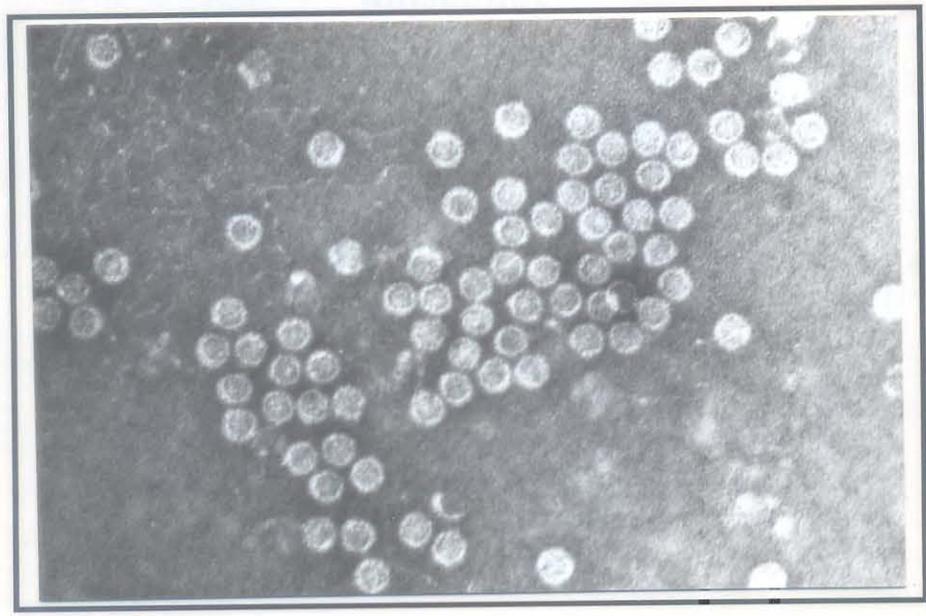


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS E RNA
DE DUPLA FITA ISOLADOS DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

Caracterização de partículas virais e RNA de dupla fita
isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium
anisopliae*



Trabalho apresentado como parte
requisito à obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular

María de la Paz Giménez Pecci

Porto Alegre, Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização de partículas virais e RNA de dupla fita
isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium
anisopliae***

María de la Paz Giménez Pecci

Prof. Dr. Augusto Schrank

Orientador

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre (RS), Brasil

1996

Membros da Banca Examinadora:

Dr. Eliot Watanabe Kitajima

- Doutor em Agronomia pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
- Professor Titular Visitante no Núcleo de Apoio à Pesquisa/Fitopatologia
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de São Paulo
Piracicaba, SP, Brasil

Dr. Oscar Grau

- Doutor em Bioquímica pela Universidade Nacional de La Plata
- Professor Titular de Química Biológica II
Faculdade de Ciências Exatas
Universidade Nacional de La Plata - Buenos Aires - Argentina
- Diretor do Centro de Investigações em Ciências Agropecuárias
Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) - Argentina

Dr. Arnaldo Zaha

- Doutor em Ciências (Bioquímica) pelo Instituto de Química - USP
- Professor Adjunto do Departamento de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
- Professor Orientador no Curso de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular - UFRGS

Orientador desta dissertação

Dr. Augusto Schrank

- Doutor em Biologia Molecular pela UMIST, Manchester, Inglaterra
- Professor Adjunto do Departamento de Biotecnologia da UFRGS
- Professor Orientador no Curso de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular - UFRGS

Este trabalho foi integralmente realizado no Centro de Biotecnología da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Augusto Schrank, pela sua orientação segura, dedicação e amizade constantes.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, pela oportunidade de realização desse trabalho, e ao Instituto de Fitopatologia e Fisiologia Vegetal do INTA por me dispensar de minhas atividades durante a execução deste trabalho.

Aos Drs. Irene Silveira Schrank e Arnaldo Zaba, pelo apoio e sugestões durante o desenvolvimento dos trabalhos e pela amizade constante. E aos Drs. Sergio Nogueira, Delia Docampo, Graziela Laguna, Elvio Biderbust, Roberto Racco, Laura Giorda e Oscar Grau pelo incentivo e motivação para a realização desse trabalho.

A Dra. Marilene Vainstein pela orientação no desenvolvimento dos experimentos de biobalística.

Ao Dr. Eliot W. Kitajima pela disponibilidade do microscópio eletrônico e a Msc M. Isabel Lima pela assistência durante a utilização do aparelho. Ao Dr. Eubio Rech pela disponibilidade do bombardeador de partículas. Ao Dr. Vahar Duane pelo convite para estudar no Brasil e pelo estágio em seu laboratório.

Aos Drs. Sandra Farias, Sergio Ceroni da Silva, Aoi Masuda, e Carlos Terragnoni, pelo apoio em algumas técnicas.

Aos colegas do laboratório Márcia Nunez Silva, Hermides Pinto Jr., Maristela Ocampos e Cláudia Corrêa, que me auxiliaram durante o desenvolvimento deste trabalho, e especial a Cláudia Augustin Rotta pela paciência e trabalho em conjunto.

Aos colegas e amigos do Centro de Biotecnologia, pela amizade constantes.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia pela paciência ao longo desse trabalho.

Ao Eduardo, pela compreensão e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho. A María Angélica e meus pais pelo apoio e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Augusto Schrank, pela sua orientação segura, dedicação e amizade constantes.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, pela oportunidade de realização desse trabalho, e ao Instituto de Fitopatologia e Fisiologia Vegetal do INTA por me dispensar de minhas atividades durante a execução deste trabalho.

Aos Drs. Irene Silveira Schrank e Arnaldo Zaha, pelo apoio e sugestões durante o desenvolvimento dos trabalhos e pela amizade constante. E aos Drs. Sergio Nome, Delia Docampo, Graciela Laguna, Elvio Biderbost, Roberto Racca, Laura Giorda e Oscar Grau pelo incentivo e motivação para a realização desse trabalho.

A Dra Marilene Vainstein pela orientação no desenvolvimento dos experimentos de biobalística.

Ao Dr. Eliot W. Kitajima pela disponibilidade do microscópio eletrônico e a MsC M. Isabel Lima pela assistência durante a utilização do aparelho. Ao Dr. Elibio Rech pela disponibilidade do bombardeador de partículas. Ao Dr. Valmir Duarte pelo convite para estudar no Brasil e pelo estágio em seu laboratório.

Aos Drs. Sandra Farias, Sergio Ceroni da Silva, Aoi Masuda, e Carlos Termignoni, pelo apoio em algumas técnicas.

Aos colegas do laboratório Márcia Nunez Silva, Hermides Pinto Jr., Maristela Ocampos e Cláudia Corrêa, que “me hicieron sentir como en casa”, em especial a Cláudia Augustin Rotta pela amizade e Maurício R. Bogo, pelas idéias, discussões e trabalho em conjunto.

Aos colegas e amigos do Centro de Biotecnologia, pela colaboração e amizade constantes.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia pela paciência ao longo desse trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas desse Curso de Pós-Graduação, em especial a Mariela Larrandaburu pela amizade.

Ao CNPq pela Bolsa de Estudos durante o desenvolvimento deste trabalho, e pela bolsa RHAIE para o desenvolvimento dos trabalhos de biobalística.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e pelo apoio amável e constante durante "mi estadía en este país hermano".

CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS E RNA DE DUPLA FITA ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*¹

Autor: María de la Paz Giménez Pecci

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

RESUMO

Micovírus são freqüentemente encontrados infectando vários gêneros de fungos. Em alguns sistemas, bem caracterizados, foi demonstrada a interferência de genes virais com o fenótipo do fungo, sendo o caso melhor documentado a hipovirulência em fungos fitopatogênicos. Em nosso laboratório, seis linhagens de *Metarhizium anisopliae*, um fungo entomopatogênico usado no controle biológico de pragas importantes em agricultura, foram analisadas para a presença de dsRNA. Todas as linhagens foram isoladas de insetos e três apresentam dsRNA viral (linhagens AI, M5 e RJ). Nosso objetivo é analisar a possível interferência dos micovírus (MaVs) com a entomopatogenicidade de *M. anisopliae*. Neste trabalho foram caracterizados três MaVs através de purificação em gradientes de CsCl, microscopia eletrônica, análise de proteínas, padrão eletroforético dos componentes dsRNA, sorologia e análise da homologia entre os componentes dsRNA individuais de um mesmo MaV e entre os componentes dsRNA dos diferentes MaVs, utilizando sondas de cDNA. As partículas virais dos MaVs RJ, AI e M5 são isométricas, com diâmetro médio de 35 nm e são separados em várias bandas em gradientes de CsCl nas densidades de flotação de 1,32 a 1,41 (MaV-RJ); 1,35 a 1,45 (MaV-AI) e 1,40 a 1,43 g/ml (MaV-M5). Espectros de absorção típicos de nucleoproteínas foram observados em todas estas bandas e nas preparações de micovírus. Após a dissociação das partículas virais foi observada a presença de componentes dsRNA com o mesmo perfil eletroforético obtido em extratos de micélio. Foi demonstrado que o ácido nucléico viral é composto por dsRNA, pela digestão enzimática específica e purificação em colunas de celulose CF11. MaV-RJ apresenta, pelo menos, treze componentes dsRNA, variando de 3,1 a 0,5 kb e um polipeptídeo majoritário do capsídeo de 46 kDa. MaV-AI apresenta, pelo menos, cinco componentes dsRNA variando de 4,1 a 1 kb e um polipeptídeo majoritário do capsídeo de 80 kDa. MaV-M5 é muito semelhante a MaV-AI em relação ao componente dsRNA de 4,1 kb e polipeptídeo majoritário, entretanto apresenta um número menor de componentes dsRNA pequenos. Durante o desenvolvimento do trabalho, MaV-AI e MaV-M5 apresentaram um padrão instável de componentes dsRNA, progressivamente mais complexo em relação aos componentes dsRNA pequenos.

¹ Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (147p.). Dezembro, 1996.

Foi caracterizado um mutante estável (linhagem RJd), derivado espontaneamente da linhagem RJ que não apresenta os componentes dsRNA de maior peso molecular, tendo apenas os nove componentes menores presentes na linhagem parental RJ. Esta linhagem derivada, RJd, apresenta morfologia da colônia alterada, contudo não temos evidências experimentais para associar diretamente estas alterações com o padrão alterado de componentes dsRNA. Anticorpos policlonais foram produzidos contra os três MaVs e mostramos que estes MaVs são sorologicamente relacionados. Em testes de dupla difusão MaV-RJ reage com antisoro contra MaV-AL e MaV-M5 indicando relações sorológicas. Em Western, todos os polipeptídeos dos capsídeos dos três MaVs, reagem com os antisoros contra MaV-AL e MaV-M5. Sondas de cDNA do componente dsRNA de 4,1 kb de MaV-AL hibridizam com os componentes de 4,1 kb de MaV-M5 e com os componentes dsRNA S2, M3 e M1 de MaV-RJ. Quando a sonda de cDNA é preparada a partir do componente dsRNA de 4,1 kb de MaV-M5 também ocorre hibridização com o componente dsRNA de mesmo tamanho de MaV-AL e com o componente dsRNA S2 de MaV-RJ. Se concluiu que os três micovírus são relacionados entre si em relação a pelo menos um componente dsRNA. Além disso, a análise de hibridização mostrou que existe homologia entre todos os componentes de MaV-RJ mas sondas a partir do componente dsRNA de 4,1 kb de MaV-AL não hibridizam com nenhum outro componente da mesma linhagem. Nossas tentativas de transferir micovírus ou dsRNA a linhagens "livres de micovírus" utilizando biobalística falharam.

CHARACTERIZATION OF VIRAL PARTICLES AND DOUBLE-STRANDED RNA ISOLATED FROM ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS

*Metarhizium anisopliae*¹

Author: María de la Paz Giménez Pecci

Supervisor: Prof. Dr. Augusto Schrank

ABSTRACT

Micovirus are frequently found infecting several genus of fungi in nature. In some, well characterised systems, the interference of viral genes with the fungal phenotype was demonstrated, as is the case of hypovirulence mediated by viral dsRNA in phytopathogenic fungi. In our laboratory, six strains of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus used in biological control of agronomic important pests, were screened for the presence of dsRNA. The strains analysed were isolated from insects and three have viral dsRNA (strains Al, M5 and RJ). We aim to access the possibility of interference of micovirus (MaVs) with the entomopathogenicity of *M. anisopliae*. In this work the MaVs were characterised through purification by CsCl gradients, electron microscopy, protein analysis, dsRNA pattern, serology and homology between individual dsRNA components within the same MaV and among the MaVs. The MaVs particles are isometric, with an average diameter of ca. 35 nm and are resolved into several bands in CsCl gradients at buoyant densities of 1.32 to 1.41 (MaV-RJ); 1.35 to 1.45 (MaV-Al) and 1.40 to 1.43 g/ml (MaV-M5). Absorbance spectra, typical of nucleoproteins, was detected in all viral preparations. The viral nucleic acid was shown to be dsRNA, by specific enzymatic digestions and cellulose-CF11 chromatography. Upon dissociation, the particles were shown to contain dsRNAs, with the same electrophoretic pattern of dsRNA components as extracted from mycelium. MaV-RJ have, at least, thirteen dsRNA components, ranging from 3.1 to 0.5 kb and one major capsid polypeptide of 46 kDa. MaV-Al have, at least, five dsRNA components, ranging from 4.1 to 1 kb and one major capsid polypeptide of 80 kDa. MaV-M5 is very similar to MaV-Al, in respect to the dsRNA component of 4.1 kb and major polypeptide, however, has fewer smaller dsRNA components. During the development of the work, MaV-Al and MaV-M5 displayed an unstable dsRNA pattern, progressively more complex in relation to the smaller components. A stable mutant (strain RJd), derived spontaneously from strain RJ, was characterised and it lacks some of the large dsRNA components and has only nine of the small dsRNA components present in the parental strain RJ. This derived strain displays altered colony morphology, nevertheless we have no experimental data to associate these alterations directly to the altered dsRNA pattern. Polyclonal antibodies were produced against the three MaVs and we show that the MaVs are serologically related to each other. In double-diffusion serological test MaV-RJ reacted with antiserum against MaV-Al and MaV-M5, indicating serological relationships. In Western blot, all capsid polypeptides of the three MaVs, reacted with both antiserum against MaV-Al and against MaV-M5. cDNA probes from the 4.1 kb-dsRNA component of MaV-Al hybridised with the 4.1 kb-dsRNA component from

¹ M.Sc. Thesis in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (147 p.). December 1996.

MaV-M5 and the S2, M3 and M1-dsRNA components from MaV-RJ. Moreover, a cDNA probe from 4.1 kb-dsRNA component from MaV-M5 hybridised with both the 4.1 kb-dsRNA component from MaV-AI and S2-dsRNA component from MaV-RJ. It was concluded that the three viruses are related to each other, at least in one dsRNA component. In addition, hybridisation analysis revealed sequence homology between all dsRNA components of MaV-RJ but probes from the 4.1 kb-dsRNA component from MaV-AI do not hybridise with any other dsRNA components of the same strain. Our attempts to transfer the MaVs to different "free of virus" strains of *M. anisopliae* by bioalistic, using both micovirus and naked dsRNA, have failed.

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Micovírus | 2 |
| 1.1.1. Históricos vírus-hemiparasitas | 2 |
| 1.1.2. Transmissão e ciclo de vida dos micovírus | 3 |
| 1.1.2.1. Transmissão experimental | 3 |
| 1.1.2.2. Ciclo de vida dos micovírus parasitando a pupa | 10 |
| 1.1.3. Classificação dos micovírus | 11 |
| 1.1.4. Propriedades físico-químicas dos micovírus | 12 |
| 1.1.4.1. Genoma dsRNA | 14 |
| 1.1.4.2. Proteínas | 15 |
| 1.1.5. Serologia | 16 |
| 1.1.6. Propriedades dos dsRNA genômicos de micovírus | 17 |
| 1.1.6.1. Aplicações como vacina dsRNA parasiticamente latente | 17 |
| 1.1.6.2. Fontes de obtenção | 18 |
| 1.1.6.3. Isolados com características genômicas relacionadas | 20 |
| 1.1.6.4. Organização genômica dsRNA | 21 |
| 1.2. O fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> | 22 |
| 1.3. Micovírus em <i>Metarhizium anisopliae</i> | 23 |
| 1.4. Objetivos Gerais | 27 |
| 1.5. Objetivos Específicos | 27 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 2.1. Organismos e plasmídeos | 28 |
| 2.1.1. Cultivo de fungos | 28 |
| 2.1.2. Isolamento de bactérias e plasmídeos | 32 |
| 2.2. Setup de 4 triplicatas | 32 |
| 2.3. Dieta | 32 |
| 2.4. Supercel | 32 |
| 2.5. Meio de cultura | 32 |
| 2.5.1. Meio de cultura para <i>Metarhizium anisopliae</i> | 32 |
| 2.5.2. Meio de cultura para <i>Muscardinia evanescens</i> | 32 |
| 2.6. Crescimento e manutenção dos organismos | 33 |
| 2.7. Determinação de partículas virais de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 36 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES..... | xvi |
| LISTA DE FIGURAS..... | xviii |
| LISTA DE TABELAS..... | xxi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Micovírus | 2 |
| 1.1.1. Relações vírus-hospedeiro | 3 |
| 1.1.2. Transmissão e cura de micovírus..... | 6 |
| 1.1.2.1. Transmissão experimental | 7 |
| 1.1.2.2. Cura de linhagens portadoras de micovírus..... | 10 |
| 1.1.3. Classificação dos micovírus | 11 |
| 1.1.4. Propriedades físico-químicas dos micovírus | 13 |
| 1.1.4.1. Genomas dsRNA | 14 |
| 1.1.4.2. Proteínas..... | 15 |
| 1.1.5. Sorologia..... | 16 |
| 1.1.6. Propriedades dos dsRNA genômicos de micovírus..... | 17 |
| 1.1.6.1. Múltiplos componentes dsRNA geneticamente únicos | 17 |
| 1.1.6.2. Formas defectivas | 18 |
| 1.1.6.3. Isolados com seqüências genômicas relacionadas..... | 20 |
| 1.1.6.4. Organização genética dos Hipovírus | 21 |
| 1.2. O fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> | 22 |
| 1.3. Micovírus em <i>Metarhizium anisopliae</i> | 25 |
| 1.4. Objetivos Gerais..... | 27 |
| 1.5. Objetivos Específicos..... | 27 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 2.1. Organismos e plasmídeos..... | 28 |
| 2.1.1. Linhagens de fungos | 28 |
| 2.1.2. Linhagens de bactérias e plasmídeos..... | 28 |
| 2.2. Soluções e tampões | 29 |
| 2.3. Enzimas | 34 |
| 2.4. Fungicidas | 34 |
| 2.5. Meios de cultura..... | 34 |
| 2.5.1. Meios de cultura para <i>Escherichia coli</i> | 34 |
| 2.5.2. Meio de cultura para <i>Metarhizium anisopliae</i> | 35 |
| 2.6. Crescimento e manutenção dos organismos..... | 35 |
| 2.7. Isolamento de partículas virais de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 36 |

| | |
|--|----|
| 2.7.1. Purificação parcial | 36 |
| 2.7.2. Purificação com PEG e gradientes de densidade de CsCl..... | 36 |
| 2.7.3. Purificação mediante gradientes isopícnicos | 37 |
| 2.8. Análise das partículas virais | 37 |
| 2.8.1. Espectrofotometria e cálculo de densidade das frações dos gradientes de CsCl | 37 |
| 2.8.2. Microscopia eletrônica..... | 38 |
| 2.9. Análise de proteínas | 39 |
| 2.9.1. Preparo de extratos protéicos totais | 39 |
| 2.9.2. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS | 39 |
| 2.9.3. Colorações de proteínas | 40 |
| 2.9.3.1. Coloração com azul de coomassie R250 | 40 |
| 2.9.3.2. Coloração com azul de coomassie coloidal | 40 |
| 2.9.3.3. Coloração com nitrato de prata | 40 |
| 2.10. Sorologia..... | 40 |
| 2.10.1. Obtenção de antisoros | 40 |
| 2.10.1.1. Preparação de antígenos..... | 41 |
| 2.10.1.2. Imunizações | 41 |
| 2.10.2. Caracterização sorológica dos micovírus | 43 |
| 2.10.2.1. Dupla difusão em gel de ágar..... | 43 |
| 2.10.2.2. Método de Western | 44 |
| 2.11. Análise de dsRNA | 45 |
| 2.11.1. Purificação de dsRNA | 45 |
| 2.11.1.1. Extração de ácidos nucleicos totais..... | 45 |
| 2.11.1.2. Tratamento com enzimas | 46 |
| 2.11.1.2.1. Tratamento com DNaseI..... | 46 |
| 2.11.1.2.2. Tratamento com Nuclease S ₁ | 46 |
| 2.11.1.2.3. Sensibilidade do dsRNA a enzimas..... | 46 |
| 2.11.1.3. Cromatografia em celulose CF-11 | 47 |
| 2.11.2. Eletroforese em gel de agarose | 47 |
| 2.11.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida | 48 |
| 2.11.4. Análise da homologia dos dsRNA..... | 48 |
| 2.11.4.1. Transferência de dsRNA para membranas de náilon..... | 48 |
| 2.11.4.2. Purificação dos componentes dsRNA de géis de agarose | 49 |
| 2.11.4.3. Purificação dos componentes dsRNA de géis de poliacrilamida | 49 |
| 2.11.4.4. Síntese de sondas moleculares | 50 |
| 2.11.4.5. Hibridização de componentes dsRNA | 50 |
| 2.12. Transmissão dos micovírus mediante biobalística | 51 |
| 2.12.1. Preparação em grande escala de DNA plasmidial..... | 51 |
| 2.12.2. Preparo das amostras receptoras..... | 51 |
| 2.12.3. Preparo das partículas | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 2.12.4. Bombardeamento com partículas | 53 |
| 2.12.5. Tratamento das amostras bombardeadas | 53 |
| 2.12.6. Seleção dos transformantes..... | 53 |
| 3. RESULTADOS | 54 |
| 3.1. Presença de dsRNA em preparações de ácidos nucleicos totais de <i>Metarhizium anisopliae</i> linhagens Al, M5, RJc e RJd..... | 54 |
| 3.2. Morfologia colonial de linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> infectadas e não infectadas | 58 |
| 3.3. Caracterização do micovírus presente na linhagem Al | 60 |
| 3.3.1. Purificação do micovírus | 60 |
| 3.3.2. Características espectrofotométricas das preparações virais | 60 |
| 3.3.3. Presença de dsRNA em preparações virais | 60 |
| 3.3.4. Proteínas em preparações virais..... | 63 |
| 3.3.5. Detecção de partículas virais | 65 |
| 3.4. Caracterização do micovírus presente na linhagem M5..... | 66 |
| 3.4.1. Purificação do micovírus | 66 |
| 3.4.2. Características espectrofotométricas das preparações virais | 67 |
| 3.4.3. Presença de dsRNA em preparações virais | 68 |
| 3.4.4. Proteínas em preparações virais..... | 69 |
| 3.4.5. Detecção de partículas virais | 69 |
| 3.5. Caracterização dos micovírus na linhagem RJc e na variante RJd | 71 |
| 3.5.1. Caracterização do micovírus presente na variante RJd | 72 |
| 3.5.1.1. Purificação do micovírus | 72 |
| 3.5.1.2. Presença de dsRNA em preparações virais..... | 74 |
| 3.5.1.3. Proteínas em preparações virais..... | 76 |
| 3.5.1.4. Detecção de partículas virais | 76 |
| 3.5.1.5. Análise das bandas de sedimentação em gradientes pré-formados de CsCl de MaV-RJd | 78 |
| 3.5.2. Caracterização do micovírus presente na linhagem RJc..... | 78 |
| 3.5.2.1. Purificação do micovírus | 78 |
| 3.5.2.2. Presença de dsRNA em preparações virais..... | 83 |
| 3.5.2.3. Proteínas em preparações virais..... | 85 |
| 3.6. Homologia entre os componentes dsRNA dos MaVs..... | 85 |
| 3.6.1. Homologia entre os componentes dsRNA de um mesmo MaV | 88 |
| 3.6.2. Homologia entre os componentes dsRNA dos diferentes MaVs..... | 98 |
| 3.7. Caracterização sorológica dos micovírus | 99 |
| 3.7.1. Imunizações | 99 |
| 3.7.2. Titulação dos antisoros | 100 |
| 3.7.3. Reação dos antisoros com dsRNAs | 103 |
| 3.7.4. Testes recíprocos em dupla difusão | 103 |
| 3.7.5. Testes recíprocos em Western | 105 |
| 3.8. Experimentos de bombardeamento | 108 |

| | |
|---|------------|
| 3.8.1. Sobrevivência de <i>M. anisopliae</i> a benomil..... | 109 |
| 4. DISCUSSÃO | 110 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 124 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 125 |

| | |
|------------------|---|
| AAU | absorvância medida a 250 nm |
| Ag | atividade da enzima a 30°C |
| APV | atividade de proteína |
| ATP | adenosina 5' triphosphate |
| BIP | 2-bromo-1-cloro-1-imidazolil-3-imidazolil |
| Ca ²⁺ | íon cálcio |
| Cl ⁻ | íon cloro |
| DMF | dimetilformamida |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| DT | DTT |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| EPN | entomopatógeno |
| Et | etileno |
| DMSO | dimetil sulfoxido |
| EtOH | etanol |
| MDW(a) | metileno-bis(2,6-dimetil-4-terc-butilfenol) |
| rRNA | ácido ribonucleico de grande subunidade |
| UTL | urea |
| UOTA | ácido ortofosfórico |
| ROTA | ácido ortofosfórico |
| g | gramas |
| h | hora |
| kb | kilobase (1.000 pares de bases) |
| KDa | kilodalton |
| ME | microscópio eletrônico |
| min | minuto |
| Mr | massa molecular |
| NBT | azul de nitro-tetrazolium |
| ng | nanograma |
| nm | nanômetro |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | |
|--|--|
| ρ | densidade de flotação (g/ml) |
| η | índice de refração |
| $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ | desoxiadenosina 5'- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ trifosfato |
| μg | micrograma |
| A_{260} | absorbância medida a 260 nm |
| Ap^r | resistência ou resistente a ampicilina |
| APS | persulfato de amônio |
| ATP | adenosina 5' -trifosfato |
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato |
| ben^r | resistência ou resistente a benomil |
| Blotto | "bovine lacto transfer technique optimizer" |
| BSA | albumina sérica bovina |
| CBB | azul de coomassie |
| cDNA | ácido desoxirribonucléico complementar |
| Ci | Curie |
| dATP | 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| DI | "defective interfering" |
| DMSO | dimetil sulfóxido |
| Dnase | desoxirribonuclease |
| dNTP(s) | desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s) |
| dsRNA | ácido ribonucléico dupla fita |
| DTT | dithioeitol |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético; sal sódico |
| EGTA | ácido etileno-glicol-bis(β -aminoetil éter) <i>N, N, N', N'</i> tetracético |
| <i>g</i> | gravidade |
| <i>h</i> | hora |
| kb | kilobase (1.000 pares de bases) |
| kDa | kilodaltons |
| ME | microscópio eletrônico |
| min | minuto(s) |
| Mr | migração relativa |
| NBT | azul de nitro tetrazolium |
| ng | nanograma |
| nm | nanômetro |

| | |
|-----------------------|--|
| nt | nucleotídeos |
| ORF | "open reading frame", fase aberta de leitura |
| p/p | peso por peso |
| p/v | peso por volume |
| PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pb | pares de bases |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| PEG | polietilenoglicol |
| PMSF | fluoreto de fenil metil sulfonato |
| poli(A ⁺) | RNA poliadenilado |
| Rnase | ribonuclease |
| rpm | rotações por minuto |
| SDS | dodecilsulfato de sódio |
| seg | segundo(s) |
| TCA | ácido tricloroacético |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> - tetrametil etileno diamina |
| Tris | Tris (hidroximetil) aminometano |
| triton X-100 | éter oxtilfenólico do decaetilenoglicol |
| Tween 80 | polioxietilenosorbitano monolaurato (80) |
| U | unidade de atividade enzimática |
| UV | radiação ultravioleta |
| v/v | volume por volume |
| VLPs | "virus like particles", partículas similares a vírus |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação esquemática do ciclo das relações patógeno-hospedeiro do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (SCHRANK <i>et al.</i> , 1993)..... | 23 |
| Figura 2. Esquema de imunização de coelhos para a obtenção de antisoros contra partículas virais isoladas das linhagens Al, M5 e RJd de <i>M. anisopliae</i> | 42 |
| Figura 3. Eletroforese em gel de preparações de ácidos nucléicos totais de diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i> | 55 |
| Figura 4. Tratamento das preparações de ácidos nucléicos totais com DNase I e RNase A..... | 57 |
| Figura 5. Tratamento das preparações de ácidos nucléicos totais com nuclease S ₁ | 57 |
| Figura 6. dsRNAs isolados de linhagens de <i>M. anisopliae</i> após a purificação em colunas de celulose CF11 | 58 |
| Figura 7. Aspecto da morfologia de colônias de <i>M. anisopliae</i> | 59 |
| Figura 8. Gradientes de CsCl de extratos da linhagem Al | 61 |
| Figura 9. Espectro de absorção das bandas de gradientes pré-formados de CsCl da linhagem Al (MaV-Al) | 62 |
| Figura 10. Eletroforese em gel dos ácidos nucléicos totais de preparações de micovírus parcialmente purificados desde diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i> | 62 |
| Figura 11. Eletroforese em gel de ácidos nucléicos totais de frações do gradiente isopícnico de CsCl da linhagem Al | 63 |
| Figura 12. Proteínas das diferentes etapas de purificação do micovírus presente na linhagem Al (MaV-Al)..... | 64 |
| Figura 13. Microscopia eletrônica do micovírus da linhagem Al | 65 |
| Figura 14. Gradientes de CsCl de extratos da linhagem M5 | 66 |
| Figura 15. Espectro de absorção das bandas de gradiente pré-formado de CsCl de extrato da linhagem M5 | 67 |

| | |
|--|-------|
| Figura 16. Eletroforese em gel de agarose de ácidos nucléicos totais de frações do gradiente isopícnico de CsCl da linhagem M5..... | 68 |
| Figura 17. Proteínas das diferentes etapas de purificação do micovírus presente na linhagem M5 (MaV-M5)..... | 70 |
| Figura 18. Microscopia eletrônica de micovírus da linhagem M5 | 71 |
| Figura 19. Gradientes de CsCl de extratos da variante RJd | 72 |
| Figura 20. Espectro de absorção da banda de gradiente pré-formado de CsCl da variante RJd..... | 73 |
| Figura 21. Absorbância a 260 nm das frações coletadas do gradiente isopícnico da variante RJd | 73 |
| Figura 22. Espectro de absorção de frações coletadas a partir de gradiente isopícnico de CsCl de extrato da variante RJd | 74 |
| Figura 23. Eletroforese em gel de ácidos nucléicos totais de frações de gradientes de CsCl da variante RJd | 75 |
| Figura 24. Proteínas das diferentes etapas de purificação do micovírus presente na variante RJd (MaV-RJd)..... | 77 |
| Figura 25. Micrografia das partículas observadas em ME..... | 79-80 |
| Figura 26. Ácidos nucléicos presentes em diferentes frações dos gradientes isopícnicos de CsCl, a partir das bandas coletadas de gradientes pré-formados de extratos da variante RJd..... | 81 |
| Figura 27. Proteínas presentes em diferentes frações dos gradientes isopícnicos de CsCl, a partir de bandas coletadas de gradientes pré-formados de extratos da variante RJd..... | 82 |
| Figura 28. Gradientes isopícnicos de extratos da linhagem RJc e sua variante RJd | 83 |
| Figura 29. Ácidos nucléicos presentes em diferentes frações dos gradientes isopícnicos de CsCl de extratos da linhagem RJc e sua variante RJd | 84 |
| Figura 30. Proteínas das diferentes etapas de purificação dos micovírus presentes na linhagem RJc e na variante RJd..... | 86 |
| Figura 31. Componentes dsRNA purificados e utilizados para sintetizar sondas de cDNA | 88 |

| | |
|--|-----|
| Figura 32. Hibridização de dsRNA da variante RJd, com cDNA do componente M1 homólogo | 90 |
| Figura 33. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente S1 da variante RJd | 91 |
| Figura 34. Hibridização de dsRNA da linhagem RJc e da variante RJd, com sondas de cDNA do componente S2 da variante RJd | 92 |
| Figura 35. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente L1 da linhagem RJc | 93 |
| Figura 36. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente M1 da variante RJc | 94 |
| Figura 37. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente S2 da variante RJd | 95 |
| Figura 38. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente L1 da linhagem M5 | 96 |
| Figura 39. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente L1 da linhagem A1 | 97 |
| Figura 40. Determinação do título do soro anti MaV-RJd | 102 |
| Figura 41. Relações sorológicas dos MaVs, por teste de dupla difusão em gel de ágar | 104 |
| Figura 42. Relações sorológicas dos MaVs, por Western blot, onde diferentes antígenos foram revelados com um antisoro | 106 |
| Figura 43. Relações sorológicas dos MaVs, por Western blot, onde diferentes antisoros reagiram com um antígeno | 107 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Coeficientes a e b para CsCl utilizados na obtenção de densidade de uma preparação (DOBROTA e HINTON, 1992)..... | 38 |
| Tabela 2: Perfil eletroforético de bandas extras de dsRNA presentes na linhagem RJc e denominação dada aos componentes que apresentam maior intensidade nos géis corados com brometo de etídio..... | 56 |
| Tabela 3: Características espectrofotométricas das bandas obtidas no gradiente pré-formado de CsCl de extratos da linhagem M5..... | 67 |
| Tabela 4: Resumo dos resultados de hibridização de componentes isolados dsRNA com os dsRNAs dos diferentes MaVs..... | 89 |
| Tabela 5: Características espectrofotométricas e concentração de micovírus utilizados como imunógenos..... | 100 |
| Tabela 6: Titulação dos soros obtidos nas imunizações, com micovírus parcialmente purificado de cada MaVs ou extrato total de micélio de cada linhagem..... | 101 |
| Tabela 7: Relações sorológicas dos MaVs das linhagens A1, M5, RJc e RJd, obtidas em testes recíprocos de dupla difusão em ágar (DD), microprecipitação e Western..... | 105 |

