*	Diâmetro da colônia (centímetros)*	
		1037	PL26
0	$1,32 \pm 0,09 \times 10^9$ a	$3,61 \pm 0,05$ a	$2,35 \pm 0,35$ b
10	$1,35 \pm 0,07 \times 10^9$ a	$3,56 \pm 0,02$ a	$4,21 \pm 0,05$ a
20	$1,23 \pm 0,07 \times 10^9$ ab	$3,62 \pm 0,04$ a	$4,13 \pm 0,03$ a
40	$1,24 \pm 0,07 \times 10^9$ ab	$3,36 \pm 0,04$ a	$4,11 \pm 0,03$ a
80	$1,15 \pm 0,10 \times 10^9$ ab	$3,45 \pm 0,08$ a	$4,16 \pm 0,05$ a
160	$1,0 \pm 0,05 \times 10^9$ b	$3,04 \pm 0,12$ b	$4,17 \pm 0,04$ a

* Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No bioensaio com ESALQ PL26, em uma das colônias tratadas com ciclohexamida (Figura 3), observou-se a formação de setores. Nos setores B e C ocorreu maior produção de conídios em relação ao restante da colônia. Verificou-se que as bandas resultantes do material extraído do interior da colônia (Setor A) apresentaram maior intensidade do que aquelas resultantes da extração do setor C. Ainda, a extração do setor B não resultou em bandas na

EGPA. Dessa maneira, sugere-se que os vírus estavam presentes em abundância no setor A, enquanto no setor C estes foram pouco abundantes e no setor B não foi detectada sua presença.

Figura 3 - Colônia de *Metarhizium anisopliae* PL26 tratada com ciclohexamida na concentração de 160 µg por mL de meio BDA. As letras indicam os diferentes setores

4.3.2 Cura dos micovírus com cultivo monoconidial e transferência de ponta de hifas

Todas as 25 colônias do isolado *M. anisopliae* CTC F118 provenientes do cultivo monoconidial mantiveram os vírus de RNA de fita dupla, sendo observadas todas as bandas correspondentes aos segmentos do genoma dos vírus no gel de poliacrilamida. Das 24 colônias do isolado *M. anisopliae* CTC F8 avaliadas, 23 mantiveram as bandas correspondentes aos segmentos dos vírus e em uma das colônias não foi detectada nenhuma banda em gel de poliacrilamida, sugerindo que os vírus foram eliminados ou se apresentavam em quantidade muito pequena nos fungos, inviabilizando sua detecção por meio da eletroforese. Com o isolado *M. anisopliae* ESALQ 866 foram obtidas 35 colônias monoconidiais, e dentre estas, em cinco colônias os segmentos dos vírus não foram detectados.

Das 30 colônias do isolado *M. anisopliae* ESALQ 1256, em 22 delas, os micovírus não foram detectados após o cultivo monoconidial. Duas destas colônias sem vírus de RNAfd e três infectadas foram utilizadas nos experimentos posteriores para verificar os possíveis efeitos destes micovírus na fisiologia de *M. anisopliae* ESALQ 1256 (Figura 4).

Figura 4 - Migração eletroforética dos segmentos do genoma de vírus de RNAfd de colônias monoconidiais do isolado ESALQ 1256 de *M. anisopliae* infectadas (1, 3 e 5) e sem vírus de RNAfd (2 e 4)

Por meio da transferência de ponta de hifas, foram obtidas 23 colônias do isolado *M. anisopliae* ESALQ 866, oito colônias do isolado *M. anisopliae* CTC F8 e 14 colônias do isolado *M. anisopliae* CTC F118. Dentre estas, somente em quatro colônias do isolado *M. anisopliae* ESALQ 866, os vírus não foram detectados. Todas as colônias dos isolados *M. anisopliae* ESALQ CTC F8 e CTC 118 mantiveram todos os segmentos dos vírus em todas as colônias obtidas por este método.

Nas colônias provenientes do cultivo monoconidial e subcultivo por meio da transferência de ponta de hifas do isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26, diferentes padrões morfológicos foram observados. Com base na morfologia das colônias foi criada a tabela abaixo (Tabela 2) classificando por letras os diferentes padrões encontrados nas colônias de *M. anisopliae* ESALQ PL26.

Tabela 2 - Padrões morfológicos de colônias de *Metarhizium anisopliae* ESALQ PL26 formadas por meio do método de cultura monoconidial e subcultivo de ponta de hifa

---

A	Coloração predominante amarela com círculo central verde
B	Coloração predominante amarela com círculos concêntricos esverdeados
C	Coloração predominante amarela com manchas esverdeadas distribuídas aleatoriamente
D	Coloração predominante esverdeada com crescimento de micélio sobre as áreas já esporuladas
E	Coloração predominante amarela com círculo verde no centro e extremidades
F	Coloração predominante branca com poucas áreas esverdeadas
G	Coloração predominante amarela no centro e extremidades com região intermediária esverdeada
H	Coloração predominante amarela com extremidades esverdeadas
I	Colônia com formação de setores
J	Coloração predominante verde (com grande produção de conídios)

Observou-se por meio da EGPA diferentes padrões eletroforéticos para o isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26 resultantes de colônias provenientes da transferência de ponta de hifas, indicando que nem todas as colônias obtidas apresentaram todos os segmentos de vírus presentes na colônia inicial (Figura 5).

Figura 5 - Migração eletroforética de segmentos do genoma observados em diferentes colônias do isolado *Metarhizium anisopliae* ESALQ PL26 em gel de poliacrilamida (1-9), obtidas por meio da cultura monoconidial e transferência de ponta de hifas e amostra padrão de rotavírus SA-11 (M).

Todas as colônias de *M. anisopliae* ESALQ PL26 provenientes do cultivo monoconidial apresentaram o padrão eletroforético 1 (Figura 5), ou seja, mantiveram todos os segmentos dos vírus presentes na colônia inicial. As colônias que perderam alguns dos segmentos foram provenientes do subcultivo por meio da transferência de ponta de hifas. Para um mesmo padrão eletroforético dos isolados resultantes do isolamento de ponta de hifa observou-se diferentes padrões morfológicos com forma de colônia, coloração e quantidade de conídios variáveis (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação entre os padrões eletroforéticos e morfológicos de colônias de *Metarhizium anisopliae* ESALQ PL26 resultantes da técnica da transferência de ponta de hifas.

Padrão Eletroforético¹	Padrão morfológico²									
	Número de colônias analisadas que corresponde a cada padrão									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1		2	3	3	5	1	6	1	1	5
2										1
3	1									2
4		1								
5		1	1		1		1			1
6	2									
7	2	2					3			3
8								1		
9					1					

¹ Consultar figura 5; ² Consultar tabela 2

4.3.3 Produção de conídios e crescimento micelial em colônias de *M. anisopliae* ESALQ 1256 com e sem micovírus

A maior produção média de conídios foi observada nas colônias curadas dos vírus, provenientes da colônia 2 obtida por meio do cultivo monoconidial (Tabela 4). No entanto, as colônias provenientes da colônia 4, que também foi curada dos vírus por meio do cultivo monoconidial, não produziram maior quantidade de conídios, em relação as demais colônias não curadas (Tabela 4: 1, 3 e 5).

Não foi observada relação entre o diâmetro médio das colônias e a presença ou ausência de vírus. O diâmetro médio da colônia 2 sem vírus foi superior a das outras colônias exceto da colônia 5 com vírus (Tabela 4). As colônias provenientes das colônias monoconidiais 1 (com vírus), 3 (com vírus), 4 (sem vírus) e 5 (com vírus) não diferiram entre si, com relação ao crescimento micelial.

Tabela 4 - Número médio de conídios e diâmetro de colônias do isolado *Metarhizium anisopliae* ESALQ1256 com e sem vírus de RNAfd. Temperatura média de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas

Colônias ¹	Vírus ²	Número de conídios por colônia $\pm$ Erro padrão ³	Diâmetro médio das colônias (cm) $\pm$ Erro padrão ³
1	+	$1,77 \pm 0,1 \times 10^9$ b	$4,48 \pm 0,03$ b
2	-	$2,4 \pm 0,2 \times 10^9$ a	$4,61 \pm 0,06$ a
3	+	$1,54 \pm 0,1 \times 10^9$ b	$4,47 \pm 0,03$ b
4	-	$1,82 \pm 0,1 \times 10^9$ b	$4,43 \pm 0,06$ b
5	+	$1,70 \pm 0,1 \times 10^9$ b	$4,51 \pm 0,05$ ab

¹ Os perfis eletroforéticos dos vírus de RNAfd referentes as colônias monoconidiais estão representados na figura 4.

² Vírus presentes (+) ou ausentes (-)

³ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.4 Virulência de *M. anisopliae* ESALQ 1256 com e sem micovírus contra larvas de *Tenebrio molitor*

Não foram verificadas diferenças significativas entre os valores da CL_{50} dos fungos infectados ou não infectados com os vírus de RNAfd (Tabela 5). Os menores valores da CL_{50} foram verificados para os fungos livres dos vírus de RNAfd, nas duas repetições do bioensaio de virulência contra larvas de *T. molitor*, ou seja, nas colônias 2 e 4, tanto no experimento 1, quanto no experimento 2, porém, os valores dos intervalos de confiança se sobrepõem entre os diferentes tratamentos (colônias com ou sem vírus).

Contudo, algumas diferenças foram observadas entre as diferentes colônias monoconidiais. A colônia 5 (com vírus), apresentou valor de CL_{50} , superior as colônias 4 e 2 (sem vírus), no experimento 1. No experimento 2, os valores da CL_{50} das colônias 1 e 5 (com vírus), também foram superiores à colônia 2 (sem vírus).

Tabela 5. Virulência do isolado *Metarhizium anisopliae* ESALQ 1256 com e sem vírus de RNAfd contra larvas de *Tenebrio molitor*. Temperatura média de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas

Colônias ¹	Vírus ²	Experimento	CL ₅₀ ± Erro padrão (conídios/ mL)	Intervalo de Confiança
1	+	1	$10,07 \pm 1,08 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7 - 2,1 \times 10^8$
2	-		$5,09 \pm 1,08 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7 - 9,7 \times 10^7$
3	+		$7,9 \pm 1,08 \times 10^7$	$4,06 \times 10^7 - 1,5 \times 10^8$
4	-		$2,15 \pm 1,08 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7 - 4,08 \times 10^7$
5	+		$20,09 \pm 1,08 \times 10^7$	$1,01 \times 10^8 - 4,3 \times 10^8$
1	+	2	$60,21 \pm 1,08 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8 - 1,2 \times 10^9$
2	-		$10,28 \pm 1,07 \times 10^7$	$7,49 \times 10^7 - 2,19 \times 10^8$
3	+		$30,82 \pm 1,08 \times 10^7$	$2,06 \times 10^8 - 7,1 \times 10^8$
4	-		$22,99 \pm 1,08 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8 - 5,4 \times 10^8$
5	+		$50,41 \pm 1,08 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8 - 1,04 \times 10^9$

¹ Os perfis eletroforéticos dos vírus de RNAfd referentes as colônias monoconidiais estão representados na figura 4.

² Vírus presentes (+) ou ausentes (-).

4.3.5 Tolerância de *M. anisopliae* ESALQ 1256 com e sem micovírus ao calor

Não foi observada relação entre a presença ou ausência de vírus e a tolerância a temperaturas elevadas. Na temperatura de 50°C os conídios foram inviabilizados após a primeira hora do experimento em todas as colônias (dados não mostrados), enquanto que, na temperatura de 40°C , os conídios permaneceram com alta viabilidade mesmo após 12 horas de submersão (Tabela 6). A viabilidade foi reduzida após 12 horas de submersão a 40°C , apenas nos tratamentos 4 (sem vírus) e 5 (com vírus).

Na temperatura de 45°C , a viabilidade foi reduzida após a primeira hora de submersão em todos os tratamentos, sendo que após três horas de submersão quase todos os conídios foram inviabilizados (Tabela 7). As colônias provenientes da colônia monoconidial 2 (sem vírus), foram mais tolerantes em relação às demais após uma hora de submersão, não diferindo apenas das colônias provenientes da colônia 5 (com vírus), entretanto, esta diferença não se manteve após duas horas de submersão (Tabela 7).

4.3.6 Tolerância de *M. anisopliae* ESALQ 1256 com e sem micovírus à irradiação ultravioleta

A viabilidade dos conídios foi reduzida após 2 horas de irradiação ultravioleta tanto nas colônias sem vírus, quanto nas infectadas (Tabela 8). Após 4 horas de irradiação UV-A, todos os conídios foram inviabilizados. Não houve diferença na viabilidade dos conídios após a irradiação UV-A para nenhum dos tempos avaliados entre as colônias.

Tabela 6 - Viabilidade (%) de conídios de *Metarhizium anisopliae* ESALQ 1256 com e sem vírus de RNAfd mantidas a 40°C por 0, 1, 4, 8 e 12 horas

Colônia	Viabilidade (%) de conídios submersos à temperatura de 40°C				
	0 h	1 h	4 h	8 h	12 h
1 (+)	100 ± 4,9 Aa	99 ± 0,7 Aa	99 ± 0,2 Aa	94 ± 0,2 Aab	87 ± 0,2 Ab
2 (-)	100 ± 0,3 Aa	99 ± 0,3 Aa	98 ± 0,9 Aa	98 ± 0,8 Aa	96 ± 0,3 Aa
3 (+)	99 ± 1,1 Aa	93 ± 1,9 Aa	98 ± 0,6 Aa	95 ± 5,3 Aa	91 ± 0,5 Aa
4 (-)	99 ± 5,5 Aa	99 ± 0,8 Aa	98 ± 0,2 Aa	96 ± 0,5 Aa	70 ± 0,4 Bb
5 (+)	93 ± 4,5 Aa	98 ± 1,8 Aa	96 ± 0,9 Aa	94 ± 0,5 Aa	74 ± 5,2 Bb

¹ (+) = com vírus de RNAfd, (-) = sem vírus de RNAfd

² Médias (± EPM) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, em cada tratamento, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Viabilidade (%) de conídios oriundos de colônias com e sem vírus de RNAfd de *Metarhizium anisopliae* ESALQ 1256 mantidos por 0, 0.5, 1, 2 e 3 horas a 45°C

Colônia ¹	Viabilidade (%) de conídios submersos à temperatura de 45°C ²				
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	3 h
1 (+)	99 ± 0,1 Aa	96 ± 0,9 Aa	47 ± 0,4 Bb	13 ± 0,1 ABc	1 ± 0,5 Ac
2 (-)	99 ± 0,7 Aa	97 ± 1,2 Aa	65 ± 0,2 Ab	25 ± 0,3 Ac	0 ± 0,0 Ad
3 (+)	100 ± 0,0 Aa	96 ± 0,9 Aa	40 ± 0,4 Bb	25 ± 0,1 ABc	0,2 ± 0,0 Ac
4 (-)	100 ± 0,1 Aa	97 ± 0,6 Aa	38 ± 0,3 Bb	9 ± 0,1 ABc	0 ± 0,0 Ac
5 (+)	100 ± 0,0 Aa	97 ± 0,6 Aa	51 ± 0,4 ABb	7 ± 0,1 Bc	0,3 ± 0,6 Ac

¹ (+) = com vírus de RNAfd, (-) = sem vírus de RNAfd

² Médias (± EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada tratamento, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8 - Viabilidade (%) de conídios de *Metarhizium anisopliae* ESALQ 1256 com e sem vírus de RNAfd mantidas por 0, 1, 2, 3 e 4 horas sob irradiação ultravioleta ($1.312,4 \text{ mW m}^{-2}$)

Colônia ¹	Viabilidade (%) de conídios submetidos à irradiação ultravioleta ²				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
1 (+)	96 ± 0,5 Aa	96 ± 0,9 Aa	67 ± 6,04 Ab	14 ± 0,87 Ac	0 ± 0,0 Ac
2 (-)	95 ± 0,3 Aa	94 ± 0,6 Aa	74 ± 8,9 Ab	16 ± 1,68 Ac	0 ± 0,0 Ac
3 (+)	98 ± 0,3 Aa	96 ± 1,53 Aa	77 ± 4,5 Ab	17 ± 3,18 Ac	0 ± 0,0 Ac
4 (-)	97 ± 0,6 Aa	95 ± 1,56 Aa	71 ± 5,07 Ab	17 ± 9,57 Ac	0 ± 0,0 Ac
5 (+)	98 ± 0,2 Aa	96 ± 0,79 Aa	78 ± 3,8 Ab	15 ± 5,21 Ac	0 ± 0,0 Ac

¹ (+) = com vírus de RNAfd, (-) = sem vírus de RNAfd

² Médias (± EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada tratamento, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4 Discussão

Não observamos eliminação dos vírus de RNAfd com o uso de ciclohexamida em nenhum dos isolados estudados. A eficiência de eliminação dos micovírus com o uso deste inibidor de síntese protéica tem sido variável nos diferentes estudos publicados por diferentes autores. Alguns destes não verificaram cura dos fungos infectados com vírus de RNAfd com o uso de ciclohexamida (MARTINS et al., 1999; VAN DIEPENINGEN et al., 2006).

Resultados variáveis foram observados para o fungo *Aspergillus* sp. para o tratamento com ciclohexamida nas concentrações de 20, 40, 80, 160 e 320 µg/ mL de meio de cultura, sendo que, os isolados *Aspergillus* sp. NRRL 5565 e *Aspergillus* sp. NRRL 20818 aparentemente perderam os segmentos de RNAfd, enquanto que os demais isolados estudados (91-182A, 91-184G e NRRL 5919) que estavam infectados por vários segmentos de RNAfd, permaneceram infectados após o tratamento (ELIAS; COTTY, 1996). O tratamento com ciclohexamida na concentração de 50µg/mL inibiu o crescimento micelial do fungo *Pseudocercospora griseola*, e somente algumas colônias tratadas com ciclohexamida nas concentrações de 30 e 40µg/mL foram obtidas (LIMA et al., 2010). Outros autores, no entanto, observaram a perda total, ou pelo menos de alguns dos segmentos dos vírus de RNAfd com a utilização de ciclohexamida (MELZER; BIDOCHKA, 1998; DALZOTO et al., 2006; FULBRIGHT, 1984; BHATTI et al., 2011).

A redução da produção de conídios e o menor crescimento micelial observado em determinadas colônias fúngicas do isolado *M. anisopliae* ESALQ 1037 com a utilização de ciclohexamida, provavelmente não estão relacionados com a presença dos micovírus, e sim, ao efeito de ciclohexamida na fisiologia do fungo, já que este composto químico atua inibindo a tradução de proteínas, e não é específico (SIEGEL; SISLER, 1963).

Apesar do número e do tamanho dos segmentos de RNAfd, bem como, a intensidade das bandas da EGPA do isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26 não terem sido alterados após o tratamento com ciclohexamida nas diferentes dosagens, foi observado um maior crescimento micelial e produção de conídios nas colônias deste isolado. Apenas uma quantificação da abundância viral mais precisa poderia concluir se ocorre diminuição na quantidade dos vírus, para poder correlacionar a abundância dos vírus com alterações morfo-fisiológicas nos isolados.