I. INTRODUÇÃO

Algumas propriedades típicas de fungos filamentosos importantes do ponto de vista científico e econômico. A importância econômica pode ser ilustrada pela variedade de produtos obtidos a partir destes organismos. Assim, sendo regulares, antibióticos, enzimas, vitaminas e outros tipos de outros produtos, são obtidos em escala industrial utilizando fungos filamentosos. Por outro lado, fungos parasitários, especialmente de plantas, têm impacto econômico causando grandes perdas na produção agrícola. Do ponto de vista científico, estas organizações apresentam propriedades biológicas importantes como: ciclos de vida complexos, diferenciação celular, via metabólica altamente regulada e sistemas de circulação e excreção de produtos. Essas características tornam este grupo de microrganismos interessantes como modelo de sistemas celulares para investigação básica em biologia.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* Linker é uma nova variedade de insetos. Sua patogenicidade foi demonstrada para muitos pragas de importância agrícola e para alguns vetores de doenças humanas. Este fungo é utilizado comercialmente no Brasil para controle biológico nas plantações de cana-de-açúcar e pastagens.

Micosinas são grupos de RNA virais e de isolados de diferentes fungos. O interesse em seu estudo tem sido estimulado pelas relações íntimas observadas com seus hospedeiros, envolvendo relações hospedeiro-parasita, produção de toxinas, controle da manutenção de vírus por grupos de hospedeiros, por ser possível seu uso no controle de doenças vegetais e por sua aplicação em biologia molecular (PEREIRA, 1991).

Em algumas linhagens alimentares patogênicas de *M. anisopliae*, tem sido observada a perda da infectividade à medida que os microrganismos envelhecem, sendo não foram elucidados. Foi nesse laboratório foram detectadas a presença de mais de um tipo de perfil eletroforético de rRNA e particularmente associadas a algumas linhagens de *M. anisopliae* (BICO et al., 1994).

1. INTRODUÇÃO

Algumas propriedades tornam os fungos filamentosos importantes do ponto de vista científico e econômico. A importância econômica pode ser ilustrada pela variedade de produtos obtidos a partir destes organismos. Assim, ácidos orgânicos, antibióticos, aminoácidos e enzimas, além de outros produtos, são obtidos, em escala industrial utilizando fungos filamentosos. Por outro lado fungos patogênicos, especialmente de plantas, têm impacto econômico causando grandes perdas na produção agrícola. Do ponto de vista científico, estes organismos apresentam propriedades biológicas importantes como: ciclos de vida complexos, diferenciação celular, vias metabólicas altamente reguladas e sistemas de glicosilação e excreção de proteínas. Estas características tornam este grupo de microrganismos interessantes como modelo de sistemas eucarióticos para investigação básica em biologia.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* infecta e mata uma variedade de insetos. Sua patogenicidade foi demonstrada para insetos praga de importância agrônômica e para alguns vetores de doenças humanas. Este fungo é utilizado comercialmente no Brasil para controle biológico em plantações de cana-de-açúcar e pastagens.

Micovírus com genoma dsRNA têm sido isolados de diferentes fungos. O interesse em seu estudo tem sido estimulado pelas interações pouco comuns com seus hospedeiros, envolvendo relações hospedeiro-satélite, produção de toxinas, controle da manutenção do vírus por genes do hospedeiro, por seu possível uso no controle de doenças vegetais e por sua aplicação em biologia molecular (PEREIRA, 1991).

Em algumas linhagens altamente patogênicas de *M. anisopliae*, tem sido observada a perda da infectividade a insetos, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram estudados. Em nosso laboratório foram detectadas a presença de mais de um tipo de perfil eletroforético de dsRNA e partículas virais associadas a algumas linhagens de *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1996a).

Realizamos o presente trabalho no sentido de caracterizar os diferentes micovírus presentes em três linhagens de *M. anisopliae*. A seguir faremos uma revisão da literatura abrangendo os micovírus e alguns aspectos relevantes do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.

1.1. Micovírus

O primeiro vírus de fungos foi isolado de cogumelos em 1962 (HOLLINGS, 1962), seguido pelo descobrimento de partículas semelhantes a vírus (VLPs) em algumas espécies de *Penicillium* (ELLIS e KLEINSCHMIDT, 1967; BANKS *et al.*, 1968). A caracterização bioquímica destes e de outros micovírus isolados levaram à conclusão de que o RNA dupla fita (dsRNA) é o material genético da maioria dos vírus de fungos (BUCK, 1986). Além dos genomas dsRNA contidos no capsídeo, foram identificados, em diversos fungos hospedeiros, dsRNA livre, não contido em capsídeos, geralmente denominados elementos genéticos dsRNA (WESELOSKI e WICKNER, 1984; SEROUSSI *et al.*, 1989; NUSS, 1992; ROMAINE *et al.*, 1994).

Os genomas dsRNA dos micovírus podem ou não estar segmentados em peças discretas (BOZARTH, 1979). Estas peças são referidas como segmentos quando comprovada a característica genômica dos diferentes componentes dsRNA do perfil eletroforético (BOZARTH e HARLEY, 1976; BUCK, 1986; HILLMAN *et al.*, 1994), já que estas peças, observadas como bandas individuais no perfil eletroforético de dsRNA, poderiam ser provenientes de um complexo de diferentes micovírus (infecção mista) e/ou dsRNAs, incluindo satélites, partículas defectivas ou ácidos nucléicos defectivos. Quando não há certeza da natureza genômica das bandas dos perfis eletroforéticos de dsRNA, elas recebem várias denominações na literatura, como: componentes, moléculas, elementos, espécies individuais de dsRNA, bandas, etc. (WOOD e BOZARTH, 1972; WOOD e BOZARTH, 1973; BURNETT *et al.*, 1975; THIELE *et al.*, 1984; ESTEBAN *et al.*, 1988; CHOI e NUSS, 1992a; NUSS, 1992; HILLMAN *et al.*, 1994; POLASHOCK e HILLMAN, 1994). Neste trabalho utilizamos a denominação componentes dsRNA do perfil eletroforético já que a denominação elemento normalmente é empregada para referir estruturas genômicas, como os elementos de transposição ou elementos genéticos extracromossomais, consideradas como unidades por si. Também deve ser demonstrado que são moléculas independentes, já que podem ser produtos parciais de replicação.

análise em

Os genomas dsRNAs contidos em capsídeo encontram-se empacotados dentro de partículas virais discretas. Entretanto, muitas dessas partículas têm sido caracterizadas apenas por microscópio eletrônico. Nestos casos, as partículas são denominadas partículas semelhantes a vírus (VLPs) (NUSS e KOLTIN, 1990). Contudo, a maioria dos autores emprega o termo partícula viral para definir as partículas morfológicamente semelhantes a vírus que tenham sido purificadas e demonstrado seu conteúdo de ácido nucléico, mas na maioria dos casos sua capacidade infectiva não foi demonstrada. Ainda assim, a denominação de partícula viral parece ser justificada na maioria dos sistemas (BUCK, 1986).

Os micovírus (incluindo neste termo os elementos genéticos dsRNA, isto é, os dsRNAs não contidos em capsídeos) não lisam seus hospedeiros e, diferentemente da maioria dos vírus, não existem evidências de fase extracelular no ciclo de vida nem se conhecem vetores envolvidos em sua transmissão (BUCK, 1986). Atualmente há informação de espécies de fungos que apresentam micovírus nas principais classes de fungos (BUCK, 1986; NUSS e KOLTIN, 1990) e na maioria dos grupos de fungos filamentosos (DETROY e WORDEN, 1979). Foram descritos micovírus em mais de 100 espécies de 73 gêneros de fungos (CHEN *et al.*, 1988).

1.1.1. Relações vírus-hospedeiro.

Em fungos filamentosos é freqüente a variabilidade fenotípica em morfologia, síntese de metabólitos secundários e virulência. Os esforços para explicar este fenômeno têm estimulado o interesse em elementos genéticos extracromosomais que possam modular a expressão gênica em fungos. Tais elementos podem ser micovírus, plasmídeos ou transposons. Os plasmídeos de DNA são pouco freqüentes em fungos filamentosos, e a presença de transposons tem sido descrita apenas recentemente (KINSEY e HELBER, 1989). Contrariamente, os micovírus ocorrem nos fungos em alta freqüência. Conseqüentemente é crescente o interesse em se conhecer a contribuição destes elementos na determinação da variabilidade dos seus hospedeiros (NUSS e KOLTIN, 1990).

O impacto na indústria e na agricultura de vários destes fungos que contêm micovírus, tem estimulado estudos orientados no sentido de conhecer se estes elementos citoplasmáticos intervêm no metabolismo do fungo, especialmente na síntese de micotoxinas, antibióticos e outros metabólitos secundários. A

evidência compilada até 1979 por DETROY e WORDEN indica que a maioria dos micovírus não afetam a síntese de metabólitos secundários, porém, LIU e LIANG em 1989 observaram que as linhagens de *Aspergillus niger* que possuem maiores concentrações de micovírus apresentam maior rendimento na produção industrial da enzima glicoamilase.

Há evidência de que metabólitos dos fungos apresentam ação inibitória na replicação *in vivo* de alguns micovírus. O ácido micofenólico pode regular a infecção e/ou a replicação viral *in vivo*. O mesmo efeito parece ter a toxina patulina produzida por *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., e a gliotoxina de *Penicillium stoloniferum*, na replicação do micovírus F (PsV-F) (DETROY e WORDEN, 1979).

O intercâmbio de informação entre as seqüências de dsRNA e o genoma do hospedeiro tem sido descrito como necessário em alguns casos, para a manutenção dos elementos genéticos dsRNA em seus hospedeiros (NUSS e KOLTIN, 1990). Em *Saccharomyces cerevisiae*, são necessários mais de 30 genes nucleares para a manutenção do componente dsRNA M, que codifica para a determinação do fenótipo "killer" (UEMURA e WICKNER, 1988). As linhagens "killer", produzem uma toxina protéica letal a outras linhagens não infectadas, e proteínas que inativam os efeitos das toxinas nas linhagens infectadas (imunes). A toxina e a proteína que produz a imunidade estão codificadas por um dos componentes dsRNA (M1), o qual é um satélite do micovírus L-A. O L-A e seus satélites é o sistema de micovírus com capsídeo melhor estudado. Estudos genéticos do sistema viral L-A e M1 mostram que a expressão dos produtos virais necessitam da participação de muitos genes cromossomais. Os produtos de vários genes cromossomais são necessários para o processamento da pré-toxina "killer". Os produtos de outros genes nucleares, denominados SKI, reprimem a replicação de vários genomas virais (WICKNER, 1992) e bloqueiam a expressão dos RNAs mensageiros virais (WIDNER e WICKNER, 1993).

Outros sistemas "killer", menos caracterizados e mais complexos, existem em *Ustilago maydis*. As linhagens "killer" apresentam diversos tipos de partículas virais que contém dsRNAs de diferentes tamanhos, existindo linhagens "killer", neutrais, sensíveis e supressoras da sensibilidade a toxina (BRUENN, 1980; FINKLER *et al.*, 1992). Outros fungos tais como as leveduras *Zygosaccharomyces bailii* e *Hanseniaspora uvarum* (SCHMITT e NEUHAUSEN, 1994); *Endomyces magnusii* (POSPISEK *et al.*, 1994) e o

basidiomiceto *Sporidiobolus salmonicolor* (KUTAITE *et al.*, 1990) apresentam sistemas "killer" associados à presença de dsRNA.

Os estudos do sistema "killer" em *S. cerevisiae* contribuem para o conhecimento de outros sistemas, devido ao desenvolvimento das técnicas *in vitro* de replicação, transcrição e empacotamento do componente dsRNA L-A e seus satélites, assim como ao desenvolvimento de vetores de expressão de suas proteínas *in vivo*, às análises moleculares e aos estudos de processamento, secreção e mecanismos de ação das toxinas "killer". A presença de um plasmídeo linear dsRNA encapsidado em partículas virais em eucariontes simples, oferece um sistema modelo para o estudo da biologia molecular das interações do plasmídeo com seu hospedeiro. O sistema "killer" já é usado para exclusão de contaminantes, e diversos laboratórios trabalham para seu emprego como vetores virais na produção de proteínas e peptídeos (WICKNER, 1992).

Os micovírus presentes em fungos fitopatogênicos são de interesse devido ao seu uso no controle de doenças vegetais. Foram isolados micovírus de mais de 30 espécies de fungos fitopatogênicos (NUSS e KOLTIN, 1990). As alterações fenotípicas produzidas pela presença de elementos genéticos dsRNA são muito variáveis, sendo descritas desde a ausência de alterações detectáveis até fenótipos muito alterados (RYTTER *et al.*, 1991). Em alguns casos, a associação pode ser complexa. Em *Ophiostoma (Ceratocystis) ulmi*, por exemplo, a presença de apenas alguns componentes dsRNA foram descritos em correlação com virulência alterada (BARBARA *et al.*, 1987). Na maioria dos casos, os esforços para demonstrar uma relação de causa-efeito entre um fenótipo específico e o micovírus residente é impedida pela impossibilidade de realizar os "Postulados de Koch" completos, principalmente devido ao fato de que os micovírus até o presente estudados, são incapazes de penetrar ativamente em seus hospedeiros (NUSS e KOLTIN, 1990).

Apesar destas dificuldades, atualmente existem exemplos na literatura onde é possível afirmar, com alguma confiança, que a virulência está influenciada pelos micovírus. Um dos sistemas mais bem caracterizados de interação dsRNA-hospedeiro é o do fungo fitopatógeno *Cryphonectria parasitica*. Linhagens virulentas deste fungo infectam e matam castanheiras [*Castanea dentata* (March) Borkh. e *Castanea sativa* Mill.] e foram responsáveis pelo extermínio de milhares de árvores nos Estados Unidos e Europa. Certas linhagens do fungo são hipovirulentas e além de alterações fenotípicas como morfologia colonial, cor e quantidade de conidiósporos e produção reduzida de enzimas como lacases

(ligninases), quando foram inoculadas em lesões causadas pelo fungo em castanheiras, provocaram uma regressão da doença levando a sua cura (ANAGNOSTAKIS, 1982; CHEN *et al.*, 1994). Análises detalhadas, a nível molecular, demonstraram que a diferença entre linhagens virulentas e hipovirulentas é a presença, no citoplasma das linhagens hipovirulentas, de dsRNA viral (POWELL e VAN-ALFEN, 1987). O componente dsRNA de maior peso molecular (dsRNA L) foi clonado e totalmente seqüenciado (HIREMATH *et al.*, 1986; TARTAGLIA *et al.*, 1986; SHAPIRA *et al.*, 1991a, 1991b), tendo sido caracterizada a região envolvida na determinação da hipovirulência (CHOI e NUSS, 1992a; ZHANG *et al.*, 1993).

Atualmente, linhagens hipovirulentas de *C. parasitica* são utilizadas em campo para o controle do fungo patogênico, sendo considerado um dos exemplos mais bem sucedidos de controle biológico (ANAGNOSTAKIS e DAY, 1979; DAY e DOODS, 1979). Recentemente foram construídos recombinantes mais eficientes para o controle biológico (CHEN *et al.*, 1993).

A recente aplicação da genética molecular ao estudo destes dsRNAs, que levou a um melhor entendimento das bases moleculares da hipovirulência transmissível em *C. parasitica*, está sendo usada também em outros sistemas. A otimização de sistemas de transformação em fungos e a maior disponibilidade de clones de cDNA, de vários elementos genéticos dsRNA, tem proporcionado um melhor entendimento da função dos micovírus na atenuação ou potenciação da virulência. As análises comparativas de seqüências de ácidos nucleicos de diferentes micovírus permitiram o conhecimento da origem e relação entre eles e podem levar a construção de agentes mais efetivos para regular a virulência de uma ampla variedade de fungos patogênicos, levando a um biocontrole mais efetivo (NUSS e KOLTIN, 1990).

1.1.2. Transmissão e cura de micovírus

A transmissão dos micovírus na natureza ocorre somente por via intracelular durante o crescimento das hifas, através de esporos sexuais ou assexuais e entre indivíduos por fusão de hifas compatíveis.

A maioria dos micovírus isométricos dsRNA foram encontrados nas hifas de fungos superiores (Ascomicetos, Basidiomicetos e seus anamorfos). Estas hifas são septadas e crescem por extensão do extremo apical. A região de crescimento das hifas parece ser livre de micovírus ou com conteúdos muito

baixos de partículas virais, portanto a replicação, aparentemente, têm lugar na região distal, de crescimento periférico, e as partículas virais podem ser levadas até o extremo no fluxo de protoplasma durante o crescimento da hifa (BUCK, 1986). Os poros do septo se mantêm abertos durante o crescimento da hifa, permitindo o transporte de organelas subcelulares tão grandes como o núcleo (TRINCI, 1971), e não constituem uma barreira para o movimento das partículas virais. Quando o poro do septo no compartimento apical é bloqueado antes de ocorrer a transmissão do micovírus, o crescimento subsequente será livre de vírus. Isto pode explicar a autoliberação ocasional de micovírus de alguns fungos em subculturas sucessivas. A facilidade com que isto ocorre depende da velocidade de oclusão do poro do septo. Em alguns fungos, por exemplo *Geotrichum lactis*, isto ocorre logo após a formação do septo, entretanto, em outros, o septo permanece aberto durante algum tempo após sua formação, de modo que mais de um compartimento da hifa mantém a comunicação (alguns em *Aspergillus* e *Penicillium*, e mais de 150 em *Neurospora crassa*) (BULL e TRINCI, 1977).

A transmissão dos micovírus por esporos assexuais é generalizada e eficiente em varias espécies de fungos. Isto explica porque as inoculações com uma massa de conídios mantêm constante o nível de infecção. A eficiência da transmissão através de conídios em *Penicillium* e *Piricularia* é da ordem de 90 a 100% (BUCK, 1986).

A dispersão dos micovírus por fusão celular do hospedeiro é muito eficiente, devido à alta freqüência de pareamento e fusão de hifas entre fungos na natureza. Portanto, muitos micovírus estão amplamente distribuídos em seus respectivos hospedeiros, assim por exemplo, os micovírus de *S. cerevisiae* estão presentes na maioria das linhagens. Isto resulta na ocorrência freqüente de infecções mistas e no acúmulo de dsRNAs defectivos ou satélites (BUCK, 1986).

Como resultado da alta eficiência de transmissão descrita, os micovírus não necessitariam sair da célula para sua multiplicação. Até o presente, não existem evidências de fase extracelular nem se conhecem vetores envolvidos em sua transmissão (WICKNER, 1992).

1.1.2.1. Transmissão experimental

A transmissão dos micovírus entre linhagens foi obtida somente após anastomose (NUSS, 1992). Com exceção de raros exemplos (LHOAS, 1971;

PALLET, 1972, EL-SHERBEINI e BOSTIAN, 1987), preparações livres de células não são infecciosas quando aplicadas a hifas de fungos ou esferoplastos. A impossibilidade de transmitir os micovírus por simples infecção é o principal obstáculo para a análise das alterações que causam nos hospedeiros (NUSS e KOLTIN, 1990).

Devido ao fato das amostras conterem populações heterogêneas de células infectadas em diferentes tempos, é muito difícil ou impossível, determinar a seqüência de infecção e as alterações citológicas. Sem condições experimentais adequadas para infectar o hospedeiro e comparar com hifas sadias de idade similar, é extremamente difícil atribuir algumas alterações observadas apenas à presença do micovírus (ALBOURY, 1979).

O entendimento da relação precisa dos micovírus com seu hospedeiro requer o desenvolvimento de um sistema de infecção, experimentos de exclusão dos micovírus (cura) e estudos de expressão dos genes codificados pelos dsRNAs em linhagens isogênicas, em condições ambientais controladas (NUSS e KOLTIN, 1990). Outro objetivo da transmissão experimental no estudo dos micovírus é determinar qual é o seu genoma, incluindo a elucidação do número de segmentos genômicos, diferenciando-os de ácidos nucléicos defectivos, satélites ou genomas de outros vírus presentes em infecções mistas.

A metodologia de transmissão de micovírus através de anastomose de hifas tem sido a mais bem sucedida até o presente. Através de plasmogamia por anastomose de hifas infectadas e não infectadas, de linhagens compatíveis de *C. parasitica* (MARTIN e VAN-ALFEN, 1991), foram obtidos muitos avanços no entendimento deste sistema, sendo obtida a transferência do dsRNA, que fora mantido em subculturas subseqüentes (ANAGNOSTAKIS, 1981). Uma metodologia semelhante foi empregada nos sistemas "killer" de *U. maydis* (DAY e ANAGNOSTAKIS, 1973; WOOD e BOZARTH, 1973). Neste fungo, FINKLER *et al.* (1992) obtiveram a transmissão de dsRNA e partículas virais através de mistura de citoplasma em diplóides.

Mediante fusão de protoplastos, em presença de um agente fusionante (PEG), em meio osmoticamente estabilizado, foi possível transferir micovírus entre diferentes espécies de *Aspergillus* (VARGA *et al.*, 1994). A transferência de um micovírus através de fusão de protoplastos também foi descrita em *Phaffia rhodozyma* (PFEIFFER *et al.*, 1994).

Os experimentos de transmissão através de plasmogamia têm mostrado que os micovírus são capazes de se multiplicar e invadir um hospedeiro previamente livre de vírus. Estes resultados não revelam qual é o componente infectivo, podendo ser a própria nucleoproteína ou outro componente associado ao micovírus transmitido durante a fusão de citoplasmas (LECOQ *et al.*, 1979).

As tentativas de inocular células sadias com micovírus purificado não foram bem sucedidas (LECOQ *et al.*, 1979) até 1987 quando EL-SHERBEINI e BOSTIAN mostraram que partículas virais podem ser introduzidas em células de levedura durante o processo natural de pareamento, em presença de vírus purificados, e podem se estabelecer nas células recipientes. Até o presente, esta é a única referência encontrada onde a inoculação tradicional foi descrita.

Em experimentos de transmissão a protoplastos, empregando micovírus purificados, LHOAS (1971) e PALLET (1972) relatam sucesso com o micovírus de *P. stoloniferum* (PsV-S). Entretanto, vários autores relatam insucesso nestas tentativas (BOZARTH, 1975; LAI e ZACHARIAH, 1975; BOISSONNET-MENES e LECOQ, 1976). Estes resultados levam a consideração de que não existem condições experimentais apropriadas para obter infecções reprodutíveis em protoplastos de fungos (LECOQ *et al.*, 1979; NUSS, 1992).

Em 1984, STANWAY e BUCK inocularam protoplastos de linhagens de fungos, livres de micovírus, com preparações purificadas de uma mistura de quatro micovírus, em presença de PEG, obtendo 10% de colônias de fungos infectadas, após a regeneração de protoplastos. A concentração destes vírus nas colônias recentemente infectadas foi similar às originais, e se mantiveram estáveis através de três subculturas seriadas. Em experimentos semelhantes foi obtida a transmissão de micovírus purificado de linhagens "killer" de leveduras a esferoplastos e células de *S. cerevisiae* tratadas com acetato de lítio (EL-SHERBEINI e BOSTIAN, 1987), e a esferoplastos de *Zygosaccharomyces bailli* (SCHMITT e NEUHAUSEN, 1994).

Os esforços para demonstrar a causa-efeito na relação entre um fenótipo específico e o micovírus residente, se tornaram mais eficientes com o aperfeiçoamento dos sistemas de transformação em fungos filamentosos e a disponibilidade de clones de cDNA a partir de dsRNA viral.

Clones de cDNA do componente dsRNA M2-1, presente em *S. cerevisiae*, foi sintetizado, clonado, seqüenciado e expressado em leveduras. A expressão deste cDNA conferiu o fenótipo "killer" e a imunidade ao novo hospedeiro (MESKAUSKAS e CITAVICIUS, 1992).

Foi obtida a transformação de linhagens virulentas de *C. parasitica* com cDNA do dsRNA presente em linhagens hipovirulentas (CHOI e NUSS, 1992 a, b), conferindo o caráter de hipovirulência às linhagens transformadas.

Transcritos sintéticos completos correspondentes à fita de RNA codante do dsRNA de *C. parasitica* foram infectivos quando introduzidos em esferoplastos de fungo por eletroporação. A infecção foi estabelecida em *C. parasitica* e em espécies de fungos relacionadas consideradas livres de micovírus (CHEN *et al.*, 1994). Estes resultados demonstram a utilidade dos transcritos sintéticos de micovírus para aumentar o número de hospedeiros, abrindo portanto uma aplicação potencial da hipovirulência mediada por micovírus para o controle de fungos patogênicos. Além disto, são muito promissores como ferramentas no estudo das suas funções nos fenótipos "killer" e na atenuação ou potenciação da virulência (NUSS e KOLTIN, 1990).

A metodologia de transformação por biobalística foi desenvolvida inicialmente para introduzir ácidos nucleicos através da parede celular de células vegetais intactas, usando partículas metálicas aceleradas (KLEIN *et al.*, 1987). Esta técnica foi empregada posteriormente para a transformação de células e esporos de fungos com sucesso (BARRETO *et al.*, 1994a; ST. LEGER *et al.*, 1995; BOGO *et al.*, 1996b). Foram definidas variáveis físicas e biológicas que afetam a eficiência de transformação estável em *Saccharomyces* sp e *Neurospora crassa* (ARMALEO *et al.*, 1990) e *Phytophthora* (BAILEY *et al.*, 1993). O emprego de microprojéteis biológicos (células bacterianas e vírus) é recente e as eficiências de transformação são ainda baixas (RASMUSSEN *et al.*, 1994).

1.1.2.2. Cura de linhagens portadoras de micovírus

Mediante tratamentos com calor, foi descrita a perda seletiva de alguns componentes dsRNA do sistema "killer" em *S. cerevisiae* (SOMMER e WICKNER, 1982a; WEINSTEIN *et al.*, 1993), e a cura total de *P. stoloniferum* e *P. brevi-compactum* infectados com micovírus (BANKS *et al.*, 1968; WOOD *et al.*, 1971). Com temperatura de 30°C, ocorreu a perda seletiva de alguns componentes dsRNA presentes em *Ágaricus bisporus*, conferindo o retorno a um fenótipo "normal" (MORTEN e HICKS, 1992).

A irradiação com luz UV foi utilizada com êxito na cura de micovírus em *Yarrowia lipolytica* e colônias do gênero *Aspergillus* (TRENTON *et al.*, 1987; VARGA *et al.*, 1994).

A eliminação de dsRNA foi induzida empregando tratamentos com cicloheximida em *C. parasítica* e *Mycosphaerella pinodes* (FULBRIGHT, 1984; YAMADA *et al.*, 1991) e tratamentos com nitrosoguanidina em *Septoria nodorum* (NEWTON, 1987). Foram obtidos poucos resultados em *S. nodorum* com culturas a partir de esporos únicos e subculturas de extremidades de hifas (NEWTON, 1987).

1.1.3. Classificação dos micovírus.

A maioria dos vírus dsRNA conhecidos ocorrem em fungos e representam a maioria dos micovírus (HOLLINGS, 1979). Alguns contêm capsídeo e formam partículas discretas, morfologicamente semelhantes a partículas virais clássicas. Outros dsRNA presentes em fungos não contêm capsídeo e se encontram associados a vesículas membranosas derivadas do hospedeiro (HANSEN *et al.*, 1985; ROMAINE *et al.*, 1994). A maioria das partículas virais isoladas de fungos são isométricas (BOZARH, 1979). Outras formas de partículas têm sido relatadas, contudo suas descrições têm sido menos completas. Entre elas se encontraram partículas baciliformes que apresentam grande semelhança com o vírus do mosaico da alfafa, bastões curtos; bastões filamentosos; grandes partículas semelhantes a herpesvírus; partículas grandes de 300 nm contendo lipídeos; partículas pequenas de 18 a 20 nm e um bacteriófago tipo T2 (BOZARH, 1979). Têm sido relatadas também partículas virais contendo DNA e ssRNA, contudo são pouco estudadas (HOLLINGS, 1979).

Nos micovírus isométricos dsRNA, a diversidade de suas propriedades sugere a existência de grupos taxonômicos separados: diâmetro dos virions entre 25 e 50 nm, sendo o mais típico entre 35 e 40 nm (BOZARTH, 1979), contudo foram descritas partículas de diâmetros até 60 nm (GROVES *et al.*, 1983; BOTTACIN *et al.*, 1994; ENEBAK *et al.*, 1994); com peso molecular de 6.000 a 13.000 kDa. Os capsídeos, com um envoltório só, são formados por proteínas estruturais de peso molecular entre 42 e 130 kDa, e os componentes dsRNA têm entre 240 e 2.760 kDa de peso molecular, com pesos totais de 2.040 kDa até 8.560 kDa em diferentes vírus (BUCK, 1979; HOLLINGS, 1979; WICKNER 1993).

A classificação dos micovírus dsRNA está baseada no tamanho da partícula, na velocidade de sedimentação, no tamanho e número dos componentes dsRNA, no polipeptídeo do capsídeo, na sorologia e homologia do dsRNA (BUCK *et al.*, 1984). Devido às freqüentes deleções do dsRNA, aos dsRNA satélites, ao empacotamento separado dos componentes dsRNA e a dificuldade de estabelecer o número mínimo de componentes genômicos necessários para a multiplicação viral, ainda restam muitos micovírus que não estão classificados (PEREIRA, 1991). De acordo com a organização dos ácidos nucléicos, os micovírus são agrupados em duas famílias: Totiviridae e Partitiviridae (BUCK, 1986). A primeira, contém capsídeos isométricos de 40 a 43 nm de diâmetro (de 35 a 50 nm incluindo os membros possíveis), e genoma não segmentado de 4,7 a 6,3 kb, dicistrônico, com o gene que codifica para a proteína do capsídeo situado na extremidade 5' do RNA. Frequentemente são encontrados como "helpers" codificando as proteínas do próprio capsídeo e os capsídeos dos dsRNAs satélites produtores de toxina "killer" e fatores de imunidade. A família Partitiviridae contém virions isométricos de 30 a 35 nm de diâmetro, e dois componentes genômicos de 1,3 a 2,3 kb empacotados em capsídeos separados, são monocistrônicos, um deles codifica o polipeptídeo do capsídeo e o outro codifica um polipeptídeo de função desconhecida. O peso molecular das proteínas do capsídeo varia de 68 a 88 kDa em Totiviridae e de 42 a 73 kDa em Partitiviridae. A transcrição e replicação são conservativas em Totiviridae e semiconservativas em Partitiviridae. Além destas duas famílias, existem dois grupos ainda não classificados em famílias, um deles possui um componente dicistrônico de 8,3 kb e o outro contém vírus com três ou quatro componentes genômicos, monocistrônicos, porém deve ser confirmado o número mínimo de componentes dsRNA necessários para a replicação viral.

Novas divisões filogenéticas de vírus dsRNA, baseadas em análises comparativas de seqüências de aminoácidos de proteínas por eles codificadas, principalmente na RNA polimerase RNA dependente, propõem uma revisão de critérios para a taxonomia destes vírus (KOONIN, 1992; KOONIN e DOLJA, 1993).

Consideráveis progressos foram obtidos nos últimos anos na caracterização dos elementos genéticos dsRNA (NUSS, 1992). Especialmente em uma família de vírus recentemente descrita, os Hipoviridae. Membros desta família possuem genomas dsRNA de 12-13 kb que estão empacotados em vesículas lipídicas derivadas do hospedeiro, com uma RNA polimerase RNA

dependente codificada pelo vírus. Os membros desta família estão filogeneticamente relacionados à família *Potyviridae* de vírus vegetais. É a única família sem capsídeo. O membro típico do único gênero foi designado *Cryphonectria hypovirus* (HILLMAN *et al.*, 1995).

1.1.4. Propriedades físico-químicas dos micovírus

Poucas partículas semelhantes a vírus (VLPs) detectadas em fungos foram isoladas e sua composição determinada. Em muitos casos, essas partículas têm sido caracterizadas apenas por microscopia eletrônica.

O diâmetro exato das partículas presentes em fungos é difícil de determinar. Quando os micovírus são negativamente contrastados com acetato de uranila ou fosfotungstato de sódio, tendem a ser penetrados pelo corante. Isto ocorre principalmente nas partículas virais de tamanho entre 35 e 40 nm. A susceptibilidade à penetração do agente contrastante poderia ser considerada uma propriedade geral dos micovírus mas não se pode ter certeza absoluta de que a penetração do agente contrastante distingue entre partículas que contêm ácido nucléico (partículas cheias) daquelas que não os contêm (partículas vazias). Partículas penetradas e não penetradas pelo agente contrastante, freqüentemente apresentam diâmetros diferentes. Os diferentes contrastantes produzem imagens bastante variáveis e o tampão usado na suspensão, que ainda não foi bem explorado em micovírus, provavelmente afeta a aparência da partícula na microscopia eletrônica (BOZARTH, 1979).

A estrutura tridimensional do capsídeo mostra uma nova estrutura geométrica de simetria icosaédrica, com número de triangulação $T=1$, e 60 ou 120 subunidades por partícula (BOZARTH, 1979). Os capsídeos do micovírus P4 de *U. maydis* e os do micovírus de levedura LA-1 parecem ser formados por duas cópias idênticas da proteína do capsídeo em cada unidade assimétrica icosaédrica (REILLY *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 1994). A análise destas partículas, por crioeletromicroscopia e reconstrução de imagens, confirmam esta estrutura. Ambos capsídeos constam de 60 dímeros Gag equivalentes, cujas duas subunidades ocupam sítios de união não equivalentes (CHEN *et al.*, 1994). Os dados estequiométricos de outros vírus dsRNA indicam que a estrutura de 120 unidades é amplamente distribuída, implicando que esta arquitetura molecular tem características que são particularmente favoráveis para o desenho de um capsídeo que é também um compartimento biossintético (CHEN *et al.*, 1994).

Os micovírus apresentam espectro de absorção típico de nucleoproteínas mostrando um máximo a 260 nm, um mínimo a 240 nm e uma relação média A₂₆₀/A₂₈₀ de 1,4 (LIU e LIANG, 1985; TAVANTZIS e BANDY, 1988), embora tenham sido relatados valores de até 1,7 (BUCK, 1984).

1.1.4.1. Genomas dsRNA

A maioria dos micovírus de fungos caracterizados possuem genoma com um ou vários segmentos dsRNA incluídos em capsídeos separadamente (SHEPHERD, 1990; RYTTER *et al.*, 1991). Os micovírus dos isolados "killer" de *U. maydis* contêm vários componentes dsRNA designados como H, M ou L segundo seu tamanho relativo (BOZARTH *et al.*, 1981). Os dsRNAs associados aos sistemas "killer" de levedura são dois ou mais componentes e denominam-se L, M ou S (RADLER *et al.*, 1993; NOSEK *et al.*, 1993; POSPISEK *et al.*, 1994). Em *S. cerevisiae*, os componentes dsRNA L e M estão empacotados separadamente. As partículas maduras L-A contêm apenas um componente dsRNA L-A por partícula. O tamanho do dsRNA M1 (1,8 kb) é menor que L-A (4,6 kb) e pode ser replicado duas vezes mais rapidamente antes que a partícula fique cheia (replicação "head-full"), produzindo partículas com dois componentes de dsRNA M1 (ESTEBAN e WICKNER, 1986).

A maioria das linhagens hipovirulentas de *C. parasitica* contém múltiplos componentes dsRNA, sendo encontradas variações consideráveis na concentração, número e tamanho dos componentes dsRNA nos diferentes isolados (NUSS, 1992).

Os micovírus isométricos podem conter algumas partículas com apenas um componente dsRNA e outras com combinações de componentes (BUCK e KEMPSON-JONES, 1973; BUCK e RATTI, 1975). O fato de que os micovírus não contenham, em uma única partícula viral todos os componentes dsRNA observados, foi primeiramente notado quando os resultados das análises físico-químicas do micovírus de *P. crhysogenum* (PcV) indicaram que continha 15% de RNA e não os 45% estimados se cada partícula contivesse os três componentes dsRNA encontrados nas preparações purificadas do vírus (WOOD e BOZARTH, 1972). Isto resulta em partículas com velocidades de sedimentação ou densidades em CsCl levemente diferentes (BOZARTH *et al.*, 1981; KIM e BOZARTH, 1985).

Além da diversidade natural entre o número de componentes de dsRNA e sua concentração em cada isolado de fungo (NUSS e KOLTIN, 1990), estas características podem ser alteradas conforme as condições de cultivo (ANAGNOSTAKIS e DAY, 1979; SHAPIRA *et al.*, 1991a).

Alterações aparentemente espontâneas no fenótipo de isolados de fungos, como taxa de crescimento e virulência, foram associadas com alterações nos perfis dos componentes dsRNA. Um perfil complexo de dsRNA encontrado em culturas de *Ágaricus bisporus* com basidiocarpos alterados era composto por nove componentes maiores entre 0,78 e 3,6 kb e quatro componentes menores entre 8,8 e 15 kb. Depois de muitas subculturas, um novo perfil de cinco componentes entre 1,5 e 3,6 kb foi detectado em culturas que expressavam o fenótipo alterado (MORTEN e HICKS, 1992). Foram também observadas alterações espontâneas no fenótipo em três dentre 36 isolados de *Chalara elegans* que apresentavam componentes múltiplos dsRNA. As análises indicaram que o perfil de dsRNA estava alterado, podendo apresentar um componente único (em dois isolados) ou ainda ausência de dsRNA (um isolado), sendo observada uma alteração na taxa de crescimento ou na virulência destes isolados (BOTTACIN *et al.*, 1994).

1.1.4.2. Proteínas

Os micovírus de levedura possuem um polipeptídeo principal nos capsídeos (REILLY *et al.*, 1984; NOGAWA *et al.*, 1993). Também existem relatos de duas proteínas majoritárias (KIM e BOZARTH, 1985; SHEPHERD, 1990; GHABRIAL e HAVENS, 1992). Em *S. cerevisiae*, a proteína majoritária (Gag) corresponde à proteína principal do capsídeo e a proteína minoritária (Gag-Pol) teria atividade de replicase (FUJIMURA e WICKNER, 1988a).

Os micovírus de dsRNA necessitam de uma atividade de transcriptase na partícula para produzir o mRNA, já que o dsRNA do virion não se comporta como mensageiro e que, em células não infectadas, não existe RNA polimerase RNA dependente (BUCK, 1979a). Conhece-se relativamente pouco sobre as polimerases associadas com dsRNA em fungos filamentosos. Em onze espécies de fungos, que apresentam dsRNAs, foi demonstrada a atividade RNA polimerase RNA dependente associada a partículas (BRUENN, 1988). A melhor caracterizada é a dos isolados "killer" de *U. maydis* (BEN-TZIVI *et al.*, 1984) e *S. cerevisiae* (BRUENN *et al.*, 1988; FUJIMURA *et al.*, 1988; LEIBOWITZ *et*

al., 1988). A polimerase do micovírus "killer" de *S. cerevisiae* é uma proteína de fusão que contém um domínio com atividade enzimática e outro que integra o capsídeo (FAHIMA *et al.*, 1993). A partícula madura apresenta atividade de transcriptase conservativa, produzindo fitas positivas que são excluídas da partícula viral, que atuam como mRNA e são empacotadas para formar novas partículas virais. Esta nova partícula contém apenas uma fita positiva, apresentando atividade replicase que sintetiza uma fita negativa que é utilizada como molde para síntese da fita positiva, formando um único componente dsRNA dentro da partícula viral, completando deste modo o ciclo (WICKNER, 1992).

Visto que o passo de transcrição nestes micovírus é conservativo, o processo geral é similar aquele dos reovírus, diferindo entretanto com o micovírus S de *Penicillium stoloniferum* (PsV-S) (BUCK, 1979b) e com o micovírus S de *Aspergillus foetidus* (AfV-S) (RATTI e BUCK, 1978). Estes, como o bacteriófago $\phi 6$ (VAN ETTEN *et al.*, 1980), são semiconservativos tanto na transcrição quanto na replicação (BUCK, 1979). O fato de que ambas fitas sejam sintetizadas dentro das partículas virais parece ser uma característica única e geral dos micovírus com dsRNA (WICKNER, 1992).

A estratégia de replicação usada pelos hypovirus é similar aquela empregada pelos vírus RNA com fita positiva e pode ser distinguida claramente da estratégia empregada pelos vírus dsRNA. Estes dsRNAs codificam sua própria RNA polimerase RNA dependente que está associada a vesículas membranosas derivadas do hospedeiro (FAHIMA *et al.*, 1993).

1.1.5. Sorologia

Estão descritas as relações sorológicas de micovírus de vários fungos isolados de regiões geográficas diferentes (FRANCKI e KIRBY, 1991), assim como de micovírus diferentes que coexistem em uma mesma espécie de fungo (BUCK *et al.*, 1981a). Ainda, diferentes espécies e gêneros de fungos apresentam micovírus sorologicamente relacionados. Em três espécies de *Penicillium*, estreitamente relacionadas (*P. chrysogenum*, *P. brevi-compactum* e *P. cyaneofulvum*), foram encontrados micovírus sorologicamente relacionados (WOOD *et al.*, 1971; WOOD e BOZARTH, 1972; BUCK e GIRVAN, 1977). Da mesma forma, existem micovírus sorologicamente relacionados em *Aspergillus niger* e *A. foetidus* (BANKS *et al.*, 1970; RATTI e BUCK, 1972; BUCK *et al.*,

1973). O componente dsRNA de menor migração eletroforética do complexo viral de *P. stoloniferum* (PsV-S) foi encontrado em uma espécie de outro gênero (*Diplocarpon rosae*) e sua relação sorológica com um componente do complexo viral de *A. ochraceous* foi detectada (KIM e BOZARTH, 1985).

Uma das principais dificuldades nos experimentos de transmissão de micovírus a linhagens não infectadas é o "screening" das hifas infectadas, pois os micélios infectados não desenvolvem alterações evidentes. O uso de técnicas novas e simples para provar a presença ou ausência de micovírus em pequenas quantidades de amostra permitiria: um rápido "screening" de culturas, examinar um grande número de amostras e detectar baixos títulos de micovírus em culturas recentemente infectadas. Com este objetivo técnicas sorológicas como ELISA (CLARK e ADAMS, 1977) e imunoeletromicroscopia (IEM) (MILNE e LUISONI, 1988) poderão ser úteis nas pesquisas de transmissão em micovírus (LECOQ *et al.*, 1979).

Além da sorologia convencional, relacionada com as proteínas presentes na partícula viral, alguns dsRNAs podem se mostrar imunogênicos. Polirribonucleotídeos de dupla fita sintéticos, como poliI:poliC ou polyA:polyU, quando injetados em coelho, produzem antisoro específico para dsRNA e têm sido utilizados para a detecção de micovírus (LISTER, 1979) e, através de ELISA indireto, para detectar dsRNA (ARAMBURU e MORENO, 1994).

Anticorpos monoclonais contra dsRNA foram descritos como ferramenta universal de diagnóstico de micovírus mediante ELISA, "immuno-blot" e "immuno-blot" em combinação com eletroforese em gel com gradiente de temperatura (GABRIEL, 1986; LUKACS, 1994).

1.1.6. Propriedades dos dsRNA genômicos de micovírus

1.1.6.1. Múltiplos componentes dsRNA geneticamente únicos

Mediante estudos de heteroduplex e técnicas de hibridização de ácidos nucleicos foi demonstrado, em vários micovírus, que os diferentes componentes dsRNA contém seqüências únicas, e que não apresentam hibridização cruzada detectável nem com qualquer outro dsRNA presente no hospedeiro (EDMONSON *et al.*, 1984; HARMSEN *et al.*, 1989; HARMSEN *et al.*, 1991; DICKINSON *et al.*, 1993).

Existem pelo menos duas variedades de micovírus em *S. cerevisiae* (ScV), K1 e K2. Os componentes dsRNAs L de K1 e K2 são denominados L1 e L2, respectivamente. Ambas variedades possuem um segundo dsRNA L, denominado La, que não apresenta homologia detectável com L1. Além disso, L1 apresenta pouca homologia com o componente M1 (BOBEK *et al.*, 1982).

Em um dos isolados hipovirulentos de *C. parasitica*, oito dos onze componentes dsRNA demonstraram ser geneticamente únicos através de hibridização com clones de cDNA (ENEBAK *et al.*, 1994).

Em outros micovírus de genoma segmentado, foi detectada homologia entre os componentes dsRNA de um mesmo isolado, entre todos eles (WEISSOVA *et al.*, 1991) ou apenas entre alguns dos componentes (SOMMER e WICKNER, 1982b; SEROUSSI *et al.*, 1989). Em um micovírus presente em *U. maydis*, o componente L é derivado da extremidade 3' da fita positiva do componente M e não apresenta grandes seqüências abertas de leitura (ORFs) nem produtos de tradução, sugerindo que L é derivado por um processo de replicação e empacotamento de um fragmento 3' de um mRNA processado (CHANG *et al.*, 1989). O componente dsRNA M1 de uma linhagem "killer" de *S. cerevisiae* contém uma região interna de 200 bp rica em adenina e uracila, presente no transcrito sintetizado *in vitro*. HANNING *et al.* (1986) demonstram que há variabilidade no tamanho da seqüência poliadenilada do transcrito e relacionam essa variabilidade com as diferenças de tamanho encontradas nos dsRNA M1.

1.1.6.2. Formas defectivas

Em dsRNAs presentes em *C. parasitica*, HIREMATH *et al.* (1986) e SHAPIRA *et al.* (1991a) encontraram que apenas o dsRNA L, o maior componente dsRNA, se mantém estável em tamanho e concentração ao longo do tempo de cultura, no entanto o número e as concentrações dos componentes M e S variam. TARTAGLIA *et al.* (1986) no isolado GH2, e SHAPIRA *et al.* (1991b) no isolado EP713 de *C. parasitica* observaram que os componentes M e S eram derivados do componente L como resultado de eventos de deleção interna. Mapeamentos com transcriptase reversa, associados a amplificação por PCR, revelaram que o componente M consistia de uma família de formas deletadas internamente do componente L que mantinham as porções terminais. Os pontos de deleção foram localizados dentro de regiões internas da seqüência de L. Os autores sugerem que a geração de componentes de dsRNA defectivos por

deleções internas é uma característica da replicação dos dsRNAs associados a hipovirulência. Estas formas defectivas contribuem significativamente para os perfis de bandamento complexos observados por eletroforese. Dado o pequeno tamanho dos componentes dsRNA S (600-800 bp) e sua capacidade de replicar eficientemente em presença do componente L, foram estudadas as seqüências em busca de elementos *cis*-regulatórios envolvidos na replicação. Em dois destes componentes, se encontrou seqüências adicionais que parecem não estar relacionadas às seqüências do componente L nem ter homologia entre si, sugerindo uma origem diferente de L, tal como eventos recombinacionais entre o componente dsRNA L e RNAs celulares. O componente dsRNA S da linhagem GH2 mostrou, por homologia de seqüências, não estar relacionado ao L (TARTAGLIA *et al.*, 1986).

Em dsRNAs associados a "doença La France" de cogumelos cultivados, também foi detectado um componente dsRNA S, ocasionalmente presente em grandes quantidades nos fungos afetados, sendo originado por deleção interna de um componente dsRNA maior, composto principalmente dos extremos não codificantes (HARMSSEN *et al.*, 1991).

Estes componentes dsRNAs derivados por deleção podem ser úteis para a identificação de seqüências *cis*-regulatórias envolvidas na replicação e expressão dos dsRNA, para um melhor entendimento dos mecanismos de transcrição e replicação, incluindo a identificação dos polipeptídeos necessários para estes processos, e para o desenvolvimento de sistemas de expressão baseados em dsRNA (NUSS e KOLTIN, 1990).

Em leveduras foram descritos mutantes deletados dos componentes M1 e L-A (SOMERS, 1973; FRIED e FINK, 1978; ESTEBAN e WICKNER, 1988) que dependem de L-A para sua propagação. Estes mutantes, derivados por deleção interna, reprimem o número de cópias de L-A (como faz M1) e podem substituir as partículas M1 devido a sua maior velocidade de replicação e portanto podem converter a linhagem hospedeira para um fenótipo não "killer" (HUAN *et al.*, 1991), que não produz toxina nem imunidade. Estes mutantes porém desempenham uma função importante na patogênese viral (BRUENN, 1980). Diplóides formados pelo pareamento de uma linhagem "killer" com uma supressora, mostraram uma replicação preferencial do genoma supressor após 41 gerações (RIDLEY e WICKNER, 1983). Algumas das seqüências conservadas nestes mutantes são necessárias para a manutenção e a replicação do componente dsRNA supressor (THIELE *et al.*, 1984). Três mutantes foram clonados e

X
seqüenciadas, e foi detectada a região responsável da interferência com a propagação de M1, que inclui o sinal de empacotamento. Existem indicações de que outras regiões poderiam também estar envolvidas (HUAN *et al.*, 1991). O componente dsRNA S14 de *S. cerevisiae*; originado por deleção interna simples de M1, inclui 5 repetições de uma seqüência consenso simétrica de 11 bp que não está presente no dsRNA parental mas sim em um dsRNA de outro tipo "killer" de leveduras, o dsRNA M2 (LEE *et al.*, 1986). Após a passagem de muitas gerações de algumas linhagens supressoras, foram observadas divergências das seqüências originais no componente M, ocorrendo inserção de novos nucleotídeos (BRUENN, 1980). A geração de novas seqüências e a estrutura dos componentes dsRNAs S são semelhantes à evolução de algumas formas denominadas "defective interfering" de vírus animais (BRUENN, 1980).

1.1.6.3. Isolados com seqüências genômicas relacionadas

Foi descrita a existência de homologia de seqüências entre micovírus presentes em diferentes gêneros de hospedeiros (KIM e BOZARTH, 1985), entre os dsRNA isolados em diferentes grupos de compatibilidade vegetativa do hospedeiro (BUCK, 1984) e entre diferentes micovírus presentes no mesmo hospedeiro (BUCK *et al.*, 1981a).

Em subtipos de micovírus de diferente especificidade "killer" de *U. maydis*, os componentes H e L de tamanho semelhantes estão geralmente relacionados a nível de seqüências (FIELD *et al.*, 1983). Em leveduras, os componentes dsRNA L de dois subtipos são semelhantes nos sítios de início da transcrição, porém são diferentes no restante da seqüência (BOBEK *et al.*, 1982). A homologia entre dsRNAs de isolados provenientes de localidades geograficamente distantes não é esperada devido ao fato de que os micovírus estão sujeitos a uma forte deriva genética na ausência de mecanismos de edição na sua replicação (HOLLAND *et al.*, 1982). No fungo *Chalara elegans*, 36 isolados que continham dsRNA, foram classificados em 9 grupos segundo a similaridade do perfil de bandeamento em eletroforese, porém, experimentos de hibridização revelaram alguma homologia em um componente dsRNA entre 8 dos isolados (BOTTACIN *et al.*, 1994). Por outro lado, ZELIKOVITCH *et al.* (1990) detectaram alta homologia entre dsRNAs provenientes de diferentes isolados geográficos de *Septoria tritici*.

Para determinar a variabilidade genética dos dsRNAs presentes em uma população de *C. parasitica* foram empregados "primers" obtidos para uma região conservada da linhagem norte-americana NB58. Foi obtida uma banda de amplificação de tamanho esperado em todos exceto um isolado. Nem o dsRNA da linhagem Européia EP713 nem o de outras linhagens norte-americanas foram amplificadas com estes "primers". Foi determinada a seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA amplificado e foram construídas árvores filogenéticas que indicaram que todos os isolados NB58 estavam estreitamente relacionados e facilmente distinguíveis de EP713. Na região seqüenciada de dsRNAs, procedentes de fungos isolados de diferentes castanheiras, nenhum foi idêntico, contudo o dsRNA NB58, isolado em 1992, foi idêntico ao original isolado em 1988 da mesma árvore. Isto sugere que há uma deriva genética significativa entre as seqüências de dsRNA ainda dentro de uma pequena população de *C. parasitica*, mas que existe conservação dentro das hifas do fungo (CHUNG *et al.*, 1994).

1.1.6.4. Organização genética dos Hipovírus

A primeira evidência na organização estrutural geral dos dsRNA associados a hipovirulência, foi provida por HIREMATH *et al.*, (1986) como resultado da análise direta das regiões terminais de componentes dsRNA presentes no isolado hipovirulento EP713 de *C. parasitica*. A extremidade 5' do dsRNA possui uma cauda de poli(A⁺) pareada com poli(U⁺), enquanto que o terminal 3' apresenta uma seqüência consenso de 28 nt. TARTAGLIA *et al.* (1986) relatam uma organização similar para as regiões terminais do isolado hipovirulento norte-americano GH2, provendo a primeira indicação de propriedades estruturais comuns para diferentes dsRNAs associados a hipovirulência. No dsRNA da linhagem GH2 foram identificadas seqüências motivo claramente semelhantes àquelas encontradas na linhagem EP713 (DURBAHN *et al.*, 1996). Hibridizações com o isolado norte-americano NB58 de *C. parasitica* indicaram similaridade de seqüências e uma organização similar ao isolado EP713, contudo não foi detectada hibridização com nenhum outro isolado norte-americano, sugerindo uma origem européia para o isolado NB58 (HILLMAN *et al.*, 1992). Porém, usando "primers" para uma região conservada da linhagem NB58 o dsRNA de EP713 não foi obtido fragmento de amplificação (CHUNG *et al.*, 1994). O dsRNA do isolado NB58 e o componente dsRNA maior do vírus do isolado EP713 apresentam identidade de seqüência de 60%. Seqüências motivo associadas com helicases e RNA polimerases são altamente conservadas entre as duas linhagens e se localizam em posições genômicas

similares (HILLMAN *et al.*, 1994). Vários dsRNA de isolados hipovirulentos apresentam tamanho entre 2,5 e 7 kb, sugerindo uma organização bastante diferente da observada no isolado hipovirulento EP713 (PAUL e FULBRIGHT, 1988). O isolado norte-americano C-18 contém 11 componentes dsRNA com peso molecular variando de 1 a 5 kb. Clones de cDNA não hibridizaram com nenhum outro dsRNA associado a hipovirulência (ENEBAK *et al.*, 1994). Isto sugere que nem todos os dsRNAs associados com a hipovirulência têm a mesma organização genética do componente dsRNA L de EP713 (NUSS, 1992).

1.2. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin, assim denominado em 1883, é um fungo filamentoso Deuteromiceto da família Moniliaceae (HAWKSWORTH *et al.*, 1983) que possui a capacidade de infectar e matar uma variedade de insetos e é utilizado no controle biológico de pragas.

Se estima que *M. anisopliae* infecte mais de 300 espécies de insetos (FERRON, 1978). Isolados de *M. anisopliae* têm sido utilizados para o controle biológico de cigarrinhas de cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), cigarrinha de pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), broca da cana (*Diatraea saccharalis*), percevejos da soja (gêneros *Nezara* e *Piezodorus*), *Cosmopolites sordidus* em bananeira, bicudo do algodoeiro e broca do café (*H. hampei*). Em trabalhos experimentais o fungo foi testado com sucesso sobre larvas de *Musca domestica* e percevejos da família Reduviidae, vetores da doença de Chagas (ALVES, 1986).