Em uma das colônias de *M. anisopliae* ESALQ PL26 obtidas dos tratamentos com ciclohexamida observou-se a ocorrência de setores. Os vírus foram mais abundantes nos setores com conídios em comparação ao restante da colônia, ou seja, as bandas de RNAfd apresentaram maior intensidade na EGPA. Em colônias de *Aspergillus* que apresentaram setores com e sem conídios, observou-se diferença na abundância de vírus entre os diferentes setores (VAN DIEPENINGEN et al., 2006), sendo que os vírus foram mais abundantes nos setores não-esporulantes, oposto do observado neste estudo. A ocorrência de setores provavelmente não ocorreu devido ao tratamento com ciclohexamida, e sim, por outros processos genéticos e fisiológicos ocorridos nos fungos.

A eliminação dos micovírus dos isolados de *M. anisopliae* foi variável entre os diferentes isolados, sendo que algumas colônias de ESALQ 866, ESALQ 1256 e CTC F8 foram curados dos vírus por meio do cultivo monoconidial e/ ou isolamento de ponta de hifas, mas o mesmo não foi obtido para o isolado CTC 118. Níveis variáveis de sucesso na eliminação dos vírus de RNAfd de fungos por meio da técnica de cultivo monoconidial, têm sido reportados para diferentes espécies e/ ou isolados de fungos (ELIAS; COTTY, 1996; VAN DIEPENINGEN et al., 1997; MARTINS et al., 1999; LIMA et al., 2010; AZEVEDO et al., 2000). Colônias do isolado do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* P92 infectado com vírus de RNAfd foi curado dos vírus por meio do cultivo monoconidial (AZEVEDO et al., 2000). Já o fungo entomopatogênico *Metarhizium flavoviridae* não foi curado por este método de cultivo (MARTINS et al., 1999). Em *Aspergillus* nenhum segmento de vírus foi eliminado em nenhuma das colônias obtidas por meio do cultivo monoconidial (VAN DIEPENINGEN et al., 1997), entretanto, um isolado foi curado dos vírus RNAfd com o método de subcultivo por meio do isolamento de ponta de hifas.

Elias e Cotty (1996) verificaram resultados variáveis para a cura dos fungos com vírus de RNAfd presentes em isolados de *Aspergillus* por meio das técnicas de cultivo monoconidial, variando de 0 a 100% de eliminação de acordo com o isolado estudado. Resultados opostos foram verificados para os fungos basidiomiceto e ascomiceto, *Helicobasidium mompa* e *Rosellinia necatrix*, respectivamente. Quase todos os isolados destas espécies de fungos foram curadas dos micovírus de RNAfd por meio do cultivo de um único basidiósporo ou ascósporo, porém, o subcultivo por meio do isolamento de ponta de hifas foi eficiente apenas para dois isolados de *R. necatrix* dentre os 24 isolados estudados (IKEDA et al., 2004).

Outros pesquisadores têm utilizado a técnica de isolamento de ponta de hifas combinada com o inibidor de síntese protéica ciclohexamida, para a eliminação dos micovírus em algumas espécies de fungos (AMINIAN et al., 2011; VAN DIEPENINGEN et al., 2006; AOKI et al., 2009).

A presença ou ausência de determinadas bandas de vírus de RNAfd presentes no isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26 após cultivo monoconidial ou isolamento de ponta de hifas, aparentemente não apresentou relação com a maior ou menor produção de conídios nem com a variação morfológica (Tabela 3). Observou-se que as colônias formadas por meio da transferência de ponta de hifas e que mantiveram todos os segmentos de RNAfd apresentaram diferentes características morfológicas porém, quando as colônias deste isolado foram formadas com a inoculação de 1µL de suspensão de conídios por placa de Petri contendo BDA, padronizada na concentração de 1×10^7 conídios/ mL, não foi observada a mesma variação morfológica entre as colônias, ou seja, todas apresentaram morfologia e crescimento semelhantes (dados não mostrados).

Em isolados de *M. anisopliae* coletados no Canadá, observou-se que a variabilidade fenotípica ocorreu principalmente independente da infecção por vírus de RNAfd (MELZER; BIDOCHKA, 1998). Somente um dos 64 isolados de *Aspergillus* infectados com vírus de RNAfd apresentou características fenotípicas anormais, aparentemente atribuída à presença dos vírus, reforçando a idéia de que os micovírus, em sua maioria, estão associados com infecções latentes em seus hospedeiros (VAN DIEPENINGEN et al., 2006).

É possível que alterações morfológicas entre as colônias estejam relacionadas a uma variabilidade genética ou mudanças fisiológicas entre os conídios do isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26. Além disso, os vírus de RNA apresentam alta taxa de mutação (MOYA et al., 2004) e é possível que durante o processo de replicação dos vírus de RNAfd nos fungos, mutações tenham ocorrido nas diferentes colônias de fungos formadas.

O isolado *M. anisopliae* ESALQ 1256 foi selecionado para os bioensaios de crescimento, produção, virulência, tolerância ao calor e tolerância a raios UV devido a presença de maior quantidade de moléculas de RNAfd infectando este isolado, em comparação ao isolado ESALQ 866, cujos vírus também foram totalmente eliminados por meio dos métodos de cultivo monoconidial ou transferência de ponta de hifas, o que facilitou a condução e a avaliação dos experimentos.

A maior produção de conídios observada nas colônias de *M. anisopliae* ESALQ 1256 originadas da colônia monoconidial 2, sem vírus (Tabela 4), não foi observada nas colônias isogênicas da colônia monoconidial 4, que também não estavam infectadas com os vírus. Da mesma forma, Tiago et al. (2004) verificaram que o isolado *Isaria fumosorosea* P92, não apresentou maior produção de conídios quando os vírus de RNAfd foram eliminados por meio do cultivo monoconidial. Comparando isolados isogênicos de *M. anisopliae* com e sem vírus de RNAfd, foi observada menor produção de conídios, embora a diferença tenha sido pequena (menor que 2%) nas colônias curadas dos vírus com ciclohexamida, quando o fungicida dodine foi acrescentado ao meio de cultura BDA, entretanto, esta diferença não foi observada entre as colônias cultivadas em meio de cultura BDA sem dodine (MELZER; BIDOCHKA, 1998).

Resultados opostos foram observados para *Beauveria bassiana* CG25 que teve sua produção de conídios aumentada quando os vírus de RNAfd foram eliminados das colônias por meio do cultivo monoconidial seguido por tratamento com ciclohexamida (DALZOTO et al., 2006). Colônias de *M. anisopliae* var. *acridum* CG442 curadas dos vírus via anastomose hifal entre mutantes auxotróficos dos isolados *M. anisopliae* CG 291 e CG 442 também apresentaram maior produção de conídios em relação ao isolado original infectado e ao isolado transformado infectado com vírus de RNAfd (TIAGO et al., 2004).

Contudo, diferenças na produção de conídios observadas entre colônias curadas por meio do cultivo monoconidial ou por meio da mistura entre isolados ou indução de mutantes podem estar relacionadas a alterações fisiológicas causadas pela própria técnica de cura dos vírus e não, necessariamente, devido aos efeitos dos vírus de RNAfd nas colônias infectadas. É possível que a maior produção observada nas colônias do tratamento 2 (Tabela 4) seja devido às características genéticas do conídio que deu origem a colônia monoconidial utilizada no tratamento 2, e não devido a eliminação dos micovírus nestas colônias. Alguns estudos realizados com os fungos *Beauveria bassiana* e *Lecanicillium lecanii* já demonstraram que podem ocorrer diferenças nas características morfológicas e/ ou fisiológicas entre colônias formadas por um único conídio, em comparação às colônias formadas por múltiplos conídios. Estas diferenças podem resultar em maior ou menor comprimento de conídios, diferenças na produção e viabilidade de conídios e diferenças na virulência contra insetos (MADRIGAL et al., 2003; SAMSINAKOVÁ; KALALOVÁ, 1983).

Resultados semelhantes foram verificados nos experimentos de virulência contra larvas de *T. molitor*. Os micovírus presentes no isolado *M. anisopliae* ESALQ 1256, aparentemente não causam hipovirulência no fungo. Diferenças nos valores da CL₅₀ foram observadas entre as colônias monoconidiais, como também foi verificado para o crescimento micelial e produção de conídios, porém, essas diferenças não foram observadas quando comparadas as colônias infectadas ou não-infectadas com vírus. Esses resultados diferem dos observados por Melzer e Bidochka (1998), que verificaram que quando comparadas linhagens isogênicas do fungo (com e sem os vírus), as linhagens livres dos vírus apresentaram maior virulência contra larvas de *Galleria mellonella* e grilos da espécie *Gryllus domesticus* em comparação às linhagens infectadas. Da mesma forma, quando o isolado CG25 de *Beauveria bassiana* foi curado dos vírus de RNAfd, apresentou menor tempo letal contra percevejos *Euschistus heros* (DALZOTO et al., 2006).

No entanto, outros estudos mostraram que os vírus de RNAfd não causaram hipovirulência nos fungos. Não houve diferença entre a mortalidade de gafanhotos *Rhammatocerus schistocercoides* com o isolado *M. flavoviride* CG442 com ou sem os vírus de RNAfd (MARTINS et al., 1999). Este isolado com e sem vírus também foi comparado com relação à atividade enzimática de proteases, a atividade da proteína Pr 1 (importante no processo de infecção dos fungos) e atividades proteolíticas, e não foram observadas diferenças entre os fungos infectados e não infectados (TIAGO et al., 2004). Da mesma forma, não foi observada diferença na mortalidade de moscas-brancas quando comparados isolados isogênicos de *Isaria fumosorosea* P92 infectados ou curados de RNAfd, indicando que os vírus presentes neste isolado não causam hipovirulência (AZEVEDO et al., 2000), como já foi verificado para outros vírus de RNAfd que infectam fungos fitopatogênicos (WU et al., 2012; DAY et al., 1977; LAKSHMAN et al., 1998; ANAGNOSTAKIS; WAGGONER, 1981; HAMMAR et al., 1989; CASTRO et al., 2003; CHU et al., 2002).

É importante ressaltar que os vírus de RNAfd apresentam grande diversidade mesmo entre fungos da mesma espécie (MELZER; BIDOCHKA, 1998; HERRERO et al., 2012; BHATTI et al., 2012; SANTOS et al., 2013), portanto, é esperado, que os efeitos destes elementos nos fungos sejam variáveis.

Não foram observadas diferenças na viabilidade dos fungos curados ou não curados dos vírus quanto à tolerância ao calor e aos raios ultravioletas. Estudos como este são inexistentes em fungos entomopatogênicos. Entretanto, a presença de micovírus

já foi associada a alterações na produção de pigmentos em *Chyphonectria parasitica*, que são os principais responsáveis pela tolerância dos fungos aos raios ultravioletas (CHEN et al., 1996). Márquez e colaboradores (2007) também verificaram que a presença de micovírus em *Curvalaria protuberata* aumentou à tolerância do fungo ao calor, sendo que, quando os vírus foram eliminados dos fungos, estes se tornaram mais sensíveis às temperaturas mais elevadas.

Este estudo mostrou que os vírus de RNAfd presentes em isolados de *M. anisopliae* não afetam a maioria das características morfofisiológicas dos fungos. Embora tenham sido observadas diferenças em alguns dos parâmetros avaliados como, o crescimento micelial, a produção de conídios e a virulência dos fungos contra larvas de *T. molitor* em colônias curadas ou parcialmente curadas por meio do cultivo monoconidial ou isolamento de ponta de hifas, não está claro que tais alterações estejam relacionadas às infecções pelos vírus de RNAfd. Devido a grande diversidade e a dificuldade de cura, mais estudos são necessários a fim de esclarecer qual o papel biológico dos vírus de RNAfd que infectam os fungos entomopatogênicos.

Referências

- AMINIAN, P.; AZIZOLLAH, A.; ABBAS, S.; NASER, S. Effect of double-stranded RNAs on virulence and deoxynivalenol production of *Fusarium graminearum* isolates. **Journal of Plant Protection Research**, Poland, v. 51, n.1, p. 29-37, Feb., 2011.
- ANAGNOSTAKIS, S.L.; WAGGONER, P.E. Hypovirulence, vegetative incompatibility, and the growth of cankers of chestnut blight. **Phytopathology**, St Paul, v. 71, p. 1198-1202, Jun., 1981.
- AOKI, N.; MORIYAMA, H.; KODAMA, M.; ARIE, T.; TERAOKA, T.; FUKUHARA T. A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. **Virus Research**, London, v. 140, p. 179-187, Mar., 2009.

AZEVEDO, A.C.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* Deuteromycotina: Hypomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, p. 61-63, Mar., 2000.

BHATI, M.F.; JAMAL, A.; BIGNELL, E.M.; PETROU, M.A.; COUTTS, R.H.A. Incidence of dsRNA mycoviruses in a collection of *Aspergillus fumigates* isolates. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 174, p. 323-326, Oct., 2012.

BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; GIMENEZ, M.P.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 100, p. 1468-1472, Jul., 1996.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; CASTILLO, A. A Double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 228, p. 87-91, Nov., 2003.

CHEN, B.; CHEN, C.; BOWMAN, B.H.; NUSS, D.L. Phenotypic changes associated with wild-type and mutant hypovirus RNA transfection of plant pathogenic fungi phylogenetically related to *Cryphonectria parasitica*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, n.3, p. 301-310, 1996.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H.; LEE, Y.W.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2529-2534, May., 2002.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J.Z.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 1475-1481, Dec., 2006.

DAY, P.R.; DODDS, J.A.; ELLISTON, J.E.; JAYNES, R.A.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, Berlin, v. 67, p. 1393-1396, Jun., 1977.

ELIAS, K.S.; COTTY, P.J. Incidence and stability of infection by double-stranded RNA genetic elements in *Aspergillus* section *flavi* and effects on aflatoxinogenicity. **Canadian Journal of Botany**, Canadá, v. 74, p. 716-725, 1996.

FAHIMA, T.; KAZMIERCZAK, P.; HANSEN, D.R.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N.K. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Virology**, New York, v. 195, p.81-89, Jul., 1993.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy**: Classification and nomenclature of viruses. San Diego: Elsevier, 2005. P. 571-601.

FULBRIGHT, D.W. Effect of eliminating dsRNA in Hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, Berlin, v. 74, n.6, p. 722-724, Jun., 1984.

GIMÉNEZ-PECCI, M.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; MORAES, C.K.; CORRÊA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 334-339, Nov., 2002.

HAMMAR, S.; FULBRIGHT, D.W.; ADAMS, G.C. Association of double-stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma personii*. **Phytopathology**, Berlin, v. 79, p. 568-572, 1989.

HERRERO, N.; DUEÑAS, E.; QUESADA-MORGA, E.; ZABALGOGEAZCOA, I. Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n.24), p. 8523-8530, Sept., 2012.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 16, p. 473-477, Sept., 1982.

IKEDA, K.; NAKAMURA, H.; ARAKAWA, M.; MATSUMOTO, N. Diversity and vertical transmission of double-stranded RNA elements in root rot pathogens of trees, *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 108, p. 626-634, Jun., 2004.

LAKSHMAN, D.K.; JIAN, J.; TAVANTZIS, S.M. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* accurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, cidade, v. 95, p. 6425-6429, May., 1998.

LIMA, S.S.; ABADIO, A.K.R.; ARAÚJO, E.F.; KITAJIMA, E.W.; SARTORATO, A.; QUEIROZ, M.V. Mycovirus in *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of angular leaf spot in common bean. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v. 56, p. 359-365, May., 2010.

LÓPEZ, S.; ARIAS, C.F.; BELL, J.R.; STRAUS, J.H.; ESPEJO, R.T. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA-11 infectivity. **Virology**, cidade, United States, v. 144, p. 11-19, Jul., 1985.

MADRIGAL, H.C.; ROSAS, R.A.; AGUILERA, G.M.; MOJICA, H.B.; GARCIA C.F.O.; NAVARRO, L.A.A. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. **BioControl**, Dordrecht, v. 48, p. 321-334, Jun., 2003.

MÁRQUEZ, L.M.; REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J.; ROSSINCK, M.J. A virus in a fungus in a plant: Three-Way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, New York, v. 315, p. 513-515, Jan., 2007.

MARTINS, M.K.; FURNALETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, Berlin, v. 36, p. 94-97, Aug., 1999.

MELZER, M.J.; BIDOCHKA, M.J. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**, Lawrence, v. 90, p. 586-594, Jul., 1998.

MOYA, A.; HOLMES, E.C.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. **Nature Review Microbiology**, London, v. 2, p. 279-288, Apr., 2004.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. **Virus Taxonomy**: Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Springer-Verlag, 1995. 586p.

NUSS, D.L. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. **Nature**, London, v. 3, p. 632-642, Aug., 2005.

OLIVEIRA, D.G.P. **Proposta de um protocolo para avaliação de conídios de fungos entomopatênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SAMMONS, D.N.; ADDANS, L.D.; MISHIKAWA, E.E. Ultrasensitive silver base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 2, p. 135-141, Feb., 1981.

SAMSINÁKOVÁ, A.; KÁLALOVÁ, S. The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 42, p. 156-161, Sept., 1983.

SANTOS, V.; LOPES, M.S.; FREGOLENTE, M.C.D.; REZENDE, J.M.; GATTI, M.S.V.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Vírus de RNA de fita dupla em isolados brasileiros do fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp. In: SANTOS, V. **Estudo da riqueza e alterações morfofisiológicas causadas pela infecção por vírus de RNA de fita dupla no fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp.** 2013. 107p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SCHRANK, A.; BOGO, M.R.; OLIVEIRA, D.; AZEVEDO, J.L. Mycoviruses infecting isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In: EUROPEAN CONFERENCE ON FUNGAL GENETICS, 1., 1992, Nottingham. **Abstracts...** Nottingham:University of Nottingham, 1992. p. 32.

SIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. Inhibition of protein synthesis *in vitro* by cycloheximide. **Nature**, London, v. 4907, p. 675-676, Nov., 1963.

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

URAYAMA, S.; KATO, S.; SUZUKI, Y.; AOKI, N.; TUONG, L.E.M.; ARIE, T.; TERAOKA, T.; FUKUHARA, T.; MORIYAMA, H. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Journal of General Virology**, London, v. 91, p. 3085-3094, Dec., 2010.

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 43, p. 446-452, Jun., 2006.

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Heterokaryon incompatibility blocks virus transfer among natural isolates of black *Aspergilli*. **Current Genetics**, New York, v. 32, p. 209-217, Sept., 1997.

WU, M.; JIN, F.; ZHANG, J.; YANG, L.; JIANG, D.; LI, G. Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Botrytis porri*. **Journal of Virology**, Washington, v. 86 n.12, p. 6605-6019, Jun., 2012.

5 INFLUÊNCIA NUTRICIONAL NA REPLICAÇÃO DE VÍRUS DE RNA DE FITA DUPLA EM *Metarhizium anisopliae*

Resumo

Isolados de *Metarhizium anisopliae* apresentam infecções por vários vírus de RNAfd, entretanto, pouco se sabe sobre a influência dos meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos entomopatogênicos na replicação desses elementos. Neste trabalho nós constatamos que o meio de cultura (SDAY ¼ + caldo de batata) estimulou a formação de setores no isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26, e observamos que setores formados neste isolado produziram menor quantidade de conídios, bem como, menor quantidade de vírus de RNAfd em relação às colônias originais. Também foi analisada a presença e abundância dos vírus em isolados de *M. anisopliae* cultivados em diferentes meios de cultura (BDA, SDAY e arroz) e após a passagem em larvas de *T. molitor*. O subcultivo dos isolados *M. anisopliae* ESALQ PL26, *M. anisopliae* ESALQ 1256, *M. anisopliae* CTC F8 e *M. anisopliae* CTC F15, infectados por diferentes vírus de RNAfd, nos meios de cultura BDA, SDAY e meio de arroz, bem como, a passagem dos fungos em larvas de *Tenebrio molitor*, de modo geral, não afetaram a replicação dos vírus.