O processo de infecção no hospedeiro ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação. (Figura 1, ALVES, 1986; SCHRANK *et al.*, 1993). O processo é iniciado pela germinação dos esporos sobre a cutícula do inseto. Na superfície do esporo, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas tais como lipases, quitinases e proteases. Tais enzimas têm efeito na aquisição preliminar de nutrientes e também causam modificações superficiais das camadas mais externas da cutícula do inseto (ST. LEGER, *et al.*, 1991b). O esporo germina e a formação do tubo germinativo é interrompida para a formação do apressório, que é uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico com a cutícula do inseto (ST. LEGER *et al.*, 1990). Esse estímulo também é sensível a alterações da superfície, indicando um possível mecanismo pelo qual o patógeno reconhece seu hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1991b).

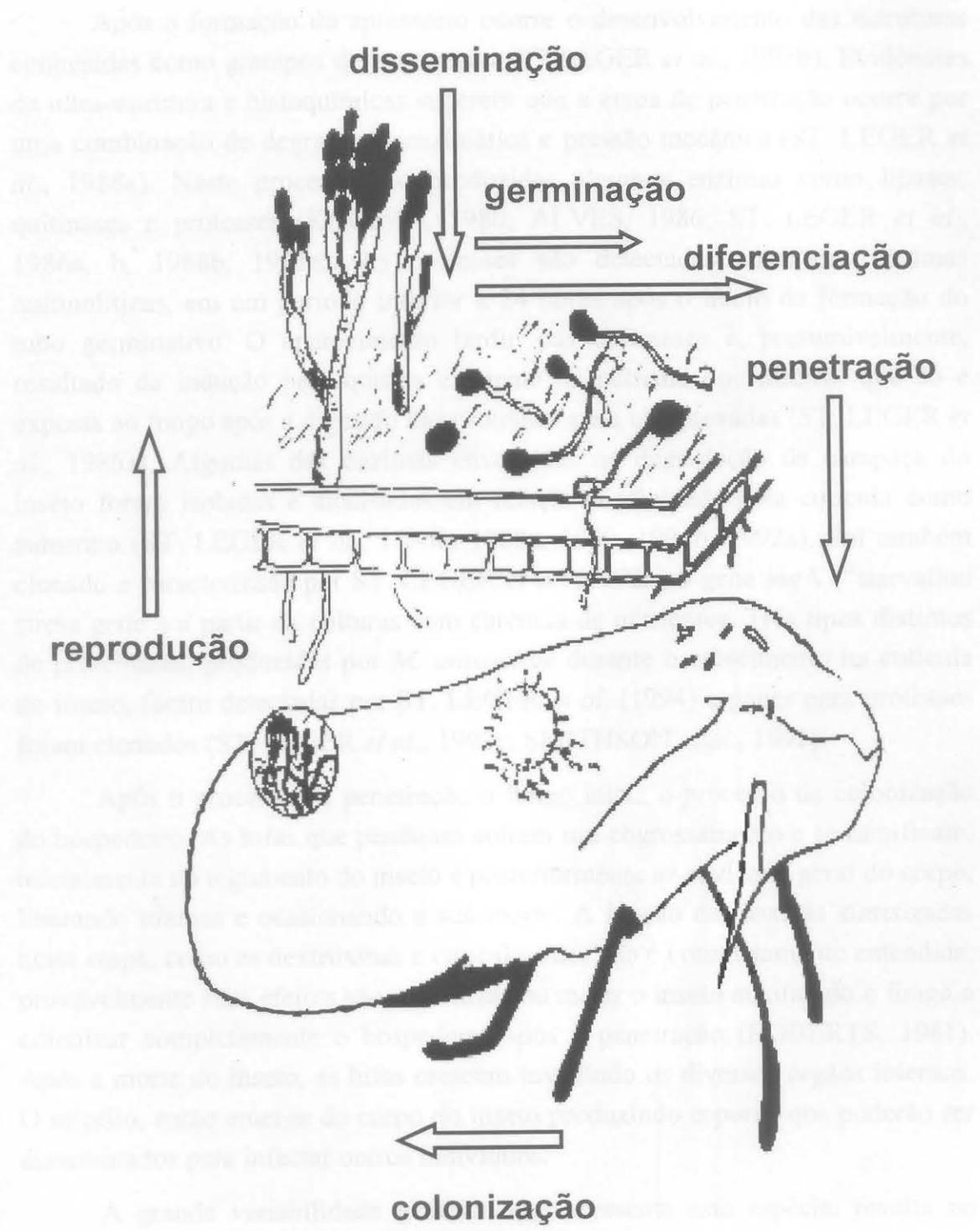


Figura 1. Representação esquemática do ciclo das relações patógeno-hospedeiro do fungo *Metarhizium anisopliae* no inseto (SCHRANK *et al.*, 1993).

Após a formação do apressório ocorre o desenvolvimento das estruturas conhecidas como grampos de penetração (ST LEGER *et al.*, 1991b). Evidências de ultra-estrutura e histoquímicas sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica (ST. LEGER *et al.*, 1988a). Neste processo são produzidas algumas enzimas como lipases, quitinases e proteases (KUCERA, 1980; ALVES, 1986; ST. LEGER *et al.*, 1986a, b, 1988b, 1991a). As proteases são detectadas antes das enzimas quitinolíticas, em um período inferior a 24 horas após o início da formação do tubo germinativo. O aparecimento tardio das quitinases é, presumivelmente, resultado da indução pela quitina existente na cutícula dos insetos, que só é exposta ao fungo após a digestão das proteínas a ela complexadas (ST. LEGER *et al.*, 1986a). Algumas das enzimas envolvidas na degradação da carapaça do inseto foram isoladas e analisadas em relação à afinidade pela cutícula como substrato (ST. LEGER *et al.*, 1986b, 1988a, 1989, 1991b, 1992a). Foi também clonado e caracterizado por ST. LEGER *et al.* (1992b) o gene *ssgA* ("starvation stress gene") a partir de culturas com carência de nutrientes. Três tipos distintos de proteinases, produzidas por *M. anisopliae* durante o crescimento na cutícula do inseto, foram detectadas por ST. LEGER *et al.* (1994) e genes para proteases foram clonados (ST. LEGER *et al.*, 1992c; SMITHSON *et al.*, 1995).

Após o processo de penetração o fungo inicia o processo de colonização do hospedeiro. As hifas que penetram sofrem um engrossamento e se ramificam, inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente na cavidade geral do corpo, liberando toxinas e ocasionando a sua morte. A função das toxinas sintetizadas nesta etapa, como as dextruxinas e citocalasinas, não é completamente entendida, provavelmente seus efeitos são imobilizar ou matar o inseto auxiliando o fungo a colonizar completamente o hospedeiro após a penetração (ROBERTS, 1981). Após a morte do inseto, as hifas crescem invadindo os diversos órgãos internos. O micélio, então emerge do corpo do inseto produzindo esporos que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos.

A grande variabilidade genética que apresenta esta espécie, resulta no aparecimento de muitas raças com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz ultravioleta (ALVES, 1986). A entomopatogenicidade de *M. anisopliae*, é dependente de um relacionamento complexo entre as habilidades do fungo para germinar e penetrar na cutícula e a habilidade do inseto em evitar o crescimento do fungo. Linhagens patogênicas de *Metarhizium* para uma espécie particular de hospedeiro, podem não mostrar as

mesmas características de patogenicidade em outras espécies de insetos (HUXHAM *et al.*, 1989).

A diferenciação de estruturas de infecção sobre *M. anisopliae* ocorre somente em resposta a estímulos específicos relacionados ao hospedeiro, e como tal, este fungo pode servir como um sistema modelo para o entendimento dos sinais de indução, controle de crescimento e diferenciação celular em fungos (ST. LEGER *et al.*, 1990).

A utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos praga oferece uma estratégia ecologicamente aceitável. Os maiores obstáculos para a sua aplicação incluem a eficácia variável devido a parâmetros ambientais, temperatura e umidade, e desenvolvimento de técnicas de formulação viáveis.

Além dos estudos de patogenicidade, estudos a nível de obtenção de mutantes, fusão de protoplastos e desenvolvimento de sistemas de transformação (AL AIDROOS, 1980; MESSIAS e AZEVEDO, 1980; ST. LEGER *et al.*, 1995; BOGO *et al.*, 1996b) têm sido realizados. Estes estudos têm contribuído para uma melhor compreensão da biologia do fungo e para a obtenção de linhagens potencialmente mais eficazes no controle biológico (AZEVEDO *et al.*, 1987; ST. LEGER *et al.*, 1996). Diferentes genes de *M. anisopliae* foram isolados e caracterizados. Entre eles, genes envolvidos na síntese de triptofano (gene *TrpC*, SILVA e SCHRANK, 1994), na síntese de tubulina (gene βtub , BOGO *et al.*, 1993b), na síntese de superóxido dismutases (gene *sod1*, SCHRANK *et al.*, 1993) e relacionados ao metabolismo de radicais de oxigênio (gene *srg*, PINTO JR., 1994), genes envolvidos na síntese de quitinase (gene *chit1*, BARRETO *et al.*, 1994b), no estresse (gene *ssgA*, ST. LEGER *et al.*, 1992b), e na degradação da cutícula de insetos (ST. LEGER *et al.*, 1992a).

1.3. Micovírus em *Metarhizium anisopliae*

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* mais utilizadas em controle biológico no Brasil pertencem à coleção do Prof. João Lúcio de AZEVEDO (ESALQ-USP), tendo sido isoladas de insetos, em diversos estados brasileiros. Recentemente, em algumas destas linhagens, foram detectados dsRNAs com diferentes perfis eletroforéticos (BOGO *et al.*, 1996a). Na linhagem RJ foram observadas partículas virais isométricas associadas aos dsRNAs. Em conídios e micélio desta linhagem foram detectados treze componentes

dsRNA que variam de 600 a 3.400 pb. No vírus purificado está presente uma proteína de 45 kDa que provavelmente é a proteína do capsídeo. Em várias linhagens de *M. anisopliae* não foi possível detectar dsRNAs por eletroforese e se acredita que estão livres de infecção viral (BOGO *et al.*, 1996a). LEAL *et al.* (1994) relataram a presença de dsRNAs em dois isolados de *Metarhizium anisopliae* provenientes do Brasil, V215 e V291, com dsRNAs variando de 0,75 a 3,5 kb. Ambos isolados apresentam partículas de 33 nm de diâmetro.

Em *M. anisopliae* tem sido observada a perda da infectividade em algumas linhagens altamente patogênicas (J. L. de AZEVEDO, comunicação pessoal). Este fenômeno está provavelmente relacionado a alterações genéticas ocorridas nestas linhagens, mas os mecanismos envolvidos não foram ainda elucidados. Como as linhagens do fungo, infectadas ou não com micovírus, são isolados independentes e apresentam níveis diferentes de entomopatogenicidade, a simples comparação entre elas não permite nenhuma conclusão em termos da associação entre a infecção viral e a perda da entomopatogenicidade. Estas comparações dependem da possibilidade de se infectar linhagens livres de micovírus ou de curar o dsRNA de linhagens infectadas. Entretanto, todos os micovírus até o presente estudados, são incapazes de penetrar ativamente células de fungos. A transmissão das partículas virais, ou dos dsRNAs, ocorre por via citoplasmática ou através de anastomose entre hifas infectadas e não infectadas. Experimentos preliminares demonstraram que a simples anastomose entre hifas de *M. anisopliae* não possibilitam a transmissão viral (BOGO *et al.*, 1996a). Estudos de transformação em *M. anisopliae* sugerem que a técnica de bombardeamento com partículas é mais eficiente que os métodos tradicionais (BOGO *et al.*, 1996b), e portanto esta é uma metodologia que tem grande potencial para infecção de células de *M. anisopliae* com preparações virais.

O presente trabalho é parte de um projeto mais amplo que visa estudar o processo de infecção do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Neste sentido, é importante compreender os determinantes da variabilidade gênica e da entomopatogenicidade, e avaliar a relação entre a presença de micovírus e as alterações fenotípicas decorrentes. Este trabalho amplia os conhecimentos dos micovírus presentes em *M. anisopliae* e procura metodologias para sua transmissão artificial e partiu dos seguintes objetivos:

1.4. Objetivos Gerais

- Caracterizar os micovírus presentes em algumas linhagens de *Metarhizium anisopliae*.
- Testar o método de biobalística na transmissão artificial de micovírus.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1.5. Objetivos Específicos

- Caracterizar os micovírus presentes em diferentes linhagens de *M. anisopliae*, analisar suas proteínas e os perfis eletroforéticos dos dsRNAs.
- Determinar a homologia entre os componentes dsRNA de diferentes linhagens de *M. anisopliae* e entre os componentes dsRNA em cada linhagem.
- Verificar as relações sorológicas destes micovírus.
- Transmitir os micovírus para linhagens livres de vírus através de biolística.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Organismos e plasmídeos

2.1.1. Linhagens de fungos

Foram utilizadas as linhagens selvagens E6, E9, M5, MT, Al e RJ de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, gentilmente cedidas pelo Prof. J. L. de AZEVEDO (ESALQ, USP, Brasil). As linhagens E6, E9 (estado de origem Espírito Santo) e RJ (estado de origem Rio de Janeiro) foram originalmente isoladas de *Deois flavopicta* (Homoptera, Cercopidea) e se encontram descritas em BAGAGLI (1987). As linhagens MT, M5 e Al foram originalmente isoladas nos estados do Mato Grosso do Sul, Pernambuco e Alagoas, respectivamente. Durante a execução deste trabalho foi obtida, espontaneamente, uma variante derivada da linhagem RJ. Esta variante, que apresenta uma alteração nos componentes dsRNA e na morfologia da colônia foi denominada linhagem RJd (deletada). A linhagem RJ original foi denominada RJc (completa). Utilizamos ainda uma outra linhagem RJ, denominada RJwt, mantida em passagens sucessivas em insetos no laboratório da ESALQ (J.L. AZEVEDO, comunicação pessoal).

A linhagem de *Aspergillus niger* 1.003, gentilmente cedida pelo Dr. L. FERENCZY (Department of Microbiology, Atila József University, Hungary), portadora de micovírus (BUCK *et al.*, 1973), foi utilizada como controle e marcador de peso molecular dsRNA (VÁGVÖLGY *et al.*, 1993).

2.1.2. Linhagens de bactérias e plasmídeos

Foi utilizada a cepa XL1-BLUE (Stratagene) derivada de *E. coli* K12, como hospedeira de plasmídeos.

O plasmídeo com marca de seleção Amp^r utilizado foi pUC18 (VIEIRA e MESSING, 1982). O plasmídeo pBT6 (ORBACH *et al.*, 1986) contém o gene

que codifica à uma β -tubulina de *Neurospora crassa* resistente ao benomil. O fago λ cI857 foi obtido do Cenbiot (Centro de Biotecnologia, UFRGS).

2.2. Soluções e tampões

As soluções e os tampões foram preparados segundo SAMBROOK *et al.*, 1989, com água tridestilada ou Milli-Q, autoclavada, fervida ou tratada com DEPC.

2.2.1. Salina/Tween 80

NaCl 0,85%
Tween 80 0,5%

A solução foi esterilizada por filtração em filtro de nitrato de celulose 0,45 μ m (Sartorius AG).

2.2.2. Tampão de amostra 5X para proteínas

Tris-HCl 0,625 M (pH 6,8)
Azul de bromofenol 0,2%
SDS 2,3%
Glicerol 10%
 β -mercaptoetanol 5%

2.2.3. Tris-glicina/SDS (a)

Tris 25 mM
Glicina 250 mM
SDS 0,1%
pH 8,3 ou pH 8,9

2.2.4. Solução de fixação

Ácido acético 5%
Metanol 10%

2.2.5. Solução de azul de coomassie R250

Azul de coomassie R-250 1%

Ácido acético 10%

Metanol 50%

2.2.6. Solução A de azul de coomassie coloidal

Azul de coomassie G-250 0,1%

Ácido fosfórico 2%

Sulfato de amônio 10%

2.2.7. Solução oxidante

Dicromato de potássio 0,0034 M

Ácido nítrico 0,0032 N

2.2.8. Solução redutora

Carbonato de sódio 0,28 M

Formaldeído 37% (Adicionar 1 µl/ml de solução no momento do uso)

2.2.9. Tris-glicina/SDS (b)

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

SDS 0,1%

pH 8,3

2.2.10. Tampão de transferência

Tris 15,6 mM

Glicina 120 mM

Metanol 20%

pH 8,1 ou pH 8,4

2.2.11. Ponceau S

Ponceau S 2 %

Ácido tricloroacético 30%

Ácido sulfossalicílico 30%

2.2.12. Amido "black"

Amido "black" 10B 0,5%

Ácido acético 10%

Metanol 45%

2.2.13. TBS

Tris-HCl 20 mM (pH 7,4)

NaCl 150 mM

2.2.14. "Blotto" (JOHNSON *et al.*, 1984)

Leite em pó desnatado diluído em TBS ou PBS para concentração de 5%.

2.2.15. Tampão de revelação

Tris-HCl 50 mM (pH 9,8)

MgCl₂ 4 mM

2.2.16. Tampão de extração

Tris-HCl 200mM (pH 8,0)

NaCl 250 mM

EDTA 25 mM (pH 8,2)

SDS 1%

2.2.17. Fenol-clorofórmio

Fenol saturado com Tris-HCl 50mM (pH 8,0), adicionado de 1 volume de clorofórmio.

2.2.18. TE

Tris-HCl 10 mM (pH 7,5 ou pH 8,0)
EDTA 0,1 mM (pH 8,0)
pH 7,5 ou pH 8,0

2.2.19. Tampão de reação DNaseI

Tris-HCl 0,5 M (pH 7,6)
MgCl₂ 0,1 M

2.2.20. Solução de armazenamento DNaseI

NaCl 0,15 M
Glicerol 50%

2.2.21. Tampão de reação Nuclease S1 10X

NaCl 2 M
Acetato de sódio 0,5 M (pH 4,5)
ZnSO₄ 10 mM
Glicerol 5%

2.2.22. Tampão STE

NaCl 0,1 M
Tris-HCl 0,05 M
EDTA 0,001 M
pH 6,8

2.2.23. TAE

Tris-acetato 40 mM
EDTA 1 mM

2.2.24. TEB

Tris 89 mM

EDTA 2,5 mM

H₃BO₄ 89 mM

pH 8,2

2.2.25. Tampão de amostra para AN 6X

Azul de bromofenol 0,25%

Xileno cianol FF 0,25%

Ficoll (tipo 400, Pharmacia) 15%

2.2.26. Solução estoque de acrilamida

Acrilamida 30%

Bisacrilamida 0,8%

2.2.27. Água/ DEPC

Água tridestilada ou Mili-Q tratada com DEPC 0,1% a 37°C 18 h, posteriormente autoclavada.

2.2.28. Solução de desnaturação

NaOH 500 mM

NaCl 1,5 M

2.2.29. Solução de neutralização

Tris-HCl 1 M (pH 7,0)

NaCl 1,5 M

2.2.30. SSC 20X

NaCl 3 M

Citrato de sódio 0,3 M

2.2.31. Solução de pré-hibridização

SSPE 5X pH7,4 20%

Denhardt 5X 20%

SDS 0,5%

2.2.33. Denhardt 50X

Ficoll 400 1%

Polivinilpirrolidona 1%

BSA 1%

2.3. Enzimas

As enzimas transcriptase reversa, RNase A, DNase I, Nuclease S₁, e as enzimas de restrição *AluI* e *HindIII*, foram obtidas das empresas: BRL (Bethesda Research Laboratories, Inc.), Biolabs (New England Biolabs, Inc.), Boehringer (Boehringer Mannheim, Gmb H), Cenbiot (Centro de Biotecnologia, UFRGS), Pharmacia (Pharmacia, Inc.), Promega (Promega Corp.) e USB (United States Biochemical Corp.).

As soluções de RNase A, DNase I e Nuclease S₁ foram preparadas e utilizadas segundo SAMBROOK *et al.*, (1989).

2.4. Fungicidas

A droga Benomil (Benlat) foi dissolvida (5 mg/ml) em etanol 70% e armazenada à temperatura ambiente.

2.5. Meios de cultura

2.5.1. Meios de cultura para *Escherichia coli*

Foram utilizados para o crescimento e manutenção das bactérias os meios TSB (Oxoid), LB e YT líquido ou sólido (1,5% ágar), e meio SOC líquido, preparados segundo SAMBROOK *et al.*, 1989.

2.5.2. Meio de cultura para *Metarhizium anisopliae*

O meio de cultivo utilizado foi o meio de Cove Completo (MCC), composto de:

| | |
|---------------------|-------|
| NaNO ₃ | 0,60% |
| Glicose | 1,00% |
| Peptona | 0,20% |
| Casaminoácidos | 0,15% |
| Extrato de levedura | 0,05% |

Após esterilização por autoclavagem foram adicionados, assepticamente, 20 ml/l de solução de sais de 400 ml/l de solução de elementos traços.

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Solução de sais | |
| KCl | 26 g/l |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 26 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 76 g/l |

| | |
|---|----------|
| Solução de elementos traços | |
| Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O | 40 mg/l |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 400 mg/l |
| FeSO ₄ | 10 mg/l |
| MnSO ₄ .2H ₂ O | 800 mg/l |
| NaMo ₄ .2H ₂ O | 800 mg/l |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 800 mg/l |

2.6. Crescimento e manutenção dos organismos

As linhagens de bactérias foram mantidas segundo SAMBROOK *et al.*, (1989).

Esporos dos fungos foram semeados em placas de Petri contendo meio MCC sólido (2.5.2) e incubados a 28-30°C até a esporulação. Com o auxílio da alça de Drigalsky, os esporos foram ressuspensos em 8 ml de solução Salina/ Tween 80 (2.2.1). A suspensão foi homogeneizada em vortex, filtrada em lã de vidro estéril e centrifugada a 5.000 rpm por 5 m. Os esporos foram ressuspensos em 5 ml de solução Salina/ Tween 80. A suspensão foi

quantificada em Câmara de Neubauer, diluída para 10^8 a 10^9 esporos/ml, e armazenada a 4°C por até duas semanas.

Os fungos foram estocados como esporos a temperatura ambiente ou crescidos até esporulação em MCC (2.5.2) e mantidos a 4°C por 2-5 meses.

Para a obtenção de micélio em fase exponencial de crescimento, 250 ml de MCC (2.5.2) foram inoculados com 10^6 esporos/ml e incubados a 28°C com agitação rotativa (130 rpm) durante 48 h. O micélio foi coletado por filtração e lavado com 2 volumes de água bidestilada esterilizada em autoclave. O rendimento variou entre 2-6 g de micélio dependendo da linhagem.

2.7. Isolamento de partículas virais de *Metarhizium anisopliae*

Cada experimento de purificação foi realizado com pelo menos quatro linhagens de *Metarhizium anisopliae*, as três infectadas com micovírus (RJ, AI e M5) e pelo menos uma sem micovírus (E6, E9 e/ou MT). As purificações dos micovírus foram realizadas a partir de micélio crescido, filtrado e lavado como descrito no item 2.6.

2.7.1. Purificação parcial

O micélio foi pesado e macerado em gral em presença de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 (40 ml/ 4 g de micélio filtrado). As células foram rompidas por agitação vigorosa com 1 volume de pérolas de vidro estéreis, agitando-se durante 1 min com intervalos de 1 min em banho de gelo, por 10 vezes. O homogenato foi clarificado por centrifugação (10.000g 30 min; 10.000g 10 min). A suspensão foi ultracentrifugada em Rotor Sorvall A641, 32.000 rpm, 4°C , durante 2 h. O sedimento foi ressuspendido em 1,5 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0 (2 h a 4°C) e a suspensão foi clarificada 2 ou 3 vezes por centrifugação a 10.000 rpm por 5 min em microcentrífuga (Spin II, Incibrás).

2.7.2. Purificação com PEG e gradientes de densidade de CsCl

O micélio obtido segundo descrito no item 2.6 foi homogeneizado e clarificado (2.7.1). A suspensão foi precipitada com PEG (6.000 ou 8.000) 6%/ cloreto de sódio 0,15 M com agitação suave durante 2 h a 4°C seguido de

centrifugação a 17.000 rpm (rotor Sorvall SS34) por 20 min. O sedimento foi ressuspendido em 2 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0, clarificado a 10.000g durante 10 min e aplicado em gradiente pré-formado de cloreto de céσιο de 6,3; 10; 20; 30; 40; 50 e 69% w/v. Os gradientes foram centrifugados a 25.000 rpm em rotor Sorvall AH629 durante 3 h a 4°C. Coletaram-se as bandas visíveis mediante luz incidente sobre o tubo de gradiente e as frações de E6, E9 e/o MT que correspondiam aproximadamente às mesmas densidades das bandas dos tratamentos com micovírus. Alíquotas de 10 a 100 µl de cada banda foram usadas em análises posteriores.

2.7.3. Purificação mediante gradientes isopícnicos

Ao micovírus parcialmente purificado por ultracentrifugação, ou às bandas coletadas do gradiente pré-formado (aproximadamente 0,5 ml) foram adicionados 1 mM PMSF e uma solução de CsCl 69% w/v em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0. Posteriormente foi centrifugado em rotor Sorvall AH 650 a 40.000 rpm durante 24 h a 25°C. O gradiente em equilíbrio foi fracionado com bomba peristáltica em frações de 200 µl. Foram separadas alíquotas de 20 µl para se obter o índice de refração para o cálculo da densidade, e 20 µl para sua observação ao microscópio eletrônico, para análise de proteínas e dsRNA. O volume restante foi diluído até 1.000 µl para leitura em espectrofotômetro e para análise do conteúdo de dsRNA de cada fração.

2.8. Análise das partículas virais

2.8.1. Espectrofotometria e cálculo da densidade das frações dos gradientes de CsCl

As frações do gradiente ou os micovírus precipitados e ressuspendidos em tampão fosfato 0,05 M pH 7, foram analisadas em espectrofotômetro entre 300 e 230 nm. Desta varredura, foram obtidas as absorbâncias máximas, mínimas, A₂₈₀, A₂₆₀ e A₂₄₀ e as relações A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₄₀.

O índice de refração foi obtido em refratômetro (ABBE 3 L, Bausch & Lomb) com 20 µl das preparações, e corrigido de acordo com DOBROTA e HINTON (1992), mediante a fórmula:

$$\eta \text{ corrigido} = \eta \text{ observado} - (\eta \text{ tampão} - \eta \text{ água})$$

sendo η o índice de refração. Utilizando-se a fórmula

$$\rho = (a \eta) - b$$

(DOBROTA e HINTON, 1992) obteve-se a densidade da preparação ou fração, onde ρ é a densidade em g/ml, e os coeficientes a e b para CsCl variam de acordo com a temperatura, segundo a tabela 1:

Tabela 1. Coeficientes a e b para CsCl utilizados na obtenção de densidade de uma preparação.

| temperatura | | coeficientes | | densidade |
|-------------|--------|--------------|--------|-----------|
| η | ρ | a | b | (g/ml) |
| 20 | 20 | 10.9276 | 13.593 | 1.2 - 1.9 |
| 25 | 25 | 10.8601 | 13.497 | 1.3 - 1.9 |

2.8.2. Microscopia eletrônica

As preparações de micovírus foram observadas em microscópio eletrônico (ME) para verificar a presença de VLPs e sua pureza. Para proceder a coloração negativa, 5 μ l das amostras foram incubadas por 1 min em telas cobertas com Formvar e carbonizadas, lavadas com água destilada, e contrastadas negativamente com acetato de uranila 2%. Todas as preparações foram realizadas em duplicata e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 100C (Centro de ME da UnB) em magnificação de 26.000 e 50.000X.

Nas preparações de MaV-RJd foram medidas ao menos 100 partículas de cada fração; no caso de MaV-M5 e MaV-AI, onde a concentração era menor, foram medidas 25 e 15 partículas, respectivamente.

2.9. Análise de proteínas

2.9.1. Preparo de extratos protéicos totais

A cada 0,5 g de micélio das diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*, crescidas e coletadas como descrito no item 2.6, foram adicionados 2 ml de água destilada e 1 volume de pérolas de vidro esterilizadas. Após agitação vigorosa por 1 min e a suspensão ficou em repouso em banho de gelo durante 1 min. O processo se repetiu por 10 vezes e os debris foram separados em microcentrífuga durante 1 min. O sobrenadante foi sonificado em gelo durante 10 s, intercalado por período de repouso por 10 s. O processo se repetiu 6 vezes e a suspensão foi clarificada por centrifugação.

2.9.2. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS

Extratos totais de micélio, micovírus parcialmente purificado ou diferentes frações de micovírus purificado, foram analisados quanto a presença de proteínas.

Foi utilizado o sistema de eletroforese descontínua em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida-SDS (LAEMMLI, 1970). Foram utilizadas concentrações de acrilamida de 10% para o gel de corrida e 5% para o gel de empilhamento. As dimensões dos géis eram de 8 cm x 9,5 cm, 12 cm x 16 cm ou 17 x 20 cm, todos com espessura de 0,8 mm.

Às amostras a serem analisadas eram adicionados 0,2 volumes de tampão de amostra 5X para proteína (2.2.2) com β -mercaptoetanol, para eletroforese em condições redutoras. As amostras eram aquecidas a 100°C, por 3 min, antes da aplicação no gel. A eletroforese era realizada em tampão Tris-glicina/SDS (a) (2.2.3) pH 8,3 a 100 V para o gel de empilhamento e a 200 V para o gel de separação.

As estimativas do peso molecular das proteínas foram feitas por comparação com padrões de peso molecular aplicados nos géis, sempre em condições redutoras. Os padrões de peso molecular eram: lisozima (14,3 kDa); β -lactoalbumina (18,4 kDa); tripsinogênio (24 kDa); pepsina (34,7 kDa); ovoalbumina (45 kDa); e albumina bovina (66 kDa) (Sigma MW-SDS-70) ou fosforilase b (94 kDa), albumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase

carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e lactoalbumina 14,4 kDa (LMW Pharmacia).

2.9.3. Colorações de proteínas

Para visualização das proteínas, após a eletroforese, os géis foram corados com azul de comassie ou nitrato de prata.