Palavras-chave: Micovírus; Subcultivo de fungos; Entomopatógeno; Meios de cultura

Abstract

Metarhizium anisopliae isolates exhibit infections by various dsRNA virus, however, little is known about the influence of the culture media used for the cultivation of entomopathogenic fungi on the replication of these elements. In this study we found that the culture medium (SDAY ¼ + broth potato) stimulated the formation of isolated sectors in *M. anisopliae* ESALQ PL26, and that sectors formed in this isolate produced fewer conidia, and fewer dsRNA viruses in comparison to the original colonies. In this paper, we reported the presence and abundance of virus of *M. anisopliae* isolates after successive subculture in different culture media (PDA, SDAY and rice) and after passage in *Tenebrio molitor* larvae. The repeated subculture of *M. anisopliae* isolates ESALQ PL26, ESALQ 1256, CTC F8 and CTC F15, infected by different dsRNA virus, in the culture media PDA, SDAY and rice, as well as the fungi passage in larvae of *Tenebrio molitor*, in general, did not affect the replication of the virus.

Keywords: Mycovirus; Fungi subculture; Entomopathogen; Culture medium

5.1 Introdução

Os fungos entomopatogênicos, especialmente os do gênero *Metarhizium* são amplamente utilizados para o controle de diversas pragas em todo o mundo e já são consolidados como importantes ferramentas de controle biológico. Contudo, os sistemas de produção em larga escala bem como a virulência dos isolados de fungos são aspectos muito importantes para o sucesso destes entomopatógenos no controle das pragas.

A presença de vírus de RNAfd já foi relatada em algumas espécies de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *Metarhizium* spp. (BOGO et al., 1996; MELZER; BIDOCHKA, 1998; MARTINS et al., 1999; AZEVEDO et al., 2000; GIMENEZ-PECCI et al., 2002; TIAGO et al., 2004; DALZOTO et al., 2006; HERRERO et al., 2012).

Alguns estudos associam a infecção por micovírus a prejuízos ao fungo hospedeiro que podem interferir no controle de pragas, como menor produção de conídios e redução na virulência (MELZER; BIDOCHKA, 1998; TIAGO et al., 2004; GIMÉNEZ-PECCI et al., 2002; DALZOTO et al., 2006). Contudo, a maioria dos vírus de RNAfd que infectam fungos, não causam nenhum prejuízo ao seu hospedeiro, apesar de utilizarem as suas células para a replicação e disseminação (GHABRIAL, 1998; PEARSON et al., 2009; GHABRIAL; SUZUKI, 2009). Outros ainda, apresentam efeitos benéficos, como é o caso dos vírus promotores do “fenômeno killer” em leveduras, responsáveis pela produção de antibióticos que inibem o crescimento de fungos competidores (WICKNER, 1996) e dos micovírus que infectam o fungo *Curvalaria protuberata* que promovem o aumento da tolerância destes fungos ao calor (MÁRQUEZ et al., 2007).

Shah e colaboradores (2005) observaram que conídios mais virulentos foram obtidos quando cultivados nos insetos hospedeiros, bem como, em meios mais pobres em nutrientes. Rangel et al. (2008) também verificaram que os conídios produzidos em condições de stress nutritivo foram mais virulentos e germinaram mais rapidamente em relação aos meios mais ricos. Vários estudos demonstraram também que o subcultivo em meios de cultura reduz a virulência dos fungos, sendo esta restabelecida com o subcultivo em insetos hospedeiros (DAOUST; ROBERTS, 1982; ADAMES et al., 2011; SHAH et al., 2005; SHAH et al., 2007; NAHAR et al., 2008). Contudo, a influência das condições nutricionais e subcultivos na replicação dos vírus de RNAfd em *M. anisopliae* é desconhecida.

Shah e Butt (2005) mostraram que a formação dos setores, que são regiões observadas em determinadas colônias fúngicas com características morfológicas anormais, é isolado-específica e também é influenciada pelas condições nutricionais de cultivos dos fungos. Pouco se sabe a respeito das alterações genéticas ou bioquímicas que ocorrem com os vírus de RNAfd em setores de fungos. Contudo, em colônias de *Aspergillus* infectadas com vírus de RNAfd, estes elementos foram mais abundantes nos setores sem conídios em comparação ao restante da colônia (VAN DIEPENINGEN et al., 2006). Em fungos entomopatogênicos, este aspecto ainda não foi estudado.

Em estudos preliminares realizados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/ USP, constatou-se que vários isolados de *M. anisopliae* apresentam infecção por vírus de RNA de fita dupla (SANTOS et al., 2013). Neste estudo, nós avaliamos se as condições nutricionais e/ou condições de cultivo influenciam na replicação de alguns destes micovírus em isolados de *M. anisopliae*. Também estudamos a estabilidade e abundância dos vírus de RNAfd em setores formados em colônias infectadas, bem como, a produção de conídios nestes setores.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Produção de conídios e abundância de vírus de RNAfd em colônias do isolado *Metarhizium anisopliae* ESALQ PL26 com formação de setores

O isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26 foi produzido em meio de cultura ¼ SDAY (peptona + dextrose + extrato de levedura + ágar) em caldo de batata (200g/ L) para estimular a produção de setores. Colônias com setores foram utilizadas para este experimento. As diferentes regiões de cada colônia, dentro ou fora dos setores (Figura 1), foram repicadas separadamente em placas de Petri contendo meio de cultura BDA Difco® para verificar a produção de conídios nas colônias provenientes de cada uma dessas regiões. Foi comparada também a produção de conídios de colônias formadas pela repicagem das porções da colônia original contendo conídios ou somente micélio (Figura 1). De cada uma das nove colônias avaliadas foi feitas cinco repicagens da colônia (repicadas em cinco placas diferentes) referidas como “fora do setor” e cinco repicagens dentro de cada setor independente do número de setores da colônia. Após o crescimento, a produção de conídios foi quantificada em câmara de Neubauer e os

dados de contagem foram submetidos à análise de variância e comparadas por meio do teste de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 1 - Exemplo de colônia com formação de setores, mostrando as diferentes regiões que foram analisadas com relação à produção de conídios e presença de vírus de RNAfd. Setores A e B representam as regiões das colônias com características morfológicas anormais, enquanto que as regiões com micélio e conídios, representam as regiões das colônias com características morfológicas normais do isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26

A presença e abundância dos vírus foram determinadas em setores de dezesseis colônias por meio da multiplicação das diferentes regiões das colônias em meio líquido BD (200g de batata + 20g de dextrose/ L) para a produção de micélio. O micélio foi macerado em nitrogênio líquido e utilizado para a extração de RNAfd (MELZER; BIDOCHKA, 1998; SANTOS et al., 2013). A detecção dos vírus foi realizada por meio da visualização das bandas correspondentes aos segmentos de RNAfd (Figura 2: 1) em gel de poliacrilamida (HERRING et al., 1982; SAMMONS et al., 1981). Para a confirmação dos resultados, foram realizadas duas extrações independentes de RNAfd de cada amostra e visualizadas em géis de poliacrilamida.

5.2.2 Influência da qualidade nutricional do meio de cultivo sobre a abundância de vírus de RNAfd em isolados de *Metarhizium anisopliae*

Foram utilizados nestes experimentos os isolados de *M. anisopliae* ESALQ 1256, ESALQ PL26, CTC F15 e CTC F8. Os isolados foram selecionados por conter infecção por diferentes vírus de RNAfd de acordo com o padrão eletroforético de RNAfd visualizados em gel de poliacrilamida (Figura 2). Todos estes isolados provavelmente apresentam infecções múltiplas, ou seja, estão infectados por mais de um

micovírus. Foram realizados dois experimentos sendo o primeiro utilizado para avaliar a influência da qualidade nutricional do meio de cultivo e de repicagens sucessivas sobre a estabilidade e abundância de vírus de RNAfd. Os tratamentos deste experimento estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 são descritos os tratamentos do segundo experimento que objetivou avaliar a influência da passagem do fungo pelo inseto na estabilidade e abundância de vírus de RNAfd. Os tratamentos consistiram no crescimento do fungo em um meio rico (SDAY) e meio intermediário (BDA) e posterior passagem do fungo sobre larvas de *T. molitor*.

Figura 2 – Diagrama do padrão eletroforético de RNAfd de vírus em isolados de *Metarhizium anisopliae*: ESALQ PL26 (1), CTC F15 (2), ESALQ 1256 (3), CTC F8 (4) e amostra padrão de rotavírus SA-11 (M)

Foram avaliadas três repetições de cada tratamento (Tabelas 1 e 2), sendo estas avaliações realizadas por meio da observação visual das bandas de RNAfd referentes aos segmentos dos vírus em gel de poliacrilamida. Foram utilizados como referência os padrões eletroforéticos observados nos vírus extraídos dos isolados originais (mantidos na coleção de entomopatógenos da ESALQ/ USP) (Figura 2).

Para a comparação da abundância dos vírus nos diferentes tratamentos, em ambos os experimentos foi criada uma escala de notas variando de 1 a 3, de acordo com a intensidade das bandas nos géis, sendo que a nota 1 foi dada para as bandas fracas, a nota 3 foi dada para as bandas fortes e a nota 2 foi dada para as bandas com intensidade intermediária.

Tabela 1 - Metodologia utilizada no experimento para avaliar a influência da qualidade nutricional do meio de cultivo e de repicagens sucessivas sobre a abundância de vírus de RNAfd em isolados de *Metarhizium anisopliae*. Temperatura de 26°C, umidade de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas

Tratamentos	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
1 – BDA¹ - 1 repicagem	Multiplicação dos fungos em BDA Difco ® e crescimento em condições controladas por dez dias	Crescimento dos fungos em meio BD ¹ por sete dias ³	
2 – BDA¹ – 8 repicagens	Multiplicação dos fungos em BDA Difco ® e crescimento em condições controladas por dez dias	Procedimento descrito na etapa 1 por oito vezes consecutivas	Crescimento dos fungos em meio BD ¹ por sete dias ³
3 – SDAY² – 1 repicagem	Multiplicação dos fungos em SDAY ² e crescimento em condições controladas por dez dias	Crescimento dos fungos em meio SDY ² por sete dias ³	
4 – SDAY² – 8 repicagens	Multiplicação dos fungos em SDAY ² e crescimento em condições controladas por dez dias	Procedimento descrito na etapa 1 por oito vezes consecutivas	Crescimento dos fungos em meio SDY ² por sete dias ³
5 – arroz – 1 repicagem	Multiplicação dos fungos em arroz parboilizado cozido e crescimento por dez dias	Crescimento dos fungos em meio líquido de arroz 10% e crescimento por sete dias	
6 – arroz - 8 repicagens	Multiplicação dos fungos em arroz parboilizado cozido e crescimento por dez dias	Procedimento descrito na etapa 1 por oito vezes consecutivas	Crescimento em meio líquido de arroz 10% e crescimento por sete dias ³

¹ BDA: Meio de cultura sólido à base de batata, dextrose e ágar; BD: meio líquido a base de batata e dextrose.

² SDAY: Meio sólido à base de extrato de levedura, dextrose, peptona e ágar; SDY: meio líquido à base de extrato de levedura, dextrose, peptona.

³ O micélio utilizado nas extrações de RNAfd foi liofilizado e pesado para padronizar a quantidade de fungo utilizada nos diferentes tratamentos e após a última etapa foi realizada a extração de RNAfd e eletroforese em gel de poliacrilamida em todos os tratamentos.

Tabela 2 - Metodologia utilizada para o experimento de influência da passagem do fungo pelo inseto na abundância de vírus de RNAfd em isolados de *Metarhizium anisopliae*. Temperatura de 26°C, umidade de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas

Tratamentos	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
I – BDA¹	Multiplicação dos fungos em meio BDA Difco ® e crescimento por dez dias	Multiplicação dos fungos em meio BD ¹ (pH 7,0) e crescimento por sete dias ⁴		
II – BDA¹ e passagem pelo inseto	Multiplicação dos fungos em meio BDA Difco ® e crescimento por dez dias	Inoculação dos fungos em larvas de <i>T. molitor</i> e transferência das larvas para câmara úmida até a morte dos insetos e extrusão do patógeno ³	Inoculação dos conídios retirados dos cadáveres de <i>T. molitor</i> em meio BDA Difco ® e crescimento por dez dias	Multiplicação dos fungos em meio BD ¹ (pH 7,0) e crescimento por sete dias em agitação (150 rpm) ⁴
III – SDAY²	Multiplicação dos fungos em meio SDAY ² e crescimento por dez dias	Multiplicação em meio SDY ² (pH 7,0) e crescimento por sete dias em agitação (150 rpm) ⁴		
IV – SDAY² e passagem pelo inseto	Multiplicação dos fungos em meio SDAY ² e por dez dias	Inoculação dos fungos em larvas de <i>T. molitor</i> e transferência das larvas para câmara úmida até a morte dos insetos e extrusão do patógeno ³	Inoculação dos conídios retirados dos cadáveres de <i>T. molitor</i> em meio SDAY ² e crescimento por dez dias	Multiplicação em meio SDY ² (pH 7,0) e crescimento por sete dias em agitação (150 rpm) ⁴

¹ BDA: Meio de cultura sólido a base de batata, dextrose e ágar; BD: meio líquido a batata e dextrose.

² SDAY: Meio sólido a base de extrato de levedura, dextrose, peptona e ágar; SDY: meio líquido a base de extrato de levedura, dextrose, peptona.

³ As larvas de *T. molitor* mortas foram desinfestadas superficialmente com álcool a 70% por dois segundos e hipoclorito de sódio a 4% por três minutos.

⁴ O micélio utilizado nas extrações de RNAfd foi liofilizado e pesado para padronizar a quantidade de fungo utilizada nos diferentes tratamentos e após a última etapa foi realizada a extração de RNAfd e eletroforese em gel de poliacrilamida em todos os tratamentos.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Produção de conídios e abundância de vírus de RNAfd em colônias de *M. anisopliae* com formação de setores

Das 92 colônias de *M. anisopliae* produzidas em meio de cultura SDAY em caldo de batata, 53 apresentaram formação de setores. Os setores apresentaram diferentes características morfológicas, sendo que alguns deles apresentaram a coloração verde claro (Figura 3: exemplo 1 e 10), outros apresentaram a coloração verde escuro (Figura 3: exemplo 7 e 8), em outros, os conídios formaram círculos concêntricos (Figura 3: 2, 3 e 4), outros apresentaram algum grau de deterioração nas bordas dos setores (Figura 3: 3 e 5).

Figura 3 - Colônias de *Metarhizium anisopliae* ESALQ PL26 com formação de setores, utilizadas nos experimentos

Observou-se que os setores formados em colônias de *M. anisopliae* ESALQ PL26 apresentaram menor produção de conídios em relação às colônias originais, ou seja, fora dos setores (Tabela 3), independente da morfologia (Figura 3), quando foram repicadas em meio de cultura BDA Difco®. A maior produção das colônias, fora dos setores, ocorreu tanto nas colônias provenientes da repicagem de conídios, quanto daquelas repicadas das regiões de coloração branca das colônias contendo apenas micélio e aparentemente sem conídios (Tabela 3).

Tabela 3 - Número médio estimado de conídios de *Metarhizium anisopliae* ESALQ PL26 dentro e fora de setores formados em colônias cultivadas em meio de cultura. Temperatura média de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas

Colônias	Número de conídios $\times 10^8$ / colônia $\pm$ Erro padrão ¹				
	Fora do setor (área com conídios)	Fora do setor (área sem conídios, somente micélio)	Setor A	Setor B	Setor C
1	$3,13 \pm 1,2$ a	-	$0,85 \pm 0,3$ b	-	-
2	$11,17 \pm 1,6$ a	-	$0,92 \pm 0,13$ b	-	-
3	$4,7 \pm 0,005$ b	$11,2 \pm 0,02$ a	$0,57 \pm 0,006$ c	$0,67 \pm 0,03$ c	-
4	-	$7,2 \pm 0,01$ a	$1,5 \pm 0,03$ b	$0,56 \pm 0,006$ b	$0,14 \pm 0,04$ b
5	$11,2 \pm 0,09$ a	-	$2,4 \pm 0,04$ b	$3,22 \pm 0,05$ b	-
6	$3,5 \pm 0,01$ a	$11,2 \pm 0,02$ a	$0,75 \pm 0,02$ b	$0,85 \pm 0,02$ b	-
7	$8,63 \pm 0,06$ a	-	$0,85 \pm 0,2$ b	-	-
8	$8,2 \pm 0,01$ b	$13,1 \pm 0,0006$ a	$0,99 \pm 0,01$ c	$0,021 \pm 0,07$ c	-
9	$6,4 \pm 0,01$ a	$6,8 \pm 0,009$ a	$0,63 \pm 0,01$ b	$0,87 \pm 0,006$ b	-

¹ Médias seguidas da mesma letra na mesma linha, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nas colônias repicadas da região contendo somente micélio das colônias 3 e 8, observou-se maior produção de conídios em comparação às colônias repicadas da região contendo conídios (Tabela 3), enquanto que nas demais colônias em que este aspecto foi avaliado (4, 6 e 9) não houve diferença entre as colônias provenientes das repicagens das regiões da colônia original contendo conídios ou somente micélio.

A abundância de vírus de RNA_{fd} foi menor nos setores em comparação ao restante da colônia na maioria das colônias avaliadas (Tabela 4), independente da morfologia dos setores (Figura 3).

Dois segmentos dos vírus, com pesos moleculares de 2,0 e 1,65 kpb, respectivamente, foram perdidos nos setores A e B da colônia 6, entretanto, os demais segmentos permaneceram em ambos os setores (Tabela 4). Na colônia 7, esses mesmos segmentos foram mais abundantes no setor.

Tabela 4 - Abundância de vírus de RNAfd em colônias de *Metarhizium anisopliae* ESALQ PL26 dentro e fora de setores. Temperatura média de 26±1°C, umidade de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas

Colônias	Intensidade das bandas			
	Escala de notas de 1 a 3			
	Fora do setor	Setor A	Setor B	Setor C
1	3	1	-	-
2	3	2	2	-
3	3	2	2	1
4	3	2	3	2
5	3	2	-	-
6	3	2 ^a	2 ^a	-
7	2	1 ^b	-	-
8	3	2	2	-
9	3	2	2	-
10	3	3	2	-
11	3	1	-	-
12	3	2	-	-
13	3	2	2	-
14	3	2	-	-
15	3	2	-	-
16	2	2	-	-

^a Perda dos segmentos de 2,0 e 1,65 Kpb (Fig. 2: 1).

^b Segmentos de 2,0 e 1,65 (Fig. 2:1) mais intensos do que as demais bandas (nota 3 na escala de intensidade).