2.9.3.1. Coloração com azul de comassie R 250

O gel era fixado em solução de fixação (2.2.4) a 65°C, por 15 min. Após a fixação eram adicionados 0,1 volumes de solução de azul de comassie R250 (2.2.5) e procedia-se à incubação por 15 min, a 65°C. O gel era descorado com uma solução de ácido acético a 7%.

2.9.3.2. Coloração com azul de comassie coloidal

O gel foi imerso em 80% de solução A (2.2.6)/ 20% metanol, a temperatura ambiente por 4-18 h, e posteriormente foi descorado com 20% metanol.

2.9.3.3. Coloração com nitrato de prata

Para a coloração com nitrato de prata, o gel era fixado em ácido tricloroacético 10% durante 30 min a 4°C, lavado 3 vezes por 5 min em etanol 10% /ácido acético 5% e mergulhado em solução oxidante (2.2.7) durante 5 min. Após lavagem com água destilada 2 vezes por 5 min o gel era imerso em solução de AgNO_3 0,011M por 20 min, no escuro. Procedia-se a uma nova lavagem com água e incubação em solução redutora (2.2.8) durante 30 s, até o aparecimento das bandas. A reação era parada com ácido acético 5%.

2.10. Sorologia

2.10.1. Obtenção de antisoros

2.10.1.1. Preparação de antígenos

Os vírus parcialmente purificados (2.7.1), foram ressuspensos em 1 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7 e clarificados a 12.000 rpm, por 5 min (microcentrífuga Spin II, Incibrás).

As preparações virais obtidas das frações de gradientes de densidade em CsCl foram centrifugadas em rotor Sorvall T875 a 37.000 rpm (100.000g) durante 1 h, e o precipitado ressuspensão em 1 ml do mesmo tampão.

Antes de ser emulsionado com o coadjuvante oleoso, a concentração de antígeno de cada preparação foi estimada por absorvância relativa a 260 nm, e seu conteúdo de proteínas e de dsRNA analisados em géis por eletroforese.

2.10.1.2. Imunizações

Coelhos brancos (Nova Zelândia), de 4-5 meses foram imunizados com as preparações de antígenos (2.10.1.1), de acordo com o protocolo da Figura 2. Antes das imunizações, foram coletados 3-5 ml de sangue de cada um dos três animais, por sangria da orelha para a obtenção de soro normal (soro pré-imune).

Os antisoros foram produzidos mediante 3 imunizações com intervalos de 13 dias. Na administração das doses, a solução de antígeno foi emulsionada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma) na proporção 1/1 e administrado em seis injeções subcutâneas distribuídas nas costas do animal. A primeira imunização foi realizada com micovírus parcialmente purificado, sendo que as seguintes foram realizadas com micovírus purificados em gradientes de CsCl. No sétimo dia após a administração da terceira dose, foram coletados 10 ml de sangue de cada um dos animais, por sangria da orelha.

Uma injeção "booster" de iguais características das anteriores, 29 dias depois da última imunização, foi seguida de sangria de prova aos 7 dias. Se o soro possuía anticorpos em concentração adequada, a sangria total era realizada dois dias depois (coelho imunizado com micovírus MaV-RJ). Os coelhos cujos soros não apresentavam título apreciável de anticorpos (coelhos inoculados com os micovírus MaV-A1 e MaV-M5), foram tratados com outras duas injeções endovenosas, sem coadjuvante, e a sangria total era realizada dois dias após a última imunização.

| dia | imunização / sangria |
|-----|--|
| 0 | extração do soro pré-imune (soro normal) |
| 0 | 1° injeção subcutânea com coadjuvante incompleto de Freund |
| 13 | 2° injeção subcutânea com coadjuvante incompleto de Freund |
| 26 | 3° injeção subcutânea com coadjuvante incompleto de Freund |
| 33 | 1° sangria de prova |
| 62 | 4° injeção subcutânea com coadjuvante incompleto de Freund |
| 69 | 2° sangria de prova |
| 71 | sangria total |
| 71 | 1° injeção endovenosa |
| 75 | 2° injeção endovenosa |
| 77 | sangria total |

Figura 2: Esquema da imunização para obtenção de antisoros contra partículas virais isoladas das três linhagens infetadas de *Metarhizium anisopliae*.

Após a coleta, cada amostra de sangue era incubada a 30°C, por 3-4 h ou a 4°C por 18 h. Após a remoção do coágulo, o material era centrifugado a 10.000 rpm, por 10 min, a 4°C (rotor Sorvall SS34), e o soro era recolhido e armazenado. A armazenagem dos soros era feita em alíquotas de 1,5 ml adicionadas de azida sódica 1/5.000 e mantidas congeladas a -20°C.

Todos os testes foram realizados no mínimo em duplicata. Os testes de dupla difusão em ágar (DD) (OUCHTERLONY, 1958) e de imunoprecipitação em campo escuro (aglutinação em lâmina) (OLIVEIRA LIMA *et al.*, 1970) foram realizados antes de se dar seguimento ao esquema de imunização nas sangrias de prova, enquanto que para a titulação dos soros foram feitos os testes de microprecipitação (VAN SLOGTEREN, 1955) e dupla difusão em ágar.

Os testes de imunoprecipitação em campo escuro foram realizados colocando-se uma gota de antisoro e uma gota de antígeno entre a lâmina e a lamínula. Em seguida, observou-se ao microscópio em campo escuro. Os testes de dupla difusão foram realizados utilizando-se íon-ágar nº 2 (DIFCO) 0,7%, NaCl 0,8%, NaN₃ 0,05% em tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7. Antígenos e anticorpos foram colocados em orifícios de 0,4 mm feitos no ágar, distanciados entre si 0,4 µl, segundo o desenho da Figura 40 A e B. A reação se manteve a temperatura ambiente em câmara úmida e a leitura foi feita às 24 h e 48 h, com a ajuda de luz incidente. A prova de microprecipitação foi realizada colocando-se

10 µl de cada antígeno no fundo de uma caixa de petri e sobre as gotas assim formadas, foram colocados 10 µl de antisoros (Figura 40C). As gotas foram cobertas com óleo mineral. A reação foi mantida a temperatura ambiente e as leituras foram realizadas às 2 e 24 h.

O antígeno empregado foi micovírus parcialmente purificado (10 µl) originado de 40 µg de micélio (peso úmido). Nos testes de DD se realizaram ainda reações com homogenatos de micélio. Os controles foram as linhagens E6 e MT de *M. anisopliae* processados da mesma forma que as linhagens com micovírus. O antisoro foi diluído em NaCl 0,85% para testar seu título. Como controles dos soros, se utilizou soro normal (pré-imune) sem diluir e solução fisiológica (NaCl 0,85%) usada para a diluição dos soros.

2.10.2. Caracterização sorológica dos micovírus

Os testes empregados para se obter as relações sorológicas entre os micovírus presentes nas diferentes linhagens de *M. anisopliae* e com outros vírus com genoma ds RNA, foram a dupla difusão em ágar e Western.

2.10.2.1. Dupla difusão em gel de ágar

Os antisoros obtidos foram confrontados com micélio homogeneizado e clarificado das linhagens com e sem micovírus de *M. anisopliae*, com extratos de seu dsRNA (2.11.1.1) e com dsRNA extraído de *Aspergillus niger* linhagem 1003 (2.1.1). Realizaram-se ainda reações com micovírus purificado em gradientes de césio, originado de aproximadamente 20 µg de micélio (peso úmido). A quantidade de dsRNA correspondia a 1/3 da quantidade aplicada no gel da Figura 1, extraídos de 0,16 g de micélio fresco de *A. niger*; 0,16 g da linhagem Al; 0,11 g da linhagem M5; 0,04 g da linhagem RJd e 0,03 g da linhagem RJc de *M. anisopliae*.

Os micovírus parcialmente purificados foram também testados contra os antisoros homólogos e heterólogos obtidos, soro pré-imune e soro anti "Maize Rough Dwarf Virus" (dsRNA vírus) (GIMÉNEZ, M. P., IFFIVE, INTA, Argentina).

2.10.2.2. Método de Western

Depois de separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (2.9.2), com 12% de acrilamida no gel de separação, 4% no gel de empilhamento e tampão de eletroforese Tris-glicina/SDS (2.2.9.b), as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schüll BA-85) em tampão de transferência (2.2.10), a uma voltagem constante de 100 V, por 1 h, ou de 30 V, por 14-16 h. A eficiência da transferência era verificada por coloração da membrana com Ponceau S (2.2.11). Os marcadores de peso molecular (2.9.2) e parte da membrana com antígeno foram separados e corados com "amido black" (2.2.12). O excesso de "amido black" era removido por lavagem da membrana em água ou em ácido acético 7%. Após a transferência, o gel era corado como descrito em 2.9.3.

Para a realização do Western, após a transferência, a membrana de nitrocelulose era lavada, por 10 min, em TBS (2.2.13) e bloqueada com "blotto" 5% (2.2.14), por 1 h, a temperatura ambiente. Depois da incubação, o soro era removido e a membrana era lavada por 4 vezes, de 5 min cada uma, em TBS e uma vez com "blotto" 5%, por 10 min. Seguia-se incubação com o imunocorjugado, por 1 h, a temperatura ambiente. Era utilizado um segundo anticorpo anti-imunoglobulinas de coelho marcado com fosfatase alcalina (Gibco BRL 9815SA) ou um segundo anticorpo anti IgG (molécula inteira) de coelho marcado com peroxidase (Gibco BRL 9814SA), todos em diluições de 1/2.000.

Quando um imunocorjugado marcado com peroxidase era utilizado, após 5 lavagens, de 5 min cada, em TBS, as reações antígeno-anticorpo eram visualizadas por incubação com uma solução substrato contendo 5 mg de DAB (Sigma) e 150 µl de H₂O₂ em 30 ml de TBS. No caso de utilização de um segundo anticorpo marcado com fosfatase alcalina (Sigma A-2779), após a incubação com o mesmo, eram feitas 4 lavagens, de 5 min cada, em TBS e uma lavagem em tampão de revelação (2.2.15), por 10 min, e as reações antígeno-anticorpo eram visualizadas por incubação em uma solução contendo NBT (Sigma) e BCIP (Sigma) para concentrações finais de 0,1 mg/ml e de 0,05 mg/ml, respectivamente, em tampão de revelação. Nos dois casos, as reações de revelação eram interrompidas por extensiva lavagem em água bidestilada.

2.11. Análise de dsRNA

2.11.1. Purificação de dsRNA

Para análise dos dsRNA presentes em *Metarhizium anisopliae* foram estudados seus padrões eletroforéticos, a partir de micélio das diferentes linhagens do fungo e de preparações de micovírus.

2.11.1.1. Extração de ácidos nucleicos totais

Micélio crescido, filtrado e lavado como descrito no item 2.6, foi liofilizado e pulverizado em gral com nitrogênio líquido. Foram adicionados 4 ml de tampão de extração (2.2.16) por g de micélio. A suspensão foi aquecida a 70°C durante 15 min, e tratada com 1 volume de fenol/clorofórmio 1/1 (2.2.17). Após centrifugação (10.000g por 10 min) a fase aquosa foi tratada com 1 volume de clorofórmio, centrifugada e a fase aquosa foi precipitada com 0,1 volumes de AcNa 3 M pH 5,2; 100 mM NaCl ou 0,5 volumes AcNH₄ 7,5 M, e 1 volume de isopropanol ou 2,5 volumes etanol absoluto, incubando a -20°C por no mínimo 1 h. Desta forma, os ácidos nucleicos foram armazenados. Os ácidos nucleicos foram centrifugados (13.000g 20 m), lavados com etanol 70%, secos a 37°C ou a temperatura ambiente e ressuspendidos em TE (2.2.18) ou água Milli-Q fervida. Uma alíquota foi analisada por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio e observado em luz UV, segundo item 2.11.2.

Para a análise da presença de dsRNA dos clones originados nos experimentos de bombardeamento, foi analisado o micélio crescido em 20 ml de MCC (2.5.2) processado da mesma maneira. Alternativamente, os esporos originados desses micélios foram diretamente macerados com gral em presença de nitrogênio líquido até pó fino e tratados com 400 µl de tampão de extração (2.2.16).

Para a extração de dsRNA de micovírus parcialmente purificado, 100 µl de cada preparação foram tratados com 100 µl de TE (2.2.18) e 200 µl de tampão de extração.

Para a extração de dsRNA de frações de gradientes pré-formados, a 80 µl coletados de cada banda, foram adicionados 120 µl de TE e 200 µl de tampão de extração. Para a extração de dsRNA de frações isopícnicas, foram utilizados 5 µl

de cada banda coletada, 45 µl de TE e 50 µl de tampão de extração. Em todos os casos, foi seguido protocolo descrito anteriormente.

2.11.1.2. Tratamento com enzimas

2.11.1.2.1. Tratamento com DNaseI

Os extratos de ácidos nucléicos totais foram tratados com DNaseI para a eliminação do DNA do fungo, evitando assim uma possível distorção da migração do dsRNA. As amostras, em etanol, foram precipitadas como descrito em 2.11.1.1. Foram ressuspensas no tampão de reação da DNaseI (2.2.19), tratadas com 10 µg/ml de DNaseI (previamente diluída em tampão 2.2.20), incubadas a 15°C durante 15 min. A preparação foi extraída com fenol/clorofórmio e precipitada com etanol (2.11.1.1). Uma alíquota da reação foi observada em gel de agarose (2.11.2).

2.11.1.2.2. Tratamento com Nuclease S₁

Para melhor visualização do dsRNAs, 1 ml de extrato original em etanol (2.11.1.1) foi precipitado, ressuspendido em 20 µl de água Milli-Q fervida, e a preparação tratada com 5-10 U de nuclease S₁ (BRL). Foi adicionado 10% de tampão de reação (2.2.21), e incubado a 37°C por 30 min. A reação foi incubada em banho de gelo ou tratada com fenol/clorofórmio e os ácidos nucléicos precipitados em etanol.

2.11.1.2.3. Sensibilidade do dsRNA a enzimas

A sensibilidade do ácido nucléico a Nuclease S₁ foi determinada após desnaturação a 100°C por 5 min sendo a reação processada como em 2.11.1.2.2. A sensibilidade das preparações a Ribonuclease pancreática (RNase A) foi testada na concentração de 0,2 mg/ml a 37°C por 30 min. As reações foram paradas com adição de fenol/clorofórmio e os ácidos nucléicos foram precipitados (2.11.1.1) antes da eletroforese.

2.11.1.3. Cromatografia em celulose CF-11

O fracionamento foi realizado a 20-25°C.

O método foi baseado em MORRIS e DOODS (1979), utilizando-se uma versão simplificada descrita por VALVERDE (1990). Foram fracionados 3,5 g de micélio de cada linhagem de fungo macerado em gral com nitrogênio líquido. Foram adicionados 8 ml de tampão 1X STE (2.2.22), 1 ml de 10% SDS e 9,5 ml de fenol saturado com 1X STE, agitando-se vigorosamente por 30 min. As amostras foram centrifugadas a 8.000g por 15 min e à fase aquosa (10 ml) foram adicionados 2,1 ml de etanol 95%. As colunas (duas por amostra) foram preparadas em seringas plásticas de 20 ml, tampadas na extremidade inferior com lã de vidro, adicionadas de 1 g de celulose (Watman CF-11, Bio-Rad Cellex N-1, ou SIGMA C-6288) ressuspensa em 25 ml de 1X STE contendo 16% v/v de etanol. As amostras foram aplicadas nas colunas, sendo o tampão drenado completamente. A seguir, cada coluna foi lavada com 40 ml de 1X STE, com 16% v/v de etanol, e posteriormente com 2,5 ml de 1X STE, o eluato foi desprezado. Foram adicionados 10 ml de 1X STE, coletado em tubos contendo 2,1 ml de etanol 95% e aplicado na segunda coluna permitindo drenar completamente. Foram adicionados 2,5 ml de 1X STE deixando drenar, e posteriormente 6 ml de 1X STE. As amostras foram coletadas, foram adicionados 0,5 ml de acetato de sódio 3 M (pH 5,5) e 20 ml de 95% etanol. Após 2 h a -20°C, o material foi centrifugado a 8.000g por 25 min. Os sobrenadantes foram desprezados, os tubos foram deixados secar e foram adicionados 20 µl de tampão TAE (2.2.23). Foram aplicados 30-50 µl de cada amostra em gel para eletroforese.

2.11.2. Eletroforese em gel de agarose

Foi utilizado o sistema de eletroforese horizontal em gel submerso, sendo o preparo dos géis descrito em SAMBROOK *et al.*, 1989. A agarose, em concentração de 0,8-1,5% foi dissolvida em TEB (2.2.24), adicionando-se brometo de etídio para concentração final de 0,25-0,40 µg/ml. As amostras foram homogeneizadas com tampão de amostra (2.2.25) e a eletroforese realizada a 100 V em TEB. Após a eletroforese, os géis foram visualizados em transluminador de U.V. de comprimento de onda curto (Fotodyne). Para o cálculo do peso molecular dos componentes dsRNA, a eletroforese foi realizada sem brometo de etídio, sendo o gel corado posteriormente. O peso molecular dos

dsRNA ou DNA foram estimados usando como base a fórmula descrita por SCHAFFER e SEDEROFF (1981). Os padrões usados foram os fragmentos gerados pela clivagem do DNA do fago λ (item 2.1.2) com *Hind*III (item 2.3), pUC (item 2.1.2) com *Alu*I (item 2.3), "1kb DNA ladder" (BRL) e os componentes dsRNA presentes no fungo *Aspergillus niger* linhagem 1.003 (item 2.1.1) (4050, 3390, 3290, 2750, 2500, 2050 bp), extraídos como descrito no item 2.11.1.

2.11.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical de camada delgada descrito em SAMBROOK *et al.*, (1989), com espaçadores de 0,8 mm. Os géis, com concentração de 5% foram preparados a partir de uma solução estoque de acrilamida (2.2.26) em tampão TAE (2.2.23). A acrilamida foi polimerizada pela adição de TEMED, 5 μ l para cada 10 ml de gel, e de APS, 50 μ l de uma solução a 10% para cada 10 ml de gel. A eletroforese foi realizada no mesmo tampão com voltagem de 6 V/cm, até que os corantes do tampão de amostra (2.2.25) saíssem totalmente do gel. Após a eletroforese, o dsRNA foi corado por imersão dos géis em uma solução de brometo de etídio como descrito em 2.11.2. Os padrões utilizados para a estimativa do peso molecular das bandas de ácido nucléico foram os mesmos utilizados para eletroforese em géis de agarose.

2.11.4. Análise da homologia dos dsRNA

Todo o processo foi realizado com material fornado (180°C) e as soluções preparadas em água/ DEPC (2.2.27) para se evitar a contaminação.

2.11.4.1. Transferência de dsRNA para membranas de náilon

Extratos de dsRNA preparados a partir de micélio total das diferentes linhagens utilizadas (2.1.1), tratados com DNaseI e Nuclease S₁ (2.11.1.2), foram separados em gel de agarose 0,8% em TEB e transferidos para membranas de náilon Hybond-N+ 0,45 μ m (Amersham). O procedimento adotado nas transferências foi, basicamente o descrito por SOUTHERN (1975). O gel foi mergulhado em solução de desnaturação (2.2.28) por 5-10 min, e em solução de neutralização (2.2.29) durante 30 min. Foi utilizado tampão de transferência 20X

SSC (2.2.30). A membrana foi fixada a 80°C durante 2 h e armazenada, até sua utilização, a temperatura ambiente.

2.11.4.2. Purificação dos componentes dsRNA de géis de agarose

Após a eletroforese dos extratos de dsRNA (2.11.2), o gel de agarose 0,8-1,2% foi corado em uma solução de brometo de etídio (2.11.2). Cada componente dsRNA foi cortado com bisturi e a purificação procedida pelo método de "freeze-squeeze" descrito por TAUTZ e RENZ (1983). Os componentes dsRNA foram colocados em tubos pequenos de microcentrífuga furados na tampa e no fundo, com lã de vidro no fundo. Os tubos contendo os fragmentos de interesse cortados do gel de agarose foram submersos em N₂ líquido durante aproximadamente 10 s, rapidamente transferidos para tubos grandes de microcentrífuga e centrifugados a 13.000 rpm 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos grandes de microcentrífuga e os ácidos nucleicos foram precipitados com 2,5 M de acetato de amônio e 2,5 volumes de etanol absoluto. O material foi incubado a -20°C. Um décimo de cada preparação foi centrifugada e ressuspendida em 20 µl de água, para análise em gel de agarose.

Foi estimada a quantidade de dsRNA presente em cada componente dsRNA isolado de acordo a intensidade observada no gel. A quantidade de ácido nucleico recuperada correspondia a 60-70% da quantidade inicial.

2.11.4.3. Purificação de componentes dsRNA de géis de poliacrilamida

Os componentes dsRNA foram purificados de géis de poliacrilamida em tampão TAE (2.11.3) com igual tampão de corrida. Após a eletroforese o gel foi mergulhado por 15 min em solução de brometo de etídio. Observando em UV, as bandas foram cortadas com bisturi e colocadas em tubos, onde foram maceradas com bastão de vidro recoberto por Parafilm. Foram adicionados 3 volumes de água/ DEPC, incubados a 42°C por 18 h e precipitados por 5 min a 13.000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante foi coletado e o procedimento repetido, ressuspendendo-se o precipitado em 0,5 volumes de água, centrifugando-se novamente e o sobrenadante foi adicionado ao anterior. O dsRNA foi precipitado com 100 mM NaCl e 1 volume de isopropanol e armazenado a -20°C. A pureza do componente dsRNA foi examinada em gel de agarose 0,8-1,2%, utilizando-se uma alíquota da preparação, e foi quantificado de acordo com a intensidade da

banda. O rendimento correspondia a 50-60% da quantidade de ácido nucléico inicial.

2.11.4.4. Síntese de sondas moleculares

A partir dos componentes dsRNA purificados de géis de agarose ou poliacrilamida foram construídas sondas de cDNA (GUBLER e HOFFMAN, 1983) em presença de $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, utilizando-se transcriptase reversa, condições padrões e "primers" aleatórios (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Foram ressuspensos em 7,5 μl de água Milli-Q/ DEPC 100-200 ng de dsRNA. Para o anelamento foram adicionados 10-500 μg de pd(N)₆ Pharmacia, a solução foi seca em vácuo, ressuspensa em 5 μl de uma solução de 90% DMSO, 1 mM Tris-HCl pH 8,3 e 0,1 mM EDTA e posteriormente incubados por 30 min a 60°C. Para a síntese da primeira fita de cDNA, foi adicionada uma solução contendo 4 μl de 5X tampão de reação da transcriptase reversa (tampão RT, BRL), 2 μl 0,1 M DTT, 1 μl 10 mM dC,G,TTPs, 1 μl 50 mM dATP e 5 μl água MiliQ/ DEPC, depois 1 μl transcriptase reversa (SSRT, 200U, BRL) e 12 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP 3.000 μCi . A reação foi misturada suavemente, incubada a 37°C por 1 h e a 90°C por 5 min e armazenada a -20°C. Para se estimar o peso molecular das fitas sintetizadas mediante eletroforese de agarose 1,2%, 25% da preparação foi utilizado. O gel foi secado e uma autoradiografia foi obtida.

Para a digestão do RNA molde, foi adicionado à reação de síntese da primeira fita 1 volume de 0,1 N NaCl e incubada por 15 min a temperatura ambiente. Após neutralização com 1 volume de Tris-HCl 1 M pH 6,8, os ácidos nucléicos foram precipitados mediante a adição de 10 μg de tRNA carreador, 0,5 volumes AcNH₄ 7,5 M e 2,5 volumes etanol absoluto, incubados a -20°C por mínimo 2 h, centrifugados e ressuspensos (2.11.1.1) em 20 μl de água/ DEPC. O controle da reação foi feito com 5% da preparação igual ao controle anterior.

2.11.4.5. Hibridização de componentes dsRNA

As membranas de náilon com os dsRNA isolados de diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* (2.11.4.1) foram tratadas para o bloqueio dos sítios não específicos, em solução de pré-hibridização (2.2.31-32) (200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de membrana) a 60°C por 2 h. Posteriormente a membrana foi hibridizada nesta

solução (50 µl/cm² de membrana) adicionada da sonda marcada. A membrana foi incubada por 14-16 h a 60°C com agitação suave e lavada com 2X SSC (2.2.30) (por 15 min a temperatura ambiente) e com 1X SSC (60°C por 15 min). O resultado foi detectado com filme de Raio X com exposição por 16 h.

2.12. Transmissão dos micovírus mediante biobalística

Com o objetivo da transferência de micovírus para linhagens não infectadas, foi empregada a metodologia de bombardeamento com partículas de tungstênio para introduzir micovírus purificado ou dsRNA nas diferentes linhagens de *M. anisopliae* (2.1.1).

2.12.1. Preparação em grande escala de DNA plasmidial

Como marca de seleção nos experimentos de bombardeamento com cotransformação, foi usado o gene *tub* *ben*^R de *N. crassa* contido no plasmídeo pBT6 (2.1.2). O plasmídeo foi purificado pelo método descrito por CLEWELL e HELLINSKI (1969). O volume inicial foi de 400 ml de cultura da linhagem de *E. coli* portadora do plasmídeo com rendimento final de 1-2 mg de DNA plasmidial. O DNA foi purificado em gradiente contínuo de cloreto de céσιο, conforme SAMBROOK *et al.*, 1989.

2.12.2. Preparo das amostras receptoras

Foram utilizadas suspensões de esporos (2.6) de três linhagens de *M. anisopliae* livres de micovírus: E6, MT e E9 (2.1.1), e da linhagem M5 com micovírus.

As suspensões de esporos foram acondicionadas de três formas:

A: plaqueadas em meio sólido (2.5.2) (contendo ou não benomil) e bombardeadas na própria placa.

B: colocadas em placas de Petri pequenas, bombardeadas e recuperadas das placas com água destilada estéril.

C: colocadas em placa de vidro côncava, bombardeadas e recuperadas com meio líquido de Cove.

2.12.3. Preparo das partículas

Os micovírus foram isolados de três linhagens de *M. anisopliae*: RJd, Al e M5. Dois tipos de preparação de micovírus foram utilizadas, micovírus parcialmente purificado (2.7.1) e micovírus purificados em gradientes de cloreto de cério (2.2.2). Foi também utilizado dsRNA extraído (2.11.1.1) da linhagem RJd.

Nos experimentos de cotransformação com marca de seleção para benomil foi utilizado o vetor pBT6 (2.1.2) purificado como descrito em 2.13.1.

Foram testados quatro protocolos diferentes para o bombardeamento. O primeiro (protocolo 1) para introduzir dsRNA, o segundo (protocolo 2) utilizando somente micovírus, e os protocolos 3 e 4 para bombardear micovírus em cotransformação com plasmídeo.

Protocolo 1: a 50 µl (3mg) de suspensão de partículas de tungstênio (Sylvania M5 0,5 µm de diâmetro) em glicerol 50%, foram adicionados 3 µg de vetor pBT6, 3 µg de dsRNA viral, 50 µl de CaCl₂ 2,5 M e 20 µl de espermidina 0,1 M. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente com agitação leve por 10 min e centrifugada por 10 s. O sedimento foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 14 µl etanol absoluto. Cada uma destas preparações foi utilizada para seis bombardeios. Uma alíquota de 3 µl, previamente sonicada por 2 s, foi depositada sobre a membrana de bombardeamento, espalhada e deixada evaporar por 10 min.

Protocolo 2: três mg de partículas de tungstênio em glicerol foram adicionados de 50 µl de CaCl₂ 2,5 M e de 20 µl de espermidina 0,1 M. Esta suspensão foi incubada durante 10 min a temperatura ambiente e centrifugada. O sedimento foi ressuspendido com a suspensão viral, e alíquotas foram distribuídas em seis membranas para bombardeamento. As membranas foram secas em capela de fluxo laminar.

Protocolo 3: três miligramas de partículas de tungstênio foram centrifugados e ressuspendidos com a suspensão viral (contendo 0,5% de Triton X-100 em alguns experimentos) e adicionados do DNA do vetor pBT6. Seis alíquotas desta suspensão foram colocadas em membranas de bombardeamento e secas como descrito anteriormente.

Protocolo 4: À suspensão de partículas de tungstênio foi adicionada a suspensão viral e o vetor conforme descrito em protocolo 3. A suspensão foi

concentrada em "speed vac" por 2 h. Alíquotas foram colocadas em seis membranas de bombardeamento e secas como descrito anteriormente.

2.12.4. Bombardeamento com partículas

Estes experimentos foram realizados no CENARGEN e no Laboratório de Microbiologia da UNB, com um acelerador de partículas baseado no modelo desenvolvido por SANFORD *et al.* (1987) construído pelo Dr. Elíbio Rech (CENARGEN).

Os bombardeamentos foram realizados utilizando 27,5 polegadas de Hg de vácuo e 1.200 psi de pressão de gás hélio (90 kg/cm²). A distância entre a tela de anteparo e as células foi de 73 ou 104 mm.

2.12.5. Tratamento das amostras bombardeadas

As amostras bombardeadas somente com micovírus (sem plasmídeo) foram semeadas em placas com meio de Cove Completo (2.5.2) e incubadas a 28°C.

Nos experimentos de cotransformação as amostras foram incubadas durante 18 h em meio de Cove Completo líquido sem seleção a 28°C. Posteriormente as amostras foram semeadas em placas com meio de Cove Completo contendo benomil na concentração de 5 ou 10 µg/ml e foram incubadas novamente até o aparecimento dos transformantes. As colônias eram então transferidas para meio sólido contendo benomil até o desenvolvimento das colônias.

2.12.6. Seleção dos transformantes

Para análise dos bombardeamentos, os esporos ou o micélio crescido a partir destes em 20 ml de MCC líquido (2.5.2), foram processados para a extração de seus ácidos nucléicos (2.11.1) e detecção de dsRNA por eletroforese (2.11.2).

As amostras bombardeadas somente com vírus (sem plasmídeo) foram analisadas como um "pool" ou como colônias isoladas.