5.3.2 Influência da qualidade nutricional do meio de cultivo sobre a abundância de vírus de RNAfd em isolados de *Metarhizium anisopliae*

A intensidade das bandas de RNAfd nos géis de poliacrilamida dos fungos cultivados nos diferentes meios de cultura variou de acordo com os isolados (Tabela 5). Nos isolados ESALQ PL26 e CTC F8, as repicagens sucessivas em meio BDA e SDAY, respectivamente, favoreceram a replicação dos vírus nos fungos, ou seja, eles foram mais abundantes nos fungos após as oito repicagens.

Aparentemente não houve diferença na abundância dos vírus nos fungos multiplicados em meio BDA em comparação ao meio SDAY. Nos isolados ESALQ PL26, CTC F8 e CTC F15, os vírus foram abundantes em todas as amostras de fungos produzidos em meio de arroz, tanto após a primeira, quanto após a oitava repicagem, ou seja, receberam a nota 3 na escala de intensidade. No isolado ESALQ 1256, a abundância dos vírus de RNAfd foi reduzida em meio de arroz, após as oito repicagens sucessivas (Tabela 5).

Dois segmentos dos vírus que infectam o isolado *M. anisopliae* PL26 foram perdidos após as oito repicagens em meio BDA (Tabela 5). Entretanto, nos isolados ESALQ PL26 e CTC F15 após as oito repicagens nos meios SDAY e arroz, respectivamente, bandas extras, ou seja, que não eram detectadas nos isolados originais mantidos no banco de entomopatógenos, foram detectadas.

Tabela 5 - Influência da qualidade nutricional do meio de cultivo sobre a abundância de vírus de RNAfd em isolados de *Metarhizium anisopliae*. Temperatura de 26°C, umidade de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas

Isolados de <i>M. anisopliae</i>	Tratamentos	Intensidade das bandas Escala de notas de 1 a 3			
		Repetições			Média
		1	2	3	
ESALQ 1256	1 – BDA após 1 repicagem	3	3	3	3
	2 – BDA após 8 repicagens	3	2	2	2,3
	3 – SDAY após 1 repicagem	2	2	2	2
	4 – SDAY após 8 repicagens	2	3	3	2,7
	5 – arroz após 1 repicagem	3	3	3	3
	6 – arroz após 8 repicagens	2	2	2	2
ESALQ PL26	1 – BDA após 1 repicagem	2	2	2	2
	2 – BDA após 8 repicagens	3 ^b	3 ^b	3 ^b	3
	3 – SDAY após 1 repicagem	2	2	2	2
	4 – SDAY após 8 repicagens	2 ^a	2 ^a	2	2
	5 – arroz após 1 repicagem	3	3	3	3
	6 – arroz após 8 repicagens	3	3	-	3
CTC F8	1 – BDA após 1 repicagem	2	3	2	2,3
	2 – BDA após 8 repicagens	2	2	3	2,3
	3 – SDAY após 1 repicagem	1	2	2	1,7
	4 – SDAY após 8 repicagens	3	3	2	2,7
	5 – arroz após 1 repicagem	3	3	3	3
	6 – arroz após 8 repicagens	3	3	3	3
CTC F15	1 – BDA após 1 repicagem	3	2	2	2,3
	2 – BDA após 8 repicagens	3	3	1	2,3
	3 – SDAY após 1 repicagem	3	3	3	3
	4 – SDAY após 8 repicagens	3	2	2	2,3
	5 – arroz após 1 repicagem	3	3	3	3
	6 – arroz após 8 repicagens	3 ^c	3 ^c	-	3

^a Perda dos segmentos de 2,0 e 1,65 Kpb.

^b Três bandas extras de 2,37; 2,5 e 1,7 Kpb.

^c Quatro bandas extras de 1,5; 1,35; 2,6 e 2,55 Kpb.

A passagem dos fungos em larvas de *T. molitor* não afetou substancialmente a abundância dos vírus de RNAfd; pequenas variações foram observadas na intensidade das bandas em gel de poliacrilamida mas estas variações não foram consistentes entre os

diferentes isolados. Não houve diferença na abundância dos vírus de RNAfd nos isolados de *M. anisopliae* antes e depois da passagem em larvas de *T. molitor*, entretanto, em uma das amostras do isolado ESALQ 1256, nenhuma banda de RNAfd foi detectada em gel de poliacrilamida, após a passagem do fungo pelo inseto. Nos demais tratamentos, os vírus permaneceram nos fungos mesmo após a conidiogênese, mantendo o mesmo número de segmentos (Tabela 6).

Tabela 6 - Influência da qualidade nutricional do meio de cultivo e da passagem pelo inseto na abundância de vírus de RNAfd em isolados de *Metarhizium anisopliae*. Temperatura de 26°C, umidade de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas

		Intensidade das bandas			
		Escala de notas de 1 a 3			
Isolados de <i>M. anisopliae</i>	Tratamentos	Repetições			Média
		1	2	3	
ESALQ 1256	I – BDA ^a	3	3	3	3
	II – BDA e passagem pelo inseto	*	3	3	3
ESALQ PL26	I – BDA	1	3	3	2,3
	II – BDA e passagem pelo inseto	3	3	3	3
	III – SDAY ^b	2	2	2	2
	IV – SDAY e passagem pelo inseto	2	1	2	1,7
CTC F8	I – BDA	3	2	3	2,7
	II – BDA e passagem pelo inseto	2	3	2	2,3
	III – SDAY	2	2	2	2
	IV – SDAY e passagem pelo inseto	2	3	3	2,7
CTC F15	I – cultivo em BDA	2	3	3	2,7
	II – BDA e passagem pelo inseto	2	2	2	2

^a Meio de cultura à base de batata, dextrose e ágar.

^b Meio de cultura à base de extrato de levedura, dextrose, peptona e ágar.

* Vírus ausente ou em quantidade não detectável no gel de poliacrilamida.

5.4 Discussão

O isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26 apresentou grande formação de setores caracterizados por coloração mais esverdeada em relação ao restante das colônias, quando cultivado em meio SDAY (1/4) em caldo de batata. As colônias provenientes destes setores produziram menor quantidade de conídios em comparação ao restante das colônias quando repicadas em meio BDA Difco® (Figura 3, Tabela 3). De acordo com Wang e colaboradores (2005), várias alterações morfológicas e fisiológicas ocorrem nos setores e são sinais de degeneração dos fungos que estão sob forte estresse oxidativo. Estas alterações resultam em diversos prejuízos aos fungos, como na redução ou inibição da produção de esporos ou conídios, enzimas, metabólitos secundários, destruxinas e menor expressão de genes relacionados à virulência dos fungos nos setores (RYAN et al., 2002; WANG et al., 2005; SHAH; BUTT, 2005; LI et al., 2008).

Na maioria dos setores a quantidade de RNAfd também foi menor do que à observada no restante das colônias. Possivelmente, as alterações fisiológicas que devem ter ocorrido nos setores do fungo *M. anisopliae* ESALQ PL26 influenciaram na redução da quantidade de micovírus, já que estes elementos dependem dos nucleotídeos, aminoácidos, além da energia (ATP) produzidos pelas células hospedeiras dos fungos para a replicação deles.

Setores formados espontaneamente em *Curvalaria protuberata* também apresentaram redução na concentração de vírus de RNAfd em relação às colônias normais infectadas (MÁRQUEZ et al., 2007). O isolado Ind 1.8.16 de *Aspergilli* foi curado de parte dos vírus de RNAfd, perdendo quatro dos seis segmentos presentes no isolado original infectado com a setorização (VAN DIEPENINGEN et al., 1997).

Entretanto, outro estudo mostrou que os vírus foram mais abundantes dentro do setor não-esporulante de *Aspergillus*, ou seja, as bandas de RNAfd foram mais intensas no gel nas amostras provenientes dos setores em comparação às colônias originais, indicando que a maior replicação dos vírus poderia estar afetando a produção de esporos nos setores (VAN DIEPENINGEN et al., 2006). Bhatti e colaboradores (2011) também observaram que a infecção de um isolado de *Aspergillus fumigatus* por vírus de RNAfd resultou em fenótipo anormal com formação de setores não-esporulantes. Varga e colaboradores (1998), observaram uma banda extra de vírus de RNAfd de 4,8Kpb em um dos 20 setores avaliados do fungo *Neosartorya hiratsukae*.

O stress oxidativo, bem como, alterações ambientais resultantes de desequilíbrios nutricionais, pode resultar em alterações ou desequilíbrios na replicação dos vírus de RNA (DOMINGO; HOLLAND, 1997). A maior ou menor concentração de moléculas de RNAfd nos fungos pode ou não resultar em prejuízos ao hospedeiro. Essa relação varia de acordo com a espécie ou quasiespécie de micovírus que infectam os diferentes isolados de fungos, bem como, aos efeitos que estes elementos causam em seus hospedeiros. De modo geral, as infecções por micovírus são assintomáticas, contudo, é crescente o número de micovirose que têm sido associadas a mudanças fenotípicas em seus fungos hospedeiros (GHABRIAL; SUZUKI, 2009). Dos quatro isolados aqui estudados, apenas o isolado *M. anisopliae* ESALQ PL26, infectado por múltiplos segmentos de vírus de RNAfd, apresenta fenótipo anormal, com pouca produção de conídios e baixa virulência (dados não mostrados), e mesmo neste isolado, até o momento, não foi comprovado que os vírus de RNAfd são responsáveis por tais características dos fungos hospedeiros.

As repicagens sucessivas, de modo geral, aparentemente não afetaram a replicação dos vírus nos fungos. Na maioria dos isolados de *M. anisopliae*, os vírus mantiveram-se estáveis nos fungos, e somente ocorreu a perda de dois dos onze segmentos do isolado ESALQ PL26 após as oito repicagens em uma das amostras cultivadas em meio SDAY. Da mesma forma, os vírus permaneceram estáveis na maioria das amostras e não foram detectadas grandes mudanças na quantidade de vírus antes e depois da passagem em larvas de *T. molitor*, como exceção de uma amostra do isolado ESALQ 1256 em que nenhum dos cinco segmentos dos vírus foram detectados após a passagem pelo inseto hospedeiro (Tabela 6).