3. RESULTADOS

Com o objetivo de caracterizar os micovírus, que infectam algumas linhagens de *Metarhizium anisopliae*, procedemos a caracterização de seu ácido nucléico, do perfil de proteínas, das relações sorológicas e da homologia de seus genomas. Usaremos a nomenclatura MaV seguida da linhagem de *M. anisopliae* para denominar os micovírus presentes. O termo componente dsRNA será utilizado neste trabalho para cada uma das bandas de dsRNA do perfil eletroforético dos MaVs.

3.1. Presença de dsRNA em preparações de ácidos nucléicos totais de *M. anisopliae* linhagens Al, M5, RJc e RJd.

A análise de preparações de ácidos nucléicos totais de algumas linhagens de *M. anisopliae*, por eletroforese em géis de agarose ou acrilamida, corados com brometo de etídio, revela a presença de bandas extras que migram mais rapidamente que o DNA cromossomal do fungo (linhagens Al, M5 e R5; Figura 3). As bandas extras não apresentam a mesma intensidade de fluorescência com brometo de etídio, significando que estão em concentrações diferentes. Controles rigorosos foram realizados e as linhagens consideradas neste trabalho "livres de micovírus" (linhagens E6, E9 e MT), nunca apresentaram bandas extras em extratos de ácidos nucléicos totais.

A linhagem Al apresenta, pelo menos, cinco bandas extras com pesos aproximados de 4,1; 2,4; 2,2; 2,0 e 1,0 kb. Na linhagem M5 aparece predominantemente uma banda de aproximadamente 4,1 kb. A linhagem RJc apresenta pelo menos treze bandas extras com pesos variando de 3,1 a 0,5 kb. As bandas extras da linhagem RJc foram classificadas, de acordo com seu peso molecular, em L ("large"), M ("medium") e S ("small") e sub-classificadas como apresentado na Tabela 2.

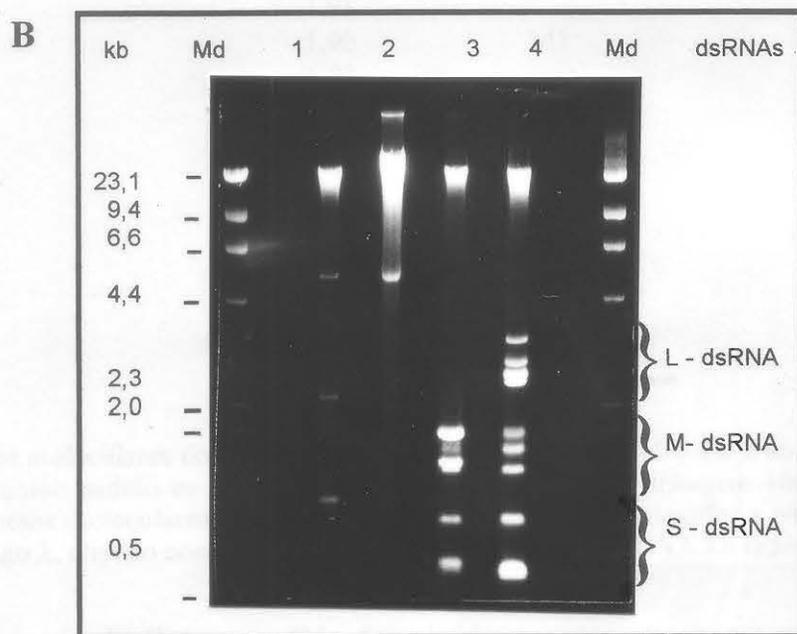
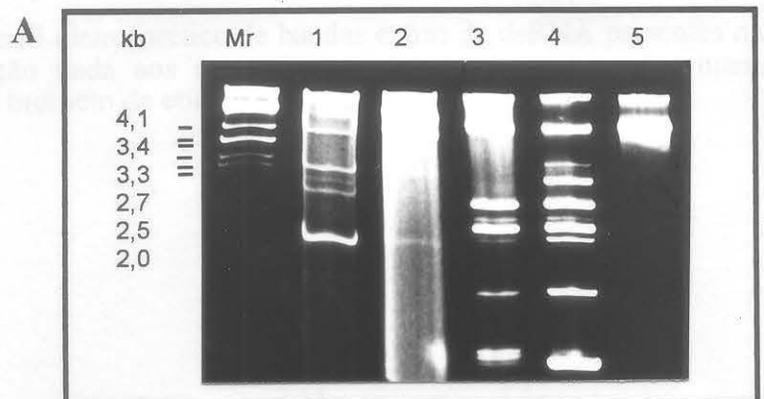


Figura 3. Eletroforese em gel de preparações de ácidos nucléicos totais de diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

A. Gel de poliacrilamida (5 %)

Ácidos nucléicos totais das linhagens: 1) A1; 2) M5; 3) RJd; 4) RJc; e 5) E6; Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger*. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb.

B. Gel de agarose (0,8 %).

Ácidos nucléicos totais das linhagens: 1) A1; 2) M5; 3) RJd; 4) RJc. As letras da direita representam a classificação das bandas extras da linhagem RJc: L ("large"), M ("medium") e S ("small"). Md) marcador de peso molecular DNA λ /HindIII. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb.

Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V.

As amostras foram tratadas com nuclease S_1 para facilitar a visualização das bandas extras.

Tabela 2: Perfil eletroforético de bandas extras de dsRNA presentes na linhagem RJc e a denominação dada aos componentes que apresentam maior intensidade nos géis corados com brometo de etídio.

| kb ^a | componente dsRNA |
|-----------------|------------------|
| 3,10 | L1 |
| 2,79 | L2 |
| 2,65 | L3 |
| 2,55 | L4 |
| 1,98 | |
| 1,90 | M1 |
| 1,82 | |
| 1,71 | M2 |
| 1,56 | |
| 1,49 | M3 |
| 1,42 | M4 |
| 0,90 | S1 |
| 0,50 | S2 |

(a) Os pesos moleculares dos componentes dsRNA dos MaVs, entre 4 e 2 kb, foram estimados utilizando como padrão os pesos moleculares dos dsRNAs da linhagem 1003 de *Aspergillus niger*. Os pesos moleculares dos componentes menores foram estimados a partir de padrões de DNA de fago λ , clivado com a enzima de restrição *HindIII*, ou "DNA kb ladder".

A partir da linhagem RJc foi obtida espontaneamente, após subculturas sucessivas, uma variante denominada RJd, na qual as bandas extras de maior peso molecular estão ausentes (Figura 3). O padrão de bandas na região S2 das linhagens RJc e RJd é complexo, apresentando três componentes em RJd e dois em RJc. Os dois componentes S2 de RJc não podem ser claramente visualizados na Figura 3, entretanto eles foram observados em alguns géis de agarose e foram confirmados em experimentos de hibridização (item 3.7).

Estas bandas de ácido nucléico foram caracterizadas com as enzimas DNase I, RNase A (Figura 4) e nuclease S₁ (Figura 5). Esta análise evidencia que o ácido nucléico componente é resistente a DNase e a nuclease S₁ e é sensível a altas concentrações de RNase A e que portanto corresponde a RNA de dupla fita (dsRNA). Está descrita uma metodologia para isolar dsRNA de preparações de ácidos nucléicos totais utilizando colunas de Celulose CF11 e baixas concentrações de etanol (16 %, VALVERDE, 1990). Os perfis eletroforéticos completos das bandas extras de cada linhagem foram isolados das

preparações totais mediante esta metodologia, fornecendo assim uma outra evidência da natureza dsRNA das bandas extras (Figura 6).

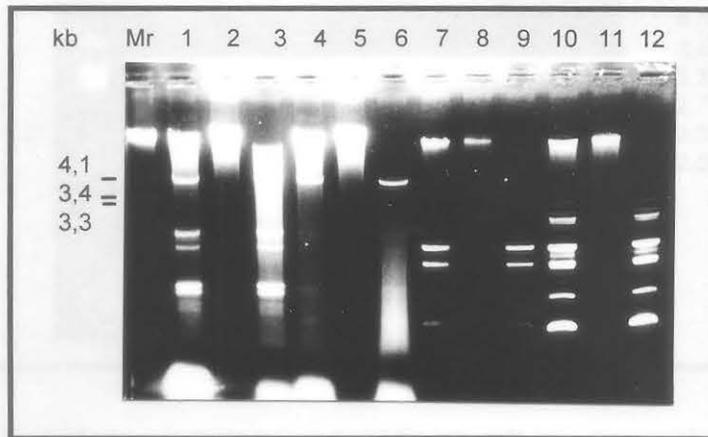


Figura 4. Tratamento das preparações de ácidos nucléicos totais com DNase I e RNase A.

Ácidos nucléicos totais da linhagem AI (1, 2, 3), linhagem M5 (4, 5, 6), linhagem RJd (7, 8, 9) e linhagem RJc (10, 11, 12). Sem tratamento (1,4,7,10), tratados com RNase A (2, 5, 8, 11) e tratados com DNase I (3, 6, 9, 12). Marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* (Mr). Os números representam os pesos moleculares em kb. O gel de agarose 0,8% foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V.

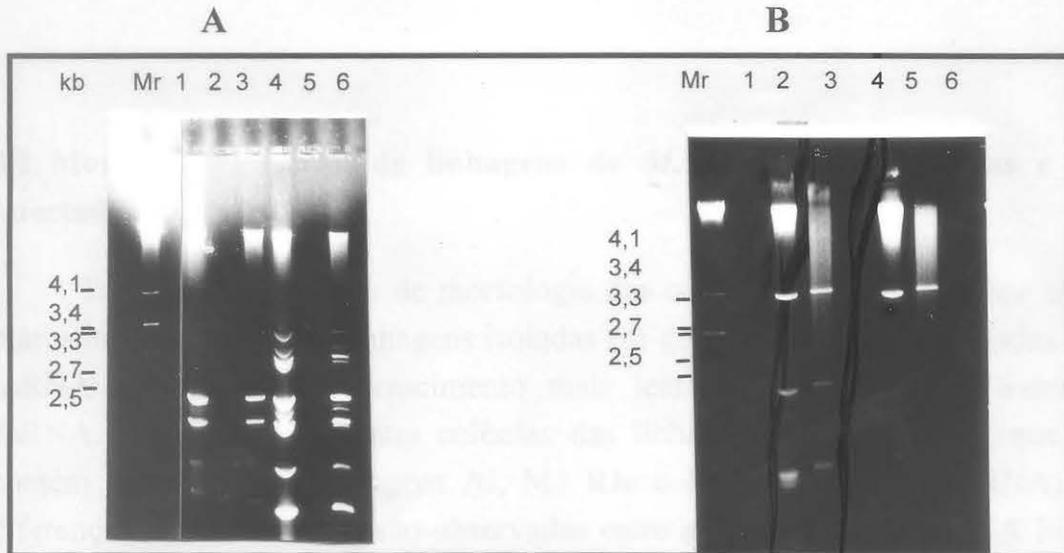


Figura 5. Tratamento das preparações de ácidos nucléicos totais com nuclease S_1 .

A. Ácidos nucléicos totais das linhagens RJd e RJc.

Ácidos nucléicos totais da variante RJd (1, 2, 3) e da linhagem RJc (4, 5, 6). Sem tratamento (1, 4), tratados com nuclease S_1 (3, 6), desnaturados a 100°C por 5 min e posterior tratamento com nuclease S_1 (2, 5). Marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* (Mr). Os números representam os pesos moleculares em kb.

B. Ácidos nucléicos totais das linhagens AI e M5

Ácidos nucléicos totais da linhagem AI (1, 2, 3) e da linhagem M5 (4, 5, 6). Sem tratamento (1, 4), tratados com nuclease S_1 (2, 5), desnaturados a 100°C por 5 min e posterior tratamento com nuclease S_1 (3, 6). Marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* (Mr). Os números representam os pesos moleculares em kb. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V.

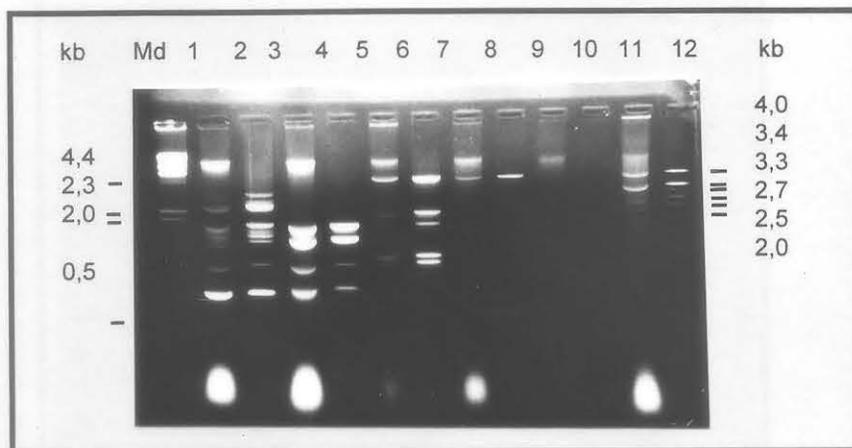


Figura 6. dsRNAs isolados de linhagens de *M. anisopliae* após purificação em colunas de celulose CF11.

Ácidos nucleicos totais das linhagens RJc (1,2), RJd (3,4), Al (5,6), M5 (7,8) e E6 (9,10) e de *A. niger* 1003 (11,12). Antes da cromatografia em celulose (1,3,5,7,9,11), e depois da cromatografia (2,4,6,8,10,12). Os números da direita representam os pesos moleculares em kb de dsRNA *A. niger*. Marcador de peso molecular DNA λ /HindIII (Md). Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V.

3.2. Morfologia colonial de linhagens de *M. anisopliae* infectadas e não infectadas.

Embora as variações de morfologia das colônias de *M. anisopliae* sejam marcantes nas diferentes linhagens isoladas em geral as linhagens infectadas com dsRNA apresentam um crescimento mais lento que as linhagens livres de dsRNA. A Figura 7A mostra colônias das linhagens E6, E9 e MT (que não contém dsRNA) e as linhagens Al, M5 RJc e RJd (que contém dsRNA). As diferenças mais marcantes são observadas entre as duas linhagens RJ. A Figura 7B mostra em maior detalhe o aspecto das colônias das linhagens RJc e RJd.

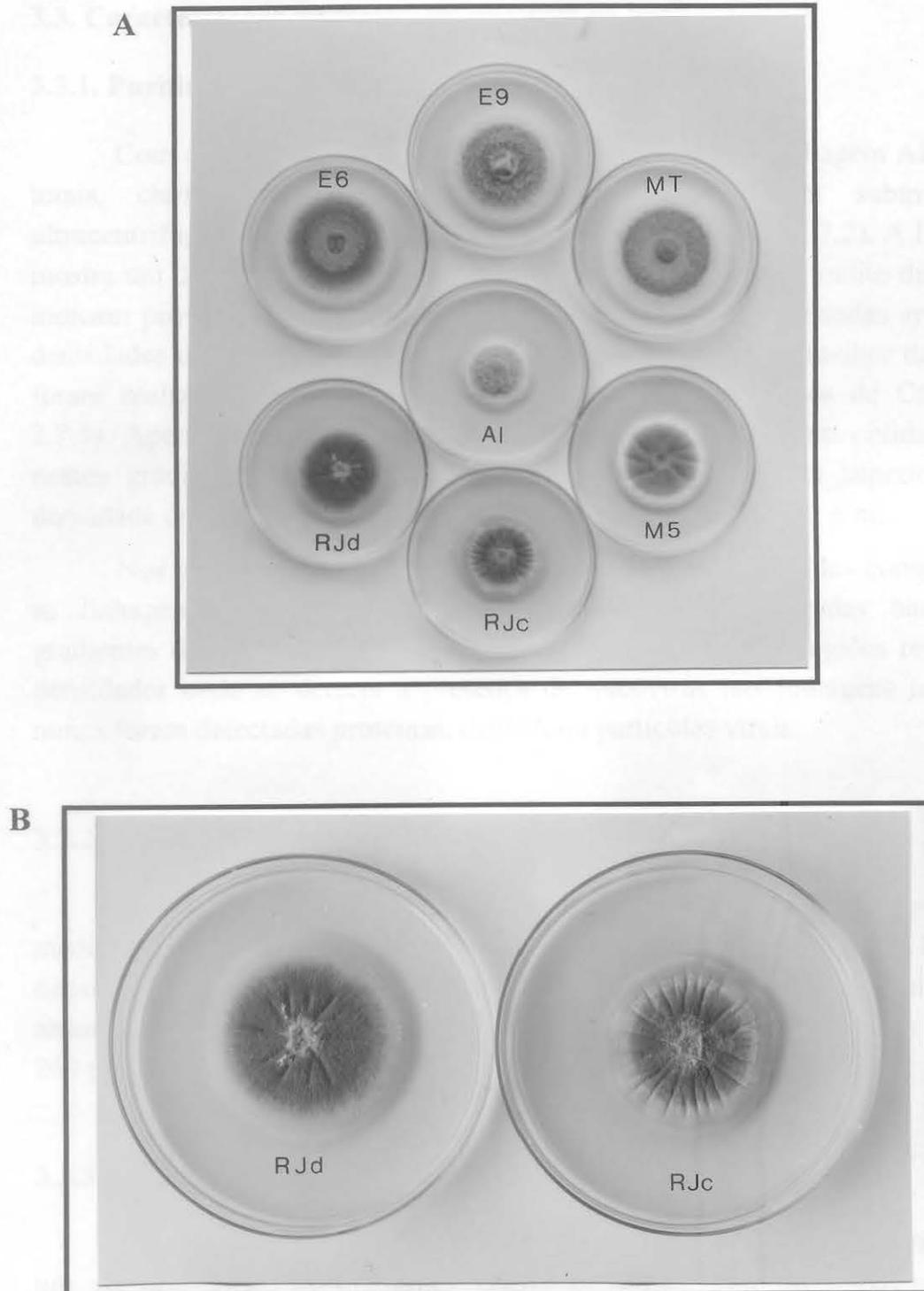


Figura 7. Aspecto da morfologia de colônias de *M. anisopliae*.

A. Linhagens E6, E9, MT, AI, M5, RJd e RJc.

B. Aspecto das colônias das linhagens RJc e RJd.

Os esporos foram crescidos em meio de Cove Completo por 5 dias a 28°C.

3.3. Caracterização do micovírus presente na linhagem Al.

3.3.1. Purificação do micovírus.

Com o objetivo de purificar o micovírus presente na linhagem Al, extratos totais, clarificados por centrifugação diferencial, foram submetidos a ultracentrifugação em gradientes descontínuos de CsCl (item 2.7.2). A Figura 8A mostra um destes gradientes onde são observadas duas bandas muito difusas que indicam prováveis zonas de maior concentração viral. Estas bandas apresentam densidades de 1,25 e 1,32 g/ml. Para se obter uma separação melhor das bandas foram realizadas ultracentrifugações em gradientes isopínicos de CsCl (item 2.7.3). Apenas após a adição de inibidores de proteases foram obtidas bandas nestes gradientes, conforme mostra a Figura 8B. A banda superior possui densidade de flotação de 1,35 g/ml e as inferiores de 1,43 e 1,45 g/ml.

Nos gradientes de CsCl realizados, sempre foram incluídos controles com as linhagens "livres de micovírus", nunca sendo observadas bandas nos gradientes destas linhagens. Nestes gradientes controle, nas regiões relativas às densidades onde se detecta a presença de micovírus nas linhagens infectadas, nunca foram detectadas proteínas, dsRNA ou partículas virais.

3.3.2. Características espectrofotométricas das preparações virais.

A densidade ótica das duas bandas obtidas em gradiente pré-formado foi medida em espectrofotômetro entre 300 e 230 nm (Figura 9). A banda na densidade de 1,32 g/ml apresentou a maior absorbância a 260 nm e uma curva de absorbância característica de nucleoproteínas, com as seguintes leituras A_{\max} em 260 nm, A_{\min} em 240 nm, $A_{260/280}$ de 1,57 e $A_{260/240}$ de 1,23.

3.3.3. Presença de dsRNA em preparações virais

Com o objetivo de observar se as bandas extras de dsRNA se originam de um só tipo viral, as diferentes etapas de purificação do micovírus foram acompanhadas por análise do perfil de dsRNA em gel de agarose corado com brometo de etídio (item 2.11.1). Foram analisadas as etapas de centrifugação diferencial e as bandas obtidas em gradientes de CsCl. As bandas obtidas em gradientes pré-formados de CsCl para esta linhagem foram sempre muito fracas, indicando pouca quantidade de material presente e os dsRNA não foram detectados nestas preparações.

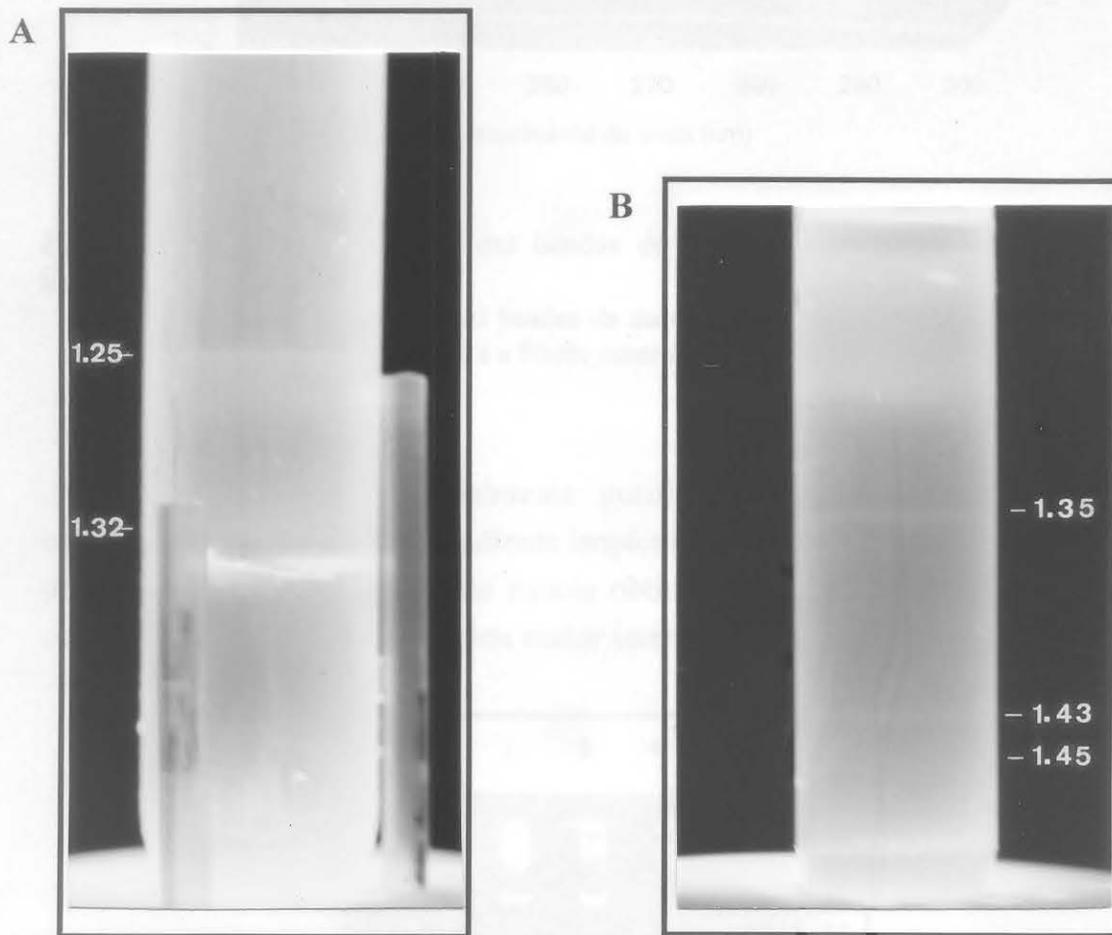


Figura 8. Gradientes de CsCl de extratos da linhagem A1.

A. Gradiente pré-formado

Os números representam a densidade (g/ml) das bandas de maior intensidade que foram coletadas.

B. Gradiente isopícnico

Os números representam a densidade de flotação (g/ml) das bandas indicadas.

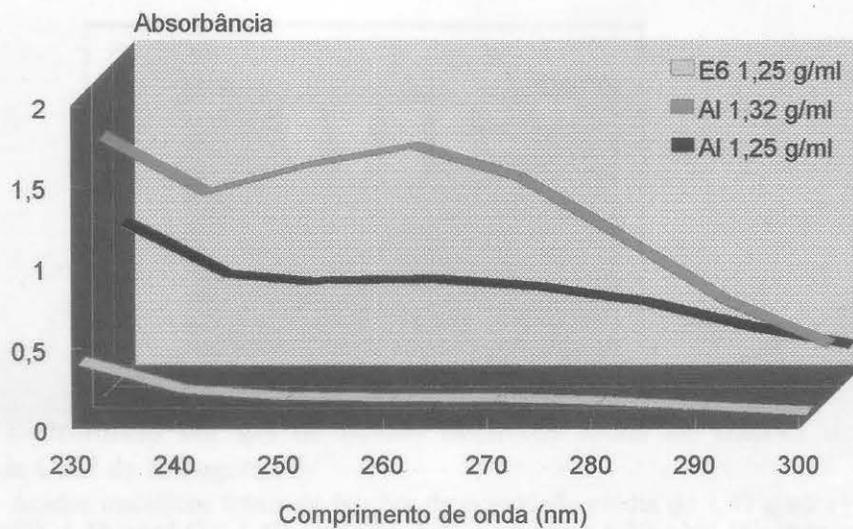


Figura 9. Espectro de absorção das bandas de gradientes pré-formados de CsCl da linhagem Al (MaV-Al).

As linhas representam as bandas de densidade 1,25 e 1,32 g/ml do gradiente pré-formado da linhagem Al e a fração controle de E6 de densidade 1,25 g/ml.

Nas preparações parcialmente purificadas (0,1 volumes) (Figura 10, canaleta 3) e nas frações do gradiente isopícnico (frações reunidas) (Figura 11), o perfil de dsRNA foi semelhante aquele obtido a partir do micélio, sendo que o componente L (4,1 kb) apresentou maior intensidade de fluorescência.

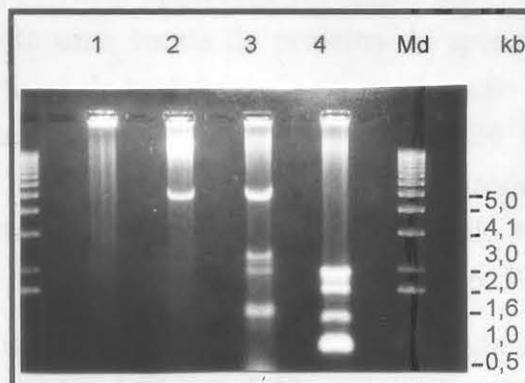


Figura 10. Eletroforese em gel dos ácidos nucleicos totais de preparações de micovírus parcialmente purificados de diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

Preparações parcialmente purificadas das linhagens E6 (controle) (1), M5 (2), Al (3), e RJd (4). (Md) Marcador de peso molecular de DNA (BRL 1 kb ladder). Os números representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA do hospedeiro. O gel de agarose 0,8% foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V.

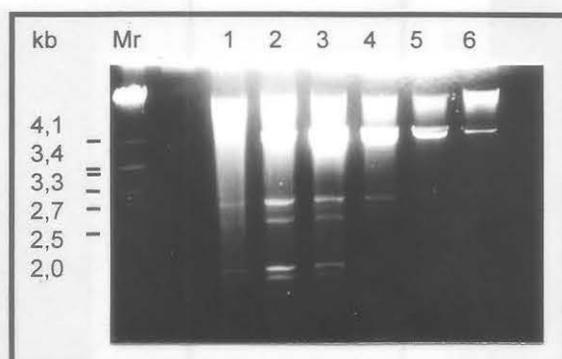


Figura 11. Eletroforese em gel de ácidos nucléicos totais de frações do gradiente isopícnico de CsCl da linhagem Al.

Ácidos nucléicos totais de frações de densidade média de 1,47 g/ml (1), 1,45 g/ml (2), 1,43 g/ml (3), 1,40 g/ml (4), 1,35 g/ml (5) e 1,30 g/ml (6). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger*. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. O gel de agarose 0,8% foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V.

3.3.4. Proteínas em preparações virais

A eletroforese (SDS-PAGE) de preparações parcialmente purificadas por centrifugação diferencial, indica a presença de uma proteína principal de aproximadamente 80 kDa, na linhagem Al. Em algumas preparações outras bandas de menor intensidade puderam ser visualizadas com 76, 66, 59, 34, 27 e 24 kDa (Figura 12A).

Na fração de densidade 1,32 g/ml, de purificações por gradiente pré-formado de CsCl, as proteínas aparecem em quantidade muito pequena, sendo detectada principalmente uma banda de proteína de aproximadamente 80 kDa. Outras bandas mais difusas de proteínas, de migração mais rápida, aparecem nas regiões correspondentes a 76, 66, 59, 50, 34, 27 e 24 kDa, dependendo da preparação (Figura 12B). Esta fração, quando analisada por Western com anticorpo homólogo (item Figura 12) apresenta a banda de 80 kDa, além de outras mais difusas de menor massa molecular nas regiões de 66, 59, 50, 34, 27 e 24 kDa.

Em gradientes isopícnicos de CsCl somente a banda da proteína de 80 kDa é encontrada nas regiões de 1,30 até 1,43 g/ml. Outras bandas protéicas mais difusas, de menor massa molecular, foram observadas nestes gradientes (Figura 12C). Em Western, o polipeptídeo de 80 kDa é revelado na banda de 1,43 g/ml do gradiente em equilíbrio (Figura 12D). É importante salientar que a migração das proteínas nos géis varia muito dependendo da concentração do gel e da quantidade de proteína adicionada, portanto os valores de Mr utilizados são valores médios.

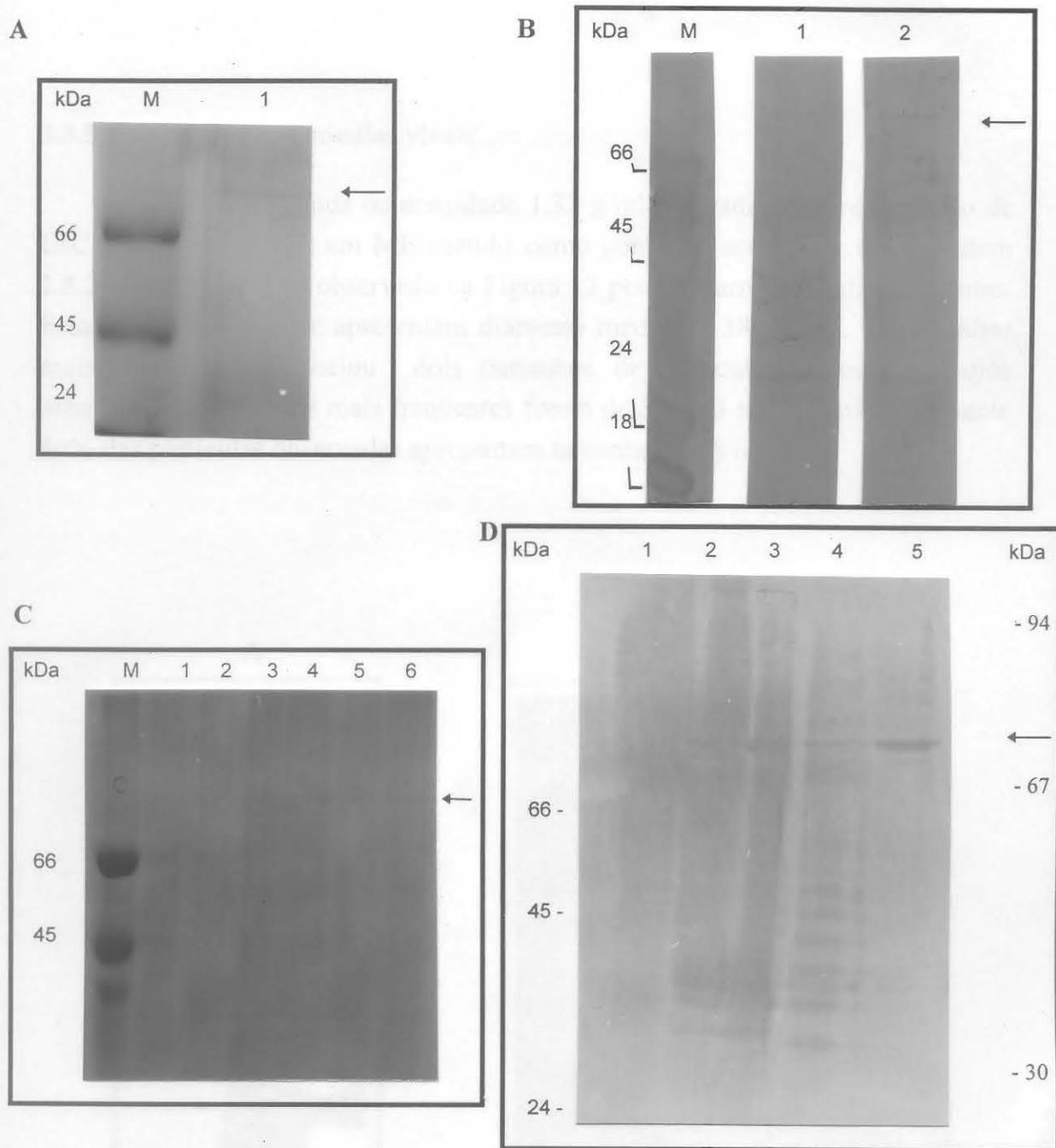


Figura 12. Proteínas das diferentes etapas de purificação do micovírus presente na linhagem A1 (MaV-A1).

A. SDS-PAGE de proteínas da purificação parcial.

Proteínas totais da purificação parcial do micovírus (1). (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

B. SDS-PAGE de proteínas do gradiente pré-formado de CsCl.

Proteínas totais das bandas de densidade 1,25 (1) e 1,32 g/ml (2). (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

C. SDS-PAGE de proteínas de frações de gradiente isopícnico de CsCl

Proteínas totais de frações de densidade de flotação 1,42 g/ml (1), 1,46 g/ml (2), 1,45 g/ml (3), 1,43 g/ml (4), 1,39 g/ml (5), e 1,35 g/ml (6). (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

D. Western das diferentes etapas de purificação do micovírus, revelado com antisoro homólogo.

Homogenato da linhagem E6 (controle) (1), homogenato da linhagem A1 (2), purificação parcial do micovírus (3), banda de gradiente pré-formado em CsCl da densidade 1,32 g/ml (4), banda do gradiente em equilíbrio da densidade de flotação 1,35 g/ml (5). Os números representam as massas moleculares em kDa.

3.3.5. Detecção de partículas virais

Amostras da banda de densidade 1,32 g/ml de gradientes pré-formado de CsCl foram analisadas em ME usando como contraste acetato de uranila (item 2.8.2). Como pode ser observado na Figura 13 poucas partículas estão presentes. Estas são isométricas e apresentam diâmetro médio de 38 ± 2 nm. Uma análise mais detalhada evidenciou dois tamanhos de partículas isométricas cujos diâmetros aproximados mais freqüentes foram de 38 e 43 nm. Aproximadamente 80% das partículas observadas apresentam tamanho de 38 nm.

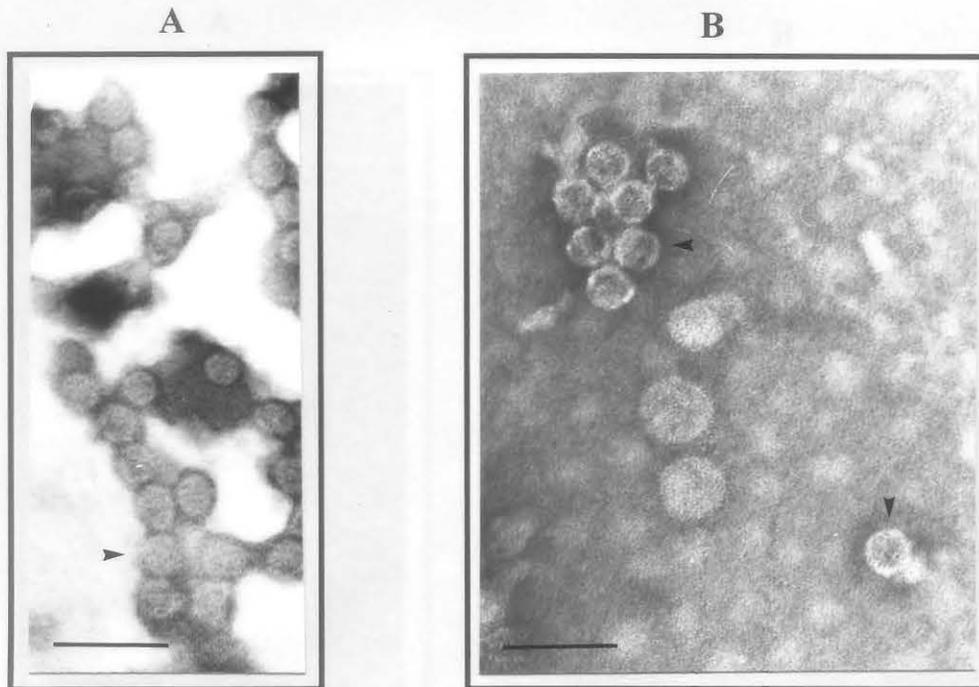


Figura 13. Microscopia eletrônica do micovírus da linhagem A1.

A. Purificação parcial

B. Gradiente pré-formado

Banda de densidade 1,32 g/ml. As setas indicam VLPs observadas.

As preparações foram contrastadas negativamente com acetato de uranila 2%. A barra representa 100 nm.

3.4. Caracterização do micovírus presente na linhagem M5

3.4.1. Purificação do micovírus

Para caracterizar o micovírus presente na linhagem M5 inicialmente se procedeu a sua purificação. Em gradientes pré-formados de CsCl foram detectadas duas bandas difusas (Figura 14A) que foram analisadas quanto a suas características espectrofotométricas, seu conteúdo de dsRNA, proteínas e morfologia das partículas presentes. Em gradientes isopícnicos duas bandas foram observadas nas densidades de flotação de 1,40 e 1,43 g/ml como mostrado na Figura 14B. A detecção destas bandas somente ocorreu quando os extratos foram tratados com inibidores de proteases indicando um processo marcante de proteólise dos capsídeos nos extratos.

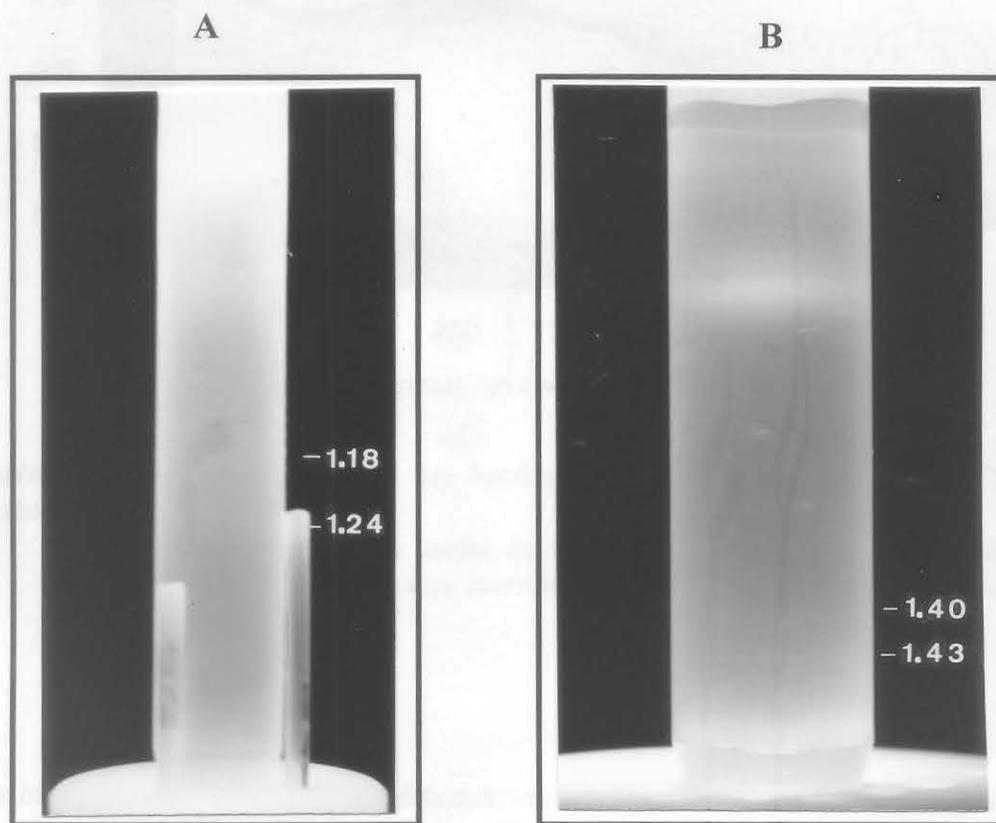


Figura 14. Gradientes de CsCl de extratos da linhagem M5.

A. Gradiente pré-formado

Os números representam a densidade em g/ml das bandas indicadas.

B. Gradiente isopícnico

Os números representam a densidade de flotação em g/ml das bandas indicadas.

3.4.2. Características espectrofotométricas das preparações virais

Foram procedidas leituras de absorvância entre 300 e 230 nm de duas das bandas do gradiente pré-formado de CsCl. Estas bandas apresentam um espectro de absorção característico de nucleoproteínas (Figura 15). As relações numéricas entre estas leituras estão apresentadas na Tabela 3.

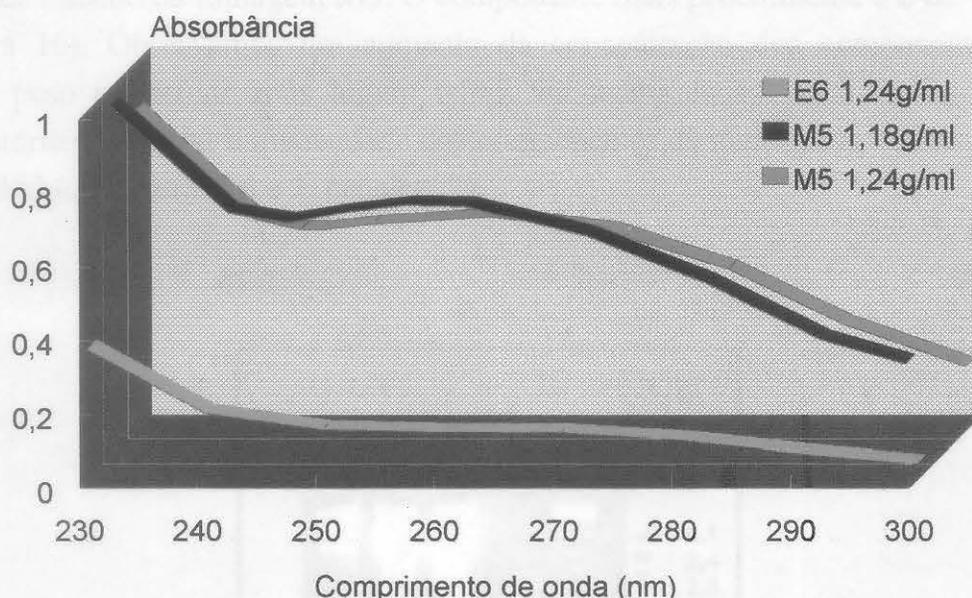


Figura 15. Espectro de absorção das bandas de gradiente pré-formado de CsCl de extrato da linhagem M5.

As linhas representam as bandas de densidade 1,18 e 1,24 g/ml do gradiente pré-formado da linhagem M5 e ao controle da linhagem E6 correspondente à densidade de 1,24 g/ml.

Tabela 3: Características espectrofotométricas das bandas obtidas no gradiente pré-formado de CsCl de extratos da linhagem M5.

| Banda | Densidade | A_{\max} | A_{\min} | $A_{260/280}$ | $A_{260/240}$ |
|----------|-----------|------------|------------|---------------|---------------|
| superior | 1,18g/ml | 254 | 245 | 1,44 | 1,03 |
| inferior | 1,24 g/ml | 260 | 245 | 1,32 | 1,01 |

3.4.3. Presença de dsRNA em preparações virais

Após a centrifugação diferencial dos extratos da linhagem M5 (0,1 volumes da preparação) foram detectadas bandas de dsRNA após eletroforese em gel de agarose (Figura 9, canaleta 2). Nas bandas dos gradientes pré-formados não foram detectados dsRNAs, mas nos gradientes isopícnicos eles foram detectados em frações reunidas. O perfil de bandas de dsRNA encontrado é o mesmo que aquele presente em preparações de ácidos nucleicos totais extraídos diretamente a partir de micélio da linhagem M5. O componente mais proeminente é o de 4.1 kb (Figura 16). Observamos um aumento da concentração dos componentes de maior peso molecular após algum tempo de manipulação desta linhagem no laboratório (comparar a intensidade dos componentes de maior peso molecular de MaV-M5 nas Figuras 16 e 3, canaleta 2).

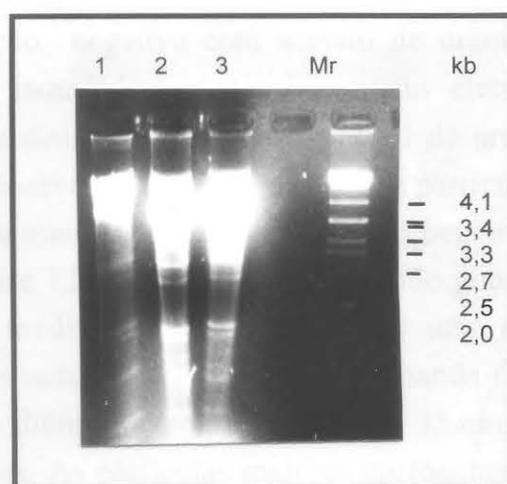


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos ácidos nucleicos totais de frações do gradiente isopícnico de CsCl da linhagem M5.

Ácidos nucleicos totais de extrato da linhagem M5 (1) e das frações de gradiente de densidade média 1,43 g/ml (2) e 1,40 g/ml (3). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger*. Os números da direita representam os pesos moleculares em kb. O gel de agarose 0,8% foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V.

3.4.4. Proteínas em preparações virais

SDS-PAGE de preparações de micovírus parcialmente purificadas, por centrifugação diferencial, de extratos da linhagem M5, apresentam duas bandas principais de aproximadamente 80 e 76 kDa. Outras bandas de menor intensidade apresentam migração na faixa entre 34 e 24 kDa (Figura 17A). Em purificações por gradiente pré-formado de CsCl, a banda de densidade 1,24 g/ml apresenta as proteínas de 80 e 76 kDa (Fig 17B). Em gradientes isopícnicos de CsCl nas regiões de densidades 1,40 e 1,43 g/ml, se observa a banda de proteína de 80 kDa (Fig 17C). Western com soro homólogo de MaV-M5 (item 2.10.1) mostra que a principal banda reconhecida pelo soro é a da região de migração de 80 kDa, em ambos tipos de gradiente de CsCl (Figura 17D).

3.4.5. Detecção de partículas virais

Após a coloração negativa com acetato de uranila (item 2.8.2), foram detectadas partículas isométricas por microscopia eletrônica nas bandas de gradientes de CsCl de densidade 1,18 e 1,24 g/ml de preparações da linhagem M5. Como pode ser observado na Figura 18 poucas partículas estão presentes. Na densidade 1,18 g/ml, a maioria das partículas estão penetradas pelo contrastante, e na banda de densidade 1,24 g/ml as partículas estão pouco ou não penetradas e apresentam diâmetro médio de $35 \pm 1,3$ nm. Após uma análise mais detalhada foram observados dois tamanhos de partículas na banda de densidade 1,24 g/ml. As menores, com um diâmetro mais freqüente de 35 nm, correspondem a 70% das partículas presentes. As partículas maiores apresentam aproximadamente 43 nm de diâmetro (não mostradas).

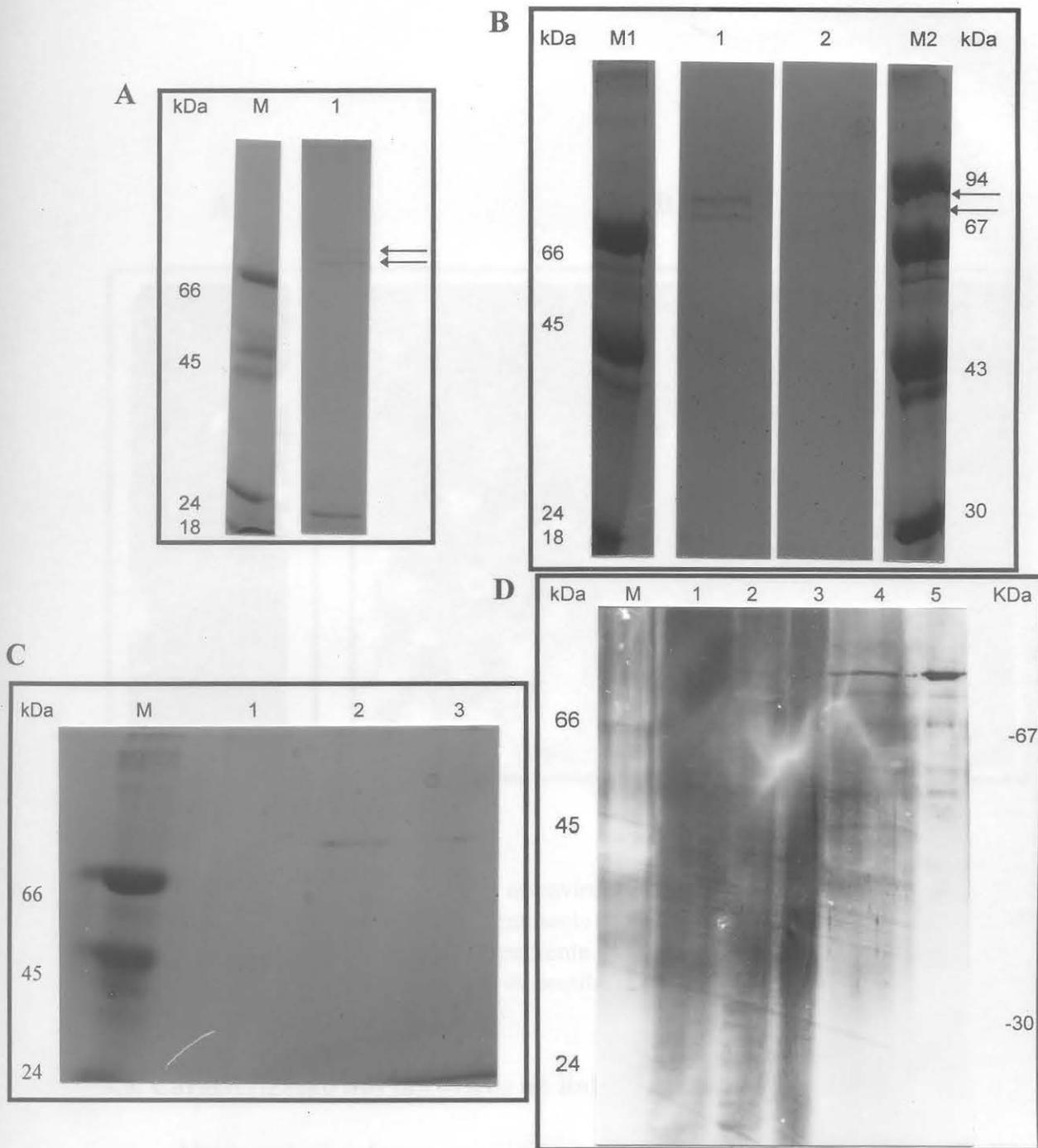


Figura 17. Proteínas das diferentes etapas de purificação do micovírus presente na linhagem M5 (MaV-M5).

A. SDS-PAGE de proteínas da purificação parcial.

Proteínas totais da purificação parcial do micovírus (1). (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

B. SDS-PAGE de proteínas do gradiente pré-formado de CsCl.

Proteínas totais da banda de densidade 1,24 g/ml da linhagem M5 (1), proteínas totais da banda de gradiente pré-formado da linhagem A1. (M1, M2) marcadores de massa molecular. Os números representam as massas moleculares em kDa.

C. SDS-PAGE de proteínas de frações de gradiente isopícnico de CsCl

Proteínas totais de frações de densidade de flotação 1,45 g/ml (1), 1,43 g/ml (2), 1,40 g/ml (3). (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

D. Western das diferentes etapas de purificação do micovírus, revelado com antígeno homólogo.

Homogenato da linhagem E6 (controle) (1), homogenato da linhagem M5 (2), purificação parcial do micovírus (3), banda viral de gradiente pré-formado em CsCl da densidade 1,24 g/ml (4), banda viral do gradiente isopícnico da densidade de flotação 1,43 g/ml (5). (M): marcador de massa molecular. Os números representam as massas moleculares em kDa.

3.5.1. Caracterização do micovírus presente na linhagem RJc

3.5.1.1. Caracterização do micovírus

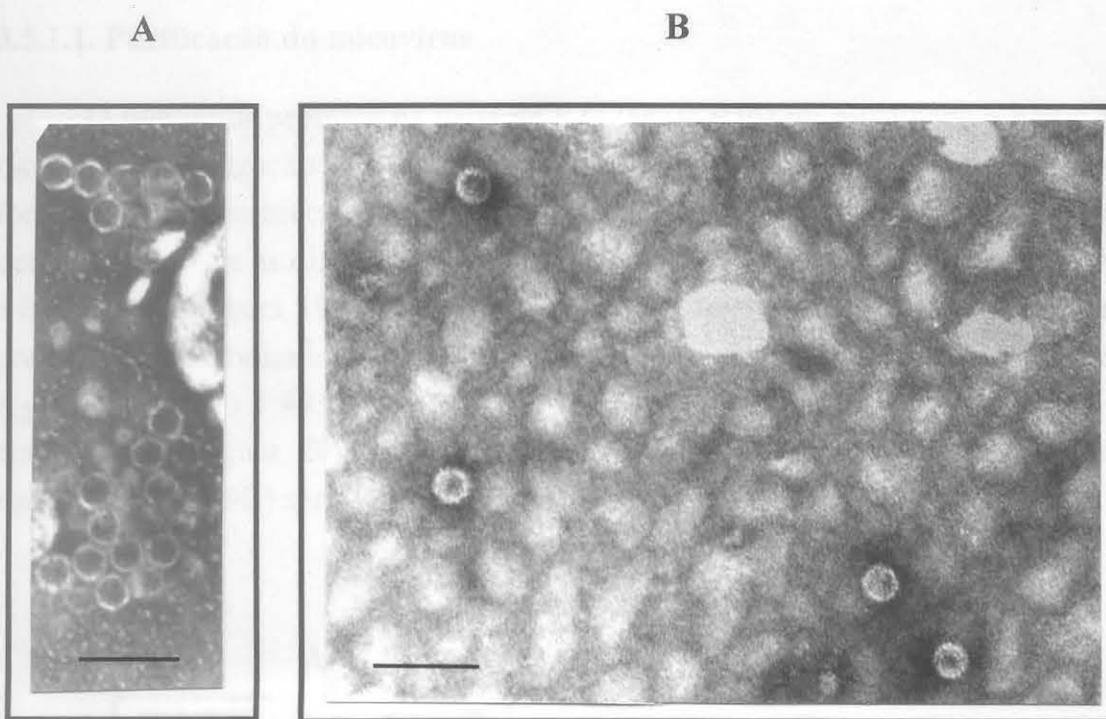


Figura 18. Microscopia eletrônica do micovírus da linhagem M5.

A. Banda de densidade 1,18 g/ml do gradiente pré-formado.

B. Banda de densidade 1,24 g/ml do gradiente pré-formado.

Contrastadas negativamente com acetato de uranila 2%. A barra representa 100 nm.

3.5. Caracterização dos micovírus na linhagem RJc e na variante RJd

Neste trabalho foram analisadas uma linhagem de *M. anisopliae* RJc, originalmente isolada de insetos pelo Prof. J.L. Azevedo (ESALQ), e a variante RJd (item 2.1.1.). Apresentaremos a caracterização do micovírus presente em cada uma das linhagens, iniciando pela variante RJd que foi inicialmente caracterizada. Algumas características do micovírus presente na linhagem RJc já haviam sido descritas (BOGO *et al.*, 1991; BOGO *et al.*, 1996). A linhagem RJc e a variante RJd apresentam um perfil mais complexo e constante, de componentes dsRNA do que aquele observado nas outras linhagens (Figura 3).

Figura 19. Caracterização do micovírus da linhagem RJc.

A. Gradiente pré-formado.

Os micovírus apresentam-se sedimentando em uma das bandas inferiores.

B. Gradiente formado.

Os micovírus sedimentam a densidade de 1,24 g/ml em uma das bandas inferiores.

3.5.1. Caracterização do micovírus presente na variante RJd

3.5.1.1. Purificação do micovírus

O micovírus presente na variante RJd (MaV-RJd) foi purificado a partir de ciclos de centrifugação diferencial seguidos de centrifugação em gradientes pré-formados ou isopícnicos de CsCl. As características espectrofotométricas foram determinadas para as diferentes bandas nos gradientes pré-formados (Figura 19A) e isopícnicos (Figura 19B) de CsCl. A banda com maior A_{260} (1,58), obtida em gradientes pré-formados na densidade de 1,26 g/ml, apresentou relações A_{260}/A_{280} igual a 1,44 e A_{260}/A_{240} igual a 1,13 sendo A_{\max} em 260 nm e A_{\min} em 240 nm (Figura 20). Nos gradientes isopícnicos foram observadas várias bandas (Figura 19B) sendo obtido apenas um pico de A_{260} (Figura 21).

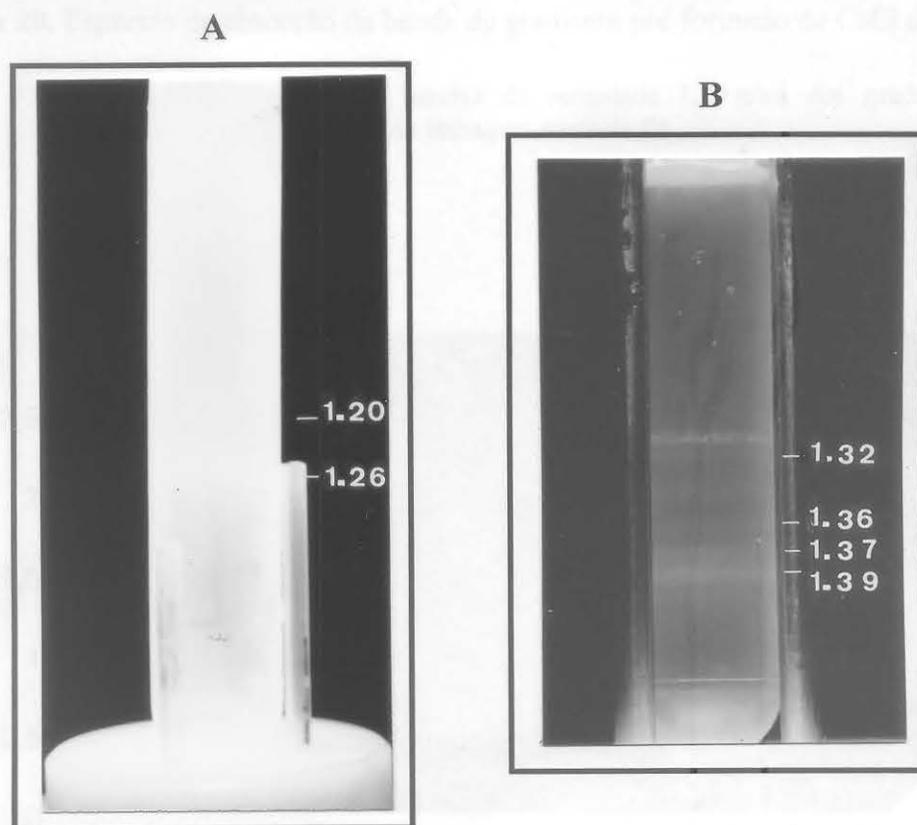


Figura 19. Gradientes de CsCl de extratos da variante RJd.