Nos tratamentos CTC F15 em meio de arroz e ESALQ PL26 em meio BDA, bandas extras foram detectadas no gel em todas as amostras avaliadas. Estas bandas extras, provavelmente correspondem a vírus de RNAfd que estavam presentes em pequenas quantidades nos fungos, foram favorecidos com a repicagem sucessiva nos respectivos meios de cultura e replicaram-se, aumentando a quantidade de material nucléico sintetizado, tornando possível a sua detecção em gel de poliacrilamida.

Vários trabalhos mostram que o meio de cultura, a passagem pelo inseto, bem como as repicagens sucessivas em meio de cultura, exercem forte influência sobre a virulência dos fungos (DAOUST; ROBERTS, 1982; DAYAKAR; KANAUIA, 2004; SHAH et al., 2005; SHAH et al., 2007; NAHAR et al., 2008; RANGEL et al., 2008; KARTHICK et al., 2009; ADAMES et al., 2011). A redução da virulência em meios

mais ricos e após sucessivas repicagens em meios de cultura é atribuída principalmente à redução da expressão de determinadas enzimas responsáveis pelo processo de infecção dos fungos nos insetos, especialmente, da enzima Pr1, que é a mais importante neste processo. Contudo, a redução da virulência devido às repicagens sucessivas em meios de cultura não têm sido associada ao aumento de vírus de RNAfd nos fungos.

Detroy et al. (1978), mostraram que as fontes de nutrientes que permitiram o melhor desenvolvimento para os fungos, conseqüentemente, favorecem a replicação dos micovírus em *Penicillium stoloniferum*. Em outro estudo realizado com o fungo *Aspergillus*, com e sem vírus de RNAfd, verificou-se que os efeitos negativos dos micovírus (menor taxa de crescimento das colônias fúngicas), foram mascarados quando o fungo foi cultivado em meio rico, tornando-se mais evidentes em meio com disponibilidade de nutrientes intermediária (VAN DIEPENINGEN et al., 2006).

A limitação de fontes energéticas não prejudica apenas o desenvolvimento e reprodução do hospedeiro, mas reduz também a replicação dos vírus no interior de suas células (DETROY et al., 1978). Entretanto, todos os meios testados (BDA, SDAY e arroz), bem como as larvas de *T. molitor*, são substratos adequados ao desenvolvimento dos fungos, e conseqüentemente, permitiram a replicação dos micovírus. O arroz, como é uma excelente fonte de amido, e um ótimo substrato de crescimento para os fungos, aparentemente, favoreceu a replicação dos micovírus, ou seja, as bandas de RNAfd nos géis foram intensas (nota 3 na escala) na maioria das amostras (Tabela 5). Apesar de o meio SDAY ser mais rico do que o meio BDA, em geral, não foram observadas diferenças na intensidade das bandas no gel entre as amostras dos dois meios.

Concluimos que a replicação dos micovírus em *M. anisopliae* parece estar relacionada com o desenvolvimento dos fungos hospedeiros. Condições adequadas ao desenvolvimento dos fungos permitiram a replicação e transmissão dos micovírus. Por outro lado, processos degenerativos nos fungos, como a setorização, ocasionaram redução na quantidade de moléculas de RNAfd produzidas nos fungos. Contudo, estudos são necessários para verificar quais as conseqüências do aumento ou da diminuição da quantidade de vírus de RNAfd nos aspectos que possam interferir no controle de pragas com *M. anisopliae*, como a produção de conídios e a virulência.

Referências

- ADAMES, M.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; PEÑA-CHORA, G.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V.M. Effects of passages through a suitable host of the acaricide-susceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. **Journal of insect Science**, India, v. 21, n.2, p. 1-13, Dec., 2011.
- AZEVEDO, A.C.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hypomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, p. 61-63, Mar., 2000.
- BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; GIMENEZ, M.P.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 100, p. 1468-1472, 1996.
- DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J.Z.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 110, p. 1475-1481, Dec., 2006.
- DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 40, p. 107-117, Jul., 1982.
- DAYAKAR, S.; KANAUIA, K.R. Effect of repeated subculturing on synthetic media on pathogenicity and biological properties of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **The Journal of Research Angra**, India, v. 32, p. 1- 6, 2004.
- DETROY, R.W.; DEMARINI, D.M.; STILL, P.E. Mycoviruses of *Penicillium stoloniferum*: influence of carbon-nitrogen nutrition upon replication. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v. 24, p. 947-953, Aug., 1978.
- DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 51, p. 151-178, Oct., 1977.
- GHABRIAL, S.A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. **Virus Genes**, NorWell, v. 16, p. 119-131, 1998.
- GHABRIAL, S.A.; SUZUKI, N. Viruses of plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 353-384, Sept., 2009.

GIMÉNEZ-PECCI, M.D.L.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; MORAES, C.K.; CORRÊA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 334-339, Nov., 2002.

HERRERO, N.; DUEÑAS, E.; QUESADA-MORGA, E.; ZABALGOGEAZCOA, I. Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n.24, p. 8523-8530, Sept., 2012.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 16, p. 473-477, Sept., 1982.

NAMASIVAYAM, S.K.R.; KUMAR, P.V. Influence of growth media on pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin against *Chilo partellus* (Swinhoe). **Journal of Biopesticides**, India, v., n.1, p. 92 – 93, Jun., 2009.

LI, L.; PISCHETSRIEDER, M.; ST. LEGER, R.J.; WANG, C. Associated links among mtDNA glycation, oxidative stress and colony sectorization in *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 45, p. 1300-1306, Sept., 2008.

MÁRQUEZ, L.M.; REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J.; ROSSINCK, M.J. A virus in a fungus in a plant: Three-Way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, New York, v. 315, p. 513-515, Jan., 2007.

MARTINS, M.K.; FURNALETO, M.C.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, Berlin, v. 36, p. 94-97, Aug., 1999.

MELZER, M.J.; BIDOCHKA, M.J. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**, Lawrence, v. 90, p. 586-594, Jul./ Aug., 1998.

NAHAR, P.B.; KULKARNI, S.A.; KULYE, M.S.; CHAVAN, S.B.; KULKARNI, G.; RAJENDRAN, A.; YADAV, P.D.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M.V. Effect of repeated in vitro sub-culturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n.4, p. 337-355, May., 2008.

PEARSON, M.N.; BEEVER, R.E.; BOINE, B.; ARTHUR, K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, n.1, p. 115-128, Jan., 2009.

RANGEL, D.E.N.; ALSTON, D.G.; ROBERTS, D.W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelia growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 1355-1361, Nov., 2008.

RYAN, M.J.; BRIDGE, P.D.; SMITH, D.; JEFFRIES, P. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 93, p. 193-168, Jul., 2002.

SANTOS, V.; LOPES, M.S.; FREGOLENTE, M.C.D.; REZENDE, J.M.; GATTI, M.S.V.; DELALIBERA JR., I. **Vírus de RNA de fita dupla em isolados brasileiros do fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp.** In: **Estudo da riqueza e alterações morfofisiológicas causadas pela infecção por vírus de RNA de fita dupla no fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp.** 2013.107p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SAMMONS, D.N.; ADDANS, L.D.; MISHIKAWA, E.E. Ultrasensitive silver base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 2, p. 135-141, Feb., 1981.

SHAH, F.A.; BUTT, T.M. Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 250, p. 201-207, Sept., 2005.

SHAH, F.A.; CHRIS, N.A.; WRIGHT, J.; BUTT, T.M. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 276, p. 60-66, Nov., 2007.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 51, n.2, p. 259-266, Oct., 2005.

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

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Heterokaryon incompatibility blocks virus transfer among natural isolates of black *Aspergilli*. **Current Genetics**, Berlin, v. 32, p. 209-217, Sept., 1997.

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. **Fungal Genetics Biology**, San Diego, v. 43, p. 446-452, Jun., 2006.

VARGA, J.; RINYU, E.; KEVEI, E.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z. Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections *Circumdati* and *Fumigati*. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v. 44, p. 589-574, Jun., 1998.

WANG, C.; BUTT, T.M.; ST LEGER, R.J. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 151, p. 3223-3236, Oct., 2005.

WICKNER, R.B. Double-Stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiological Reviews, Washington, v. 60, n.1, p. 250-265, Mar., 1996.

6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados brasileiros de *M. anisopliae* apresentam grande riqueza de vírus de RNAfd;

Os métodos de eliminação de vírus de RNAfd mais eficientes para isolados de *M. anisopliae* foram o cultivo monoconidial e o isolamento de ponta de hifas, entretanto, estes métodos não garantiram a cura em 100% dos casos;

Diferenças observadas na morfologia, crescimento, produção de conídios e virulência a larvas de *T. molitor* entre colônias de *M. anisopliae* livres de todos ou alguns dos segmentos virais, e colônias infectadas, não foram comprovadamente associadas às infecções por vírus de RNAfd;

Os vírus de RNAfd não afetaram a tolerância ao calor, nem a tolerância aos raios ultravioletas no isolado *M. anisopliae* ESALQ 1256;

Setores formados em *M. anisopliae* ESALQ PL26 produziram menor quantidade de conídios e resultaram em mudanças fenotípicas nos fungos, sendo que os vírus de RNAfd foram menos abundantes nos setores deste isolado em relação ao restante das colônias com características normais;

Repicagens sucessivas de isolados de *M. anisopliae* nos meios de cultura BDA, SDAY e em arroz não afetaram a replicação dos micovírus;

A passagem de *M. anisopliae* em larvas de *T. molitor* de modo geral, não afetou a replicação dos micovírus.