A. Gradiente pré-formado

Os números representam a densidade em g/ml das bandas indicadas.

B. Gradiente isopícnico

Os números representam a densidade de flotação em g/ml das bandas indicadas.

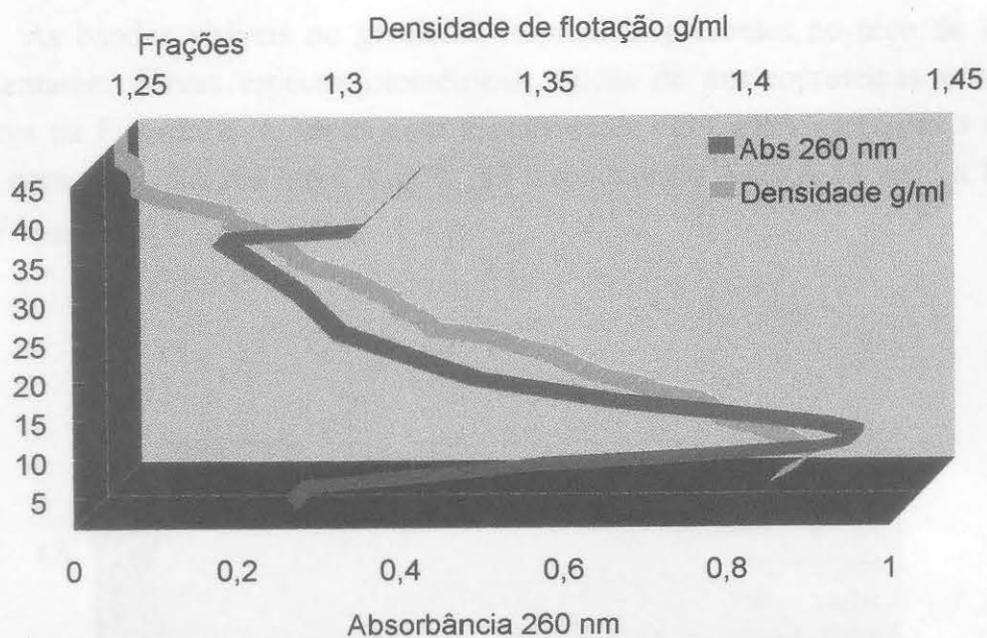


Figura 20. Espectro de absorção da banda de gradiente pré-formado de CsCl da variante RJd.

As linhas representam as bandas de densidade 1,24 g/ml dos gradientes pré-formados da variante RJd e da linhagem controle E6.

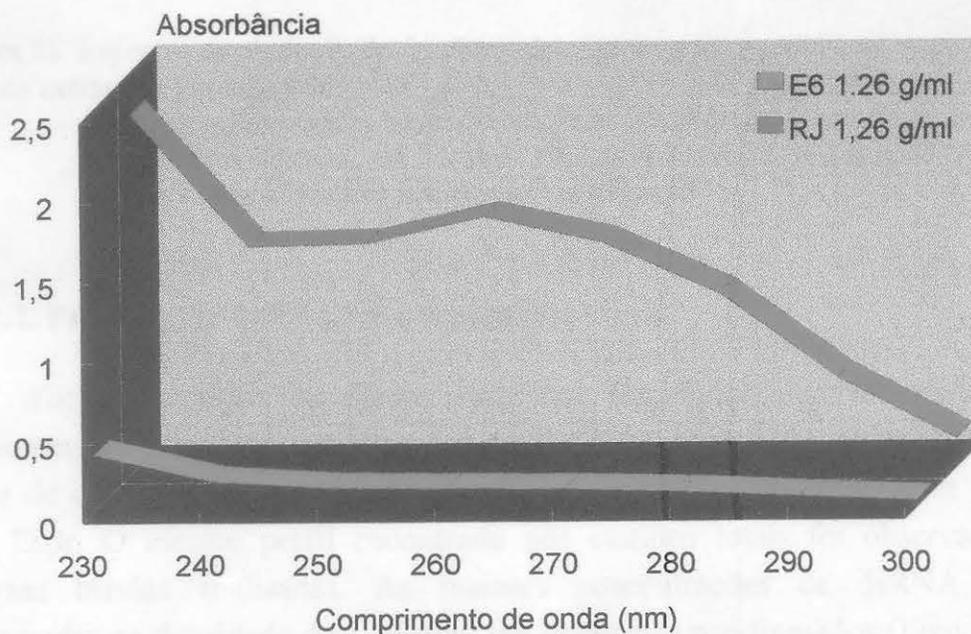


Figura 21. Absorbância a 260 nm das frações coletadas do gradiente isopícnico da variante RJd.

As bandas visíveis no gradiente isopícnico, presentes no pico de A_{260} , apresentaram curvas espectrofotométricas típicas de nucleoproteínas como se observa na Figura 22. A banda com densidade de 1,39 g/ml, apresenta a maior A_{260} com A_{\max} em 258 nm e A_{\min} a 243 nm e relação A_{260}/A_{280} igual a 1,43 e A_{260}/A_{240} igual a 1,17.

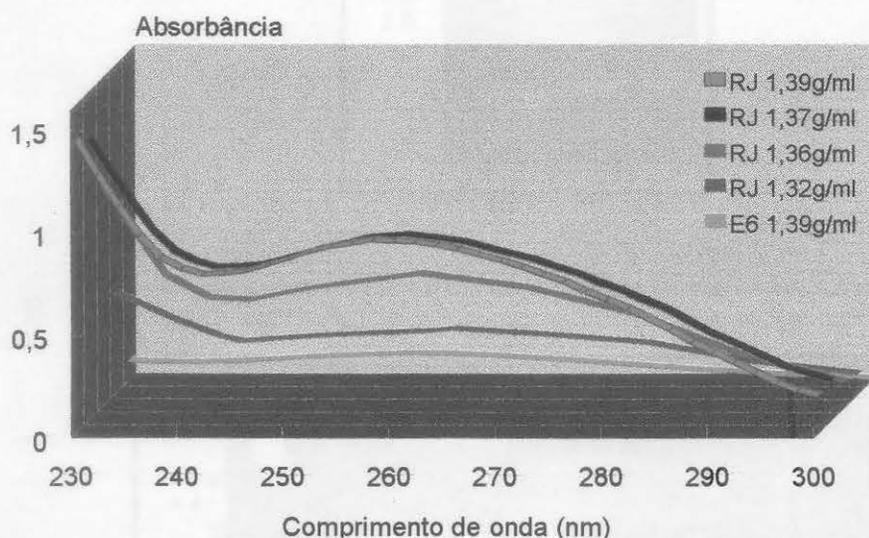


Figura 22. Espectro de absorção de frações coletadas a partir de gradiente isopícnico de CsCl de extrato da variante RJd.

As linhas representam as bandas coletadas de gradiente isopícnico da variante RJd, de densidades indicadas, e a fração da linhagem controle E6 de densidade 1,39 g/ml, correspondente à banda de RJd de maior absorbância.

3.5.1.2. Presença de dsRNA em preparações virais

Foram extraídos os ácidos nucléicos totais das diversas bandas de gradientes pré-formados e isopícnicos de CsCl de extratos da variante RJd. Os perfis de dsRNAs foram verificados por eletroforese em gel de agarose corado com EtBr. O mesmo perfil encontrado nos extratos totais foi observado nas diversas bandas analisadas. As maiores concentrações de dsRNA foram encontradas na densidade de 1,26 g/ml em gradientes pré-formados (Figura 23A) e nas frações de maior A_{260} nos gradientes isopícnicos, nas densidades 1,39 e 1,37 g/ml (Figura 23B, canaletas 4 e 6, respectivamente).

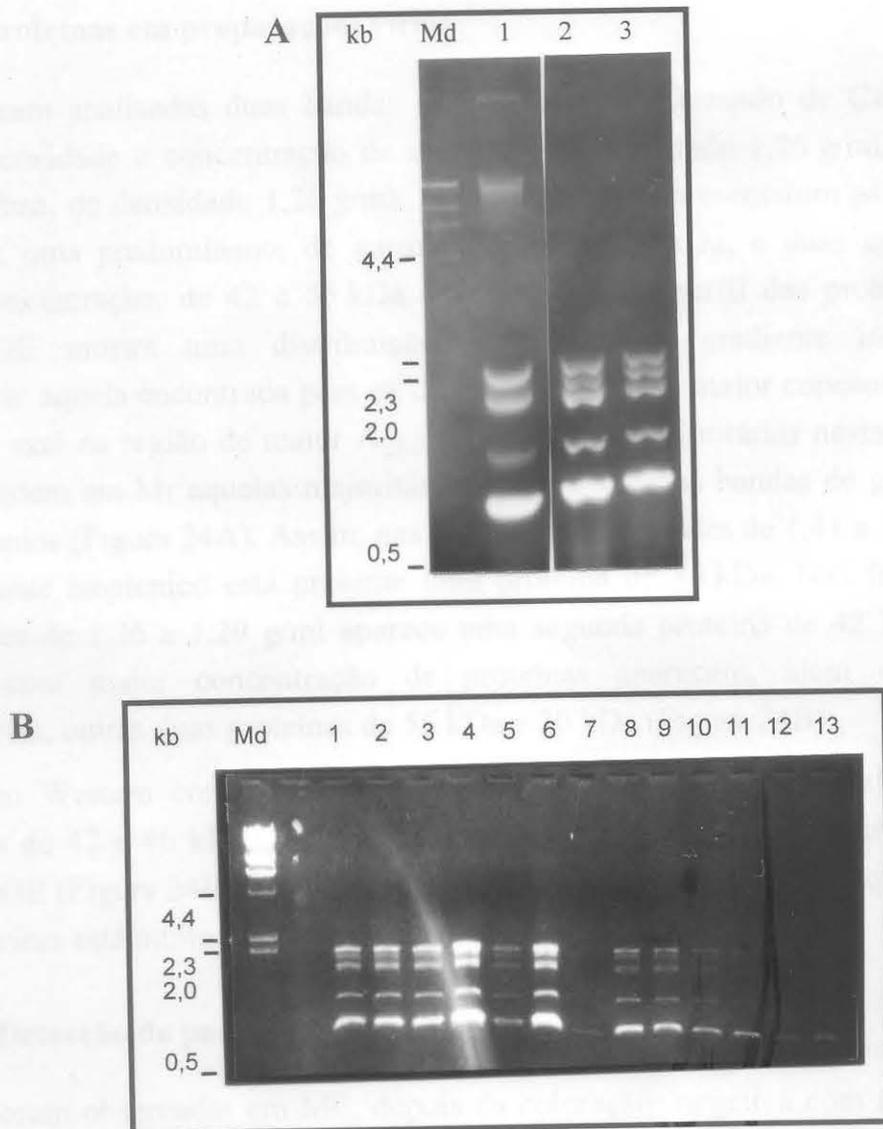


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose dos ácidos nucléicos totais de frações de gradientes de CsCl da variante RJd.

A. Gradiente pré-formado

Ácidos nucléicos totais de extrato da linhagem RJd (1) e das frações de gradiente de densidade 1,26 g/ml (2) e 1,20 g/ml (3). (Md) marcador de peso molecular DNA de fago λ clivado com *Hind*III. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA do hospedeiro.

B. Gradiente isopícnico

Ácidos nucléicos totais das frações f6 (1); f7 (2); f8 (3); f9 (4); f10 (5); f12 (6); f13 (7); f14 (8); f16 (9); f18 (10); f21 (11); f24 (12) e f27 (13), em ordem decrescente de densidade. (Md) marcador de peso molecular DNA de fago λ clivado com *Hind*III. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb.

Os géis de agarose 0,8% foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V.

3.5.1.3. Proteínas em preparações virais

Foram analisadas duas bandas do gradiente pré-formado de CsCl, a de maior intensidade e concentração de dsRNAs, de densidade 1,26 g/ml, e outra muito difusa, de densidade 1,20 g/ml. As duas bandas apresentaram as mesmas proteínas, uma predominante de aproximadamente 46 kDa, e duas outras em menor concentração, de 42 e 55 kDa (Figura 24A). O perfil das proteínas em SDS-PAGE mostra uma distribuição, ao longo do gradiente isopícnico, semelhante aquela encontrada para os dsRNAs, ou seja, a maior concentração de proteínas está na região de maior A_{260} . As proteínas majoritárias nestas regiões correspondem em M_r aquelas majoritárias encontradas nas bandas de gradientes pré-formados (Figura 24A). Assim, nas frações de densidades de 1,41 a 1,26 g/ml do gradiente isopícnico está presente uma proteína de 46 kDa. Nas frações de densidades de 1,36 a 1,29 g/ml aparece uma segunda proteína de 42 kDa. Nas frações com maior concentração de proteínas aparecem, além das duas majoritárias, outras duas proteínas de 55 kDa e 30 kDa (Figura 24B).

Em Western com antisoro homólogo são detectadas principalmente as proteínas de 42 e 46 kDa (Figura 24C e D). As demais bandas observadas em SDS-PAGE (Figura 24B e C) somente reagem com antisoro quando a quantidade do micovírus está muito aumentada.

3.5.1.4. Detecção de partículas virais

Foram observadas em ME, depois da coloração negativa com acetato de uranila (item 2.8.2), algumas amostras de bandas do gradiente isopícnico, sendo detectado em todas elas apenas um tipo de partícula viral, isométrica. O diâmetro mais freqüente das partículas nas quais o contrastante não penetrou foi de 35 nm e sua média de 35 ± 2 nm, independentemente da banda do gradiente analisada, e nas partículas penetradas o diâmetro foi diminuindo progressivamente com a densidade das bandas do gradiente isopícnico. Observa-se que a porcentagem de partículas não penetradas reduz conforme diminui a densidade das bandas do gradiente. Por exemplo, na fração do gradiente com densidade 1,390 g/ml, foram observadas partículas pouco ou não penetradas pelo contrastante (Figura 25A); a fração de densidade 1,362 g/ml, apresentou aproximadamente 20 % de partículas penetradas pelo contrastante, com 31 ± 2 nm de diâmetro aproximadamente (Figura 25B); a fração com 1,321 g/ml de densidade, continha 87% de partículas penetradas, com aproximadamente 27 ± 2 nm de diâmetro (Figura 25C). Na Figura 25D se observam as partículas presentes na fração de densidade 1,376 g/ml.

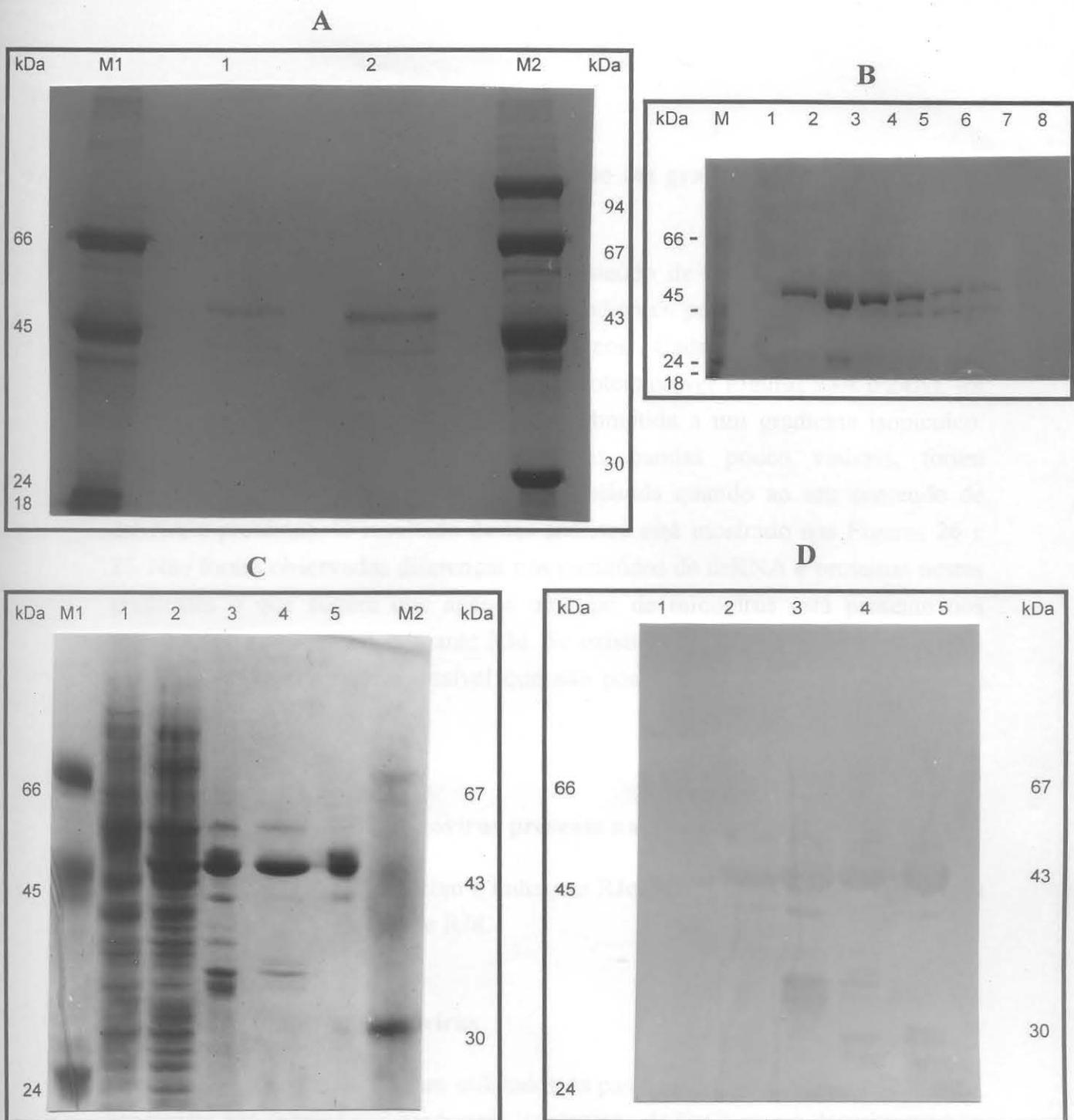


Figura 24. Proteínas das diferentes etapas de purificação do micovírus presente na variante RJd (MaV-RJd).

A. SDS-PAGE de proteínas de gradiente pré-formado de CsCl .

Proteínas totais das bandas de densidade 1,26 g/ml (1) e 1,20 g/ml (2). (M1 e M2): marcadores de massa molecular. Os números representam as massas moleculares em kDa.

B. SDS-PAGE de proteínas de frações de gradiente em equilíbrio de CsCl.

Proteínas totais das frações f1 (1); f6 (2); f12 (3); f16 (4); f21 (5); f27 (6); f31 (7) e f36 (8), em ordem decrescente de densidade de flotação. (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

C. SDS-PAGE de proteínas das diferentes etapas de purificação

Homogenato da linhagem E6 (controle) (1), homogenato da variante RJd (2), purificação parcial do micovírus (3), banda de gradiente pré-formado em CsCl da densidade 1,26 g/ml (4), banda do gradiente isopícnico da densidade de flotação 1,32 g/ml (5). Os números representam as massas moleculares em kDa.

D. Western das diferentes etapas de purificação do micovírus, revelado com antisoro homólogo.

A seqüência das amostras é a mesma que em C.

3.5.1.5 Análise das bandas de sedimentação em gradientes pré-formados de CsCl de MaV-RJd

Com o propósito de examinar o conteúdo de cada uma das bandas de sedimentação obtidas rotineiramente em gradientes pré-formados foi procedida sua análise utilizando gradientes isopícnicos. Cada uma das bandas, que apresenta o mesmo conteúdo de dsRNA e proteínas (ver Figuras 23A e 24A), foi coletada de um gradiente pré-formado e submetida a um gradiente isopícnico. Estes gradientes, que mostraram algumas bandas pouco visíveis, foram fracionados e cada uma das frações foi analisada quando ao seu conteúdo de dsRNA e proteínas. O resultado destas análises está mostrado nas Figuras 26 e 27. Não foram observadas diferenças nos conteúdos de dsRNA e proteínas nestes gradientes o que sugere que apenas um tipo de micovírus está presente nos extratos de *M. anisopliae* variante RJd. Se existir mais de um tipo de micovírus presente nesta linhagem é possível que não possam ser separados empregando esta técnica.

3.5.2. Caracterização do micovírus presente na linhagem RJc

Os resultados obtidos com a linhagem RJc foram sempre comparados com aqueles obtidos para a variante RJd.

3.5.2.1. Purificação do micovírus

Para a purificação foram utilizados os passos de centrifugação diferencial, gradientes pré-formados e gradientes isopícnicos de CsCl, como descrito para os micovírus presentes nas outras linhagens de *M. anisopliae*. Foi observado nos gradientes de CsCl da linhagem RJc um perfil de bandas semelhante aquele encontrado para a variante RJd em purificações simultâneas como mostra a Figura 28. Assim, apesar da diferença no perfil de componentes de dsRNA entre as linhagens RJd e RJc, não ocorre alteração no bandeamento das partículas nos gradientes de CsCl.

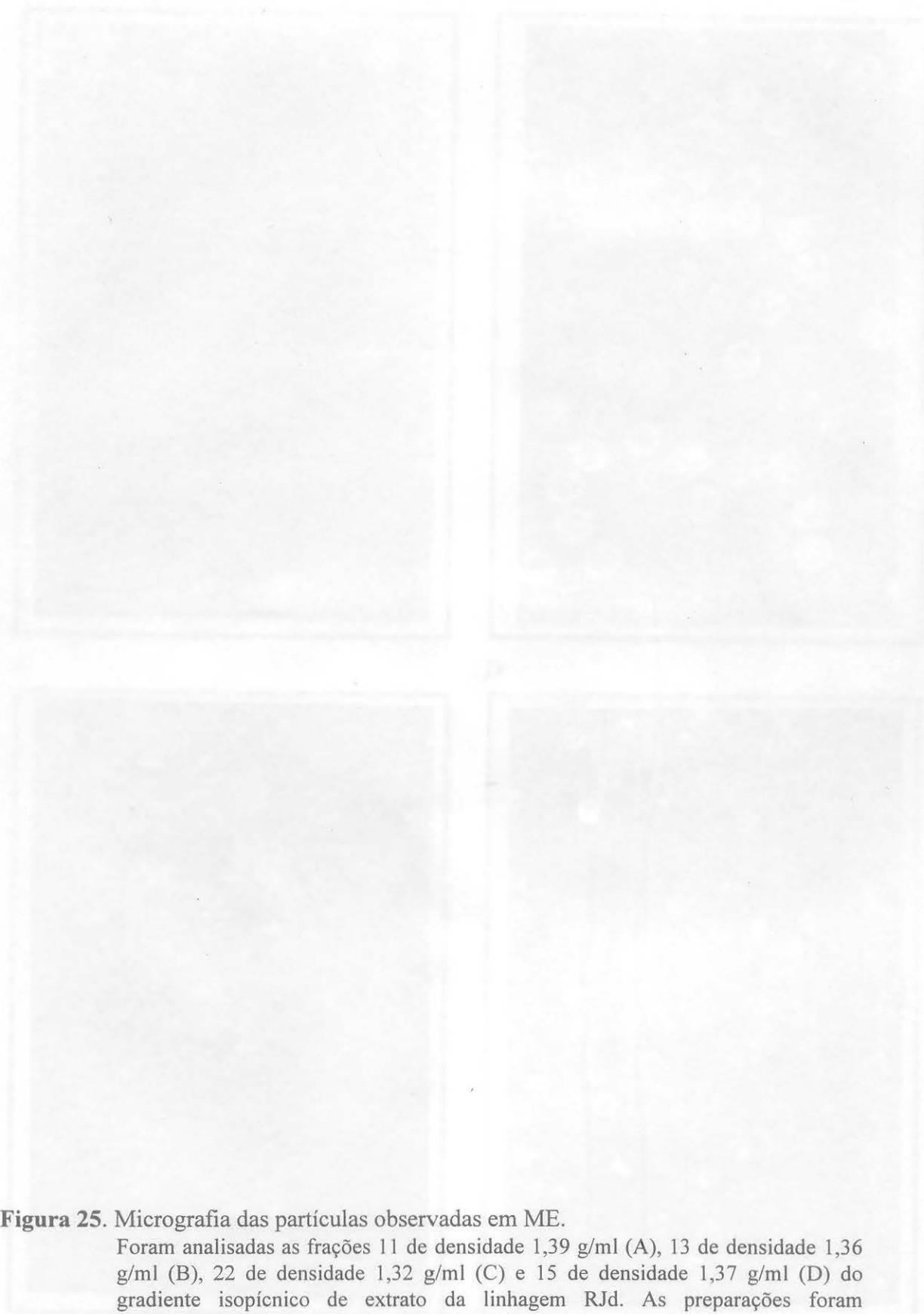
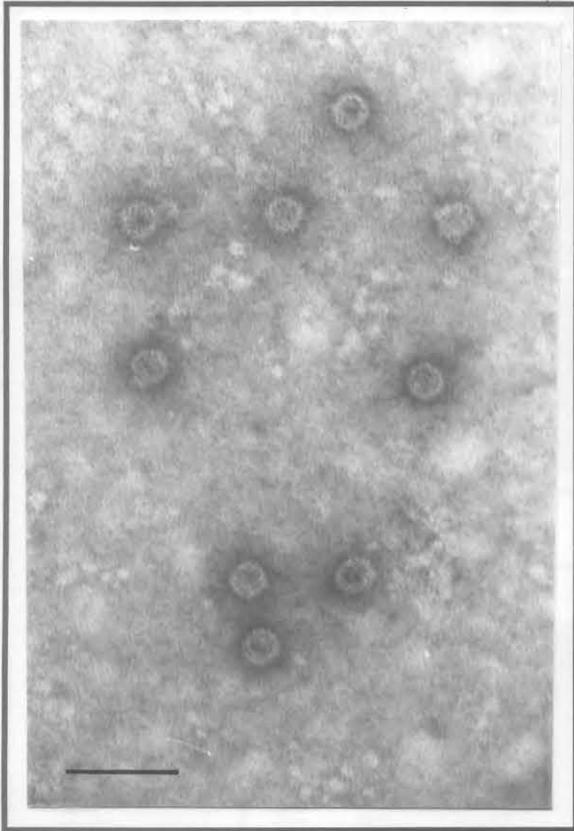


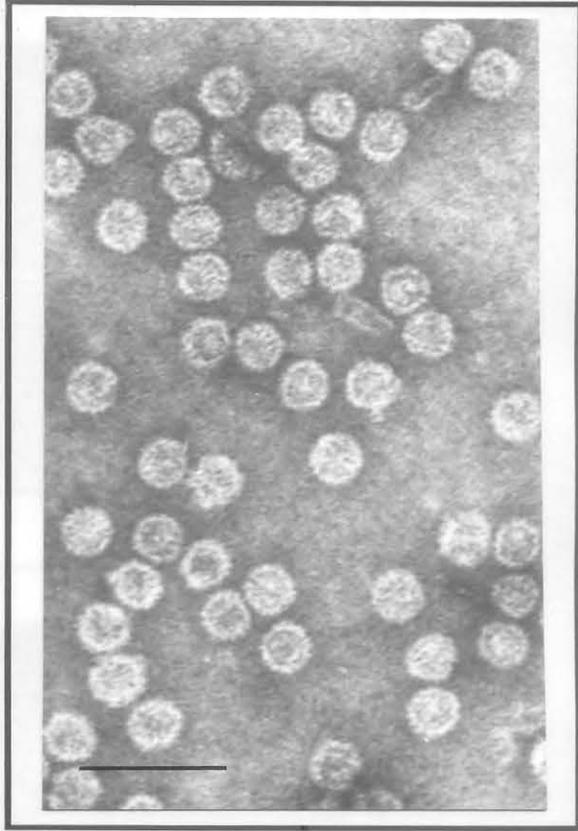
Figura 25. Micrografia das partículas observadas em ME.

Foram analisadas as frações 11 de densidade 1,39 g/ml (A), 13 de densidade 1,36 g/ml (B), 22 de densidade 1,32 g/ml (C) e 15 de densidade 1,37 g/ml (D) do gradiente isopícnico de extrato da linhagem RJd. As preparações foram contrastadas com acetato de uranila 2%. A barra representa 100 nm.

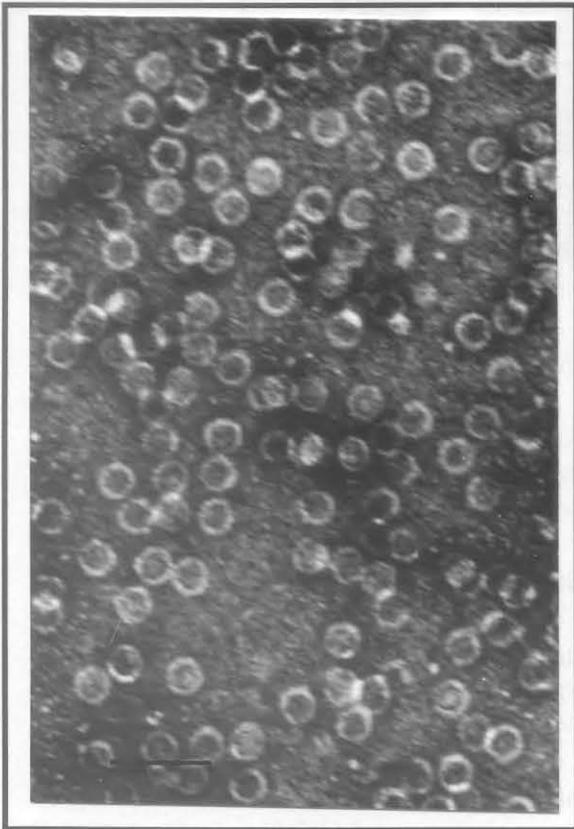
A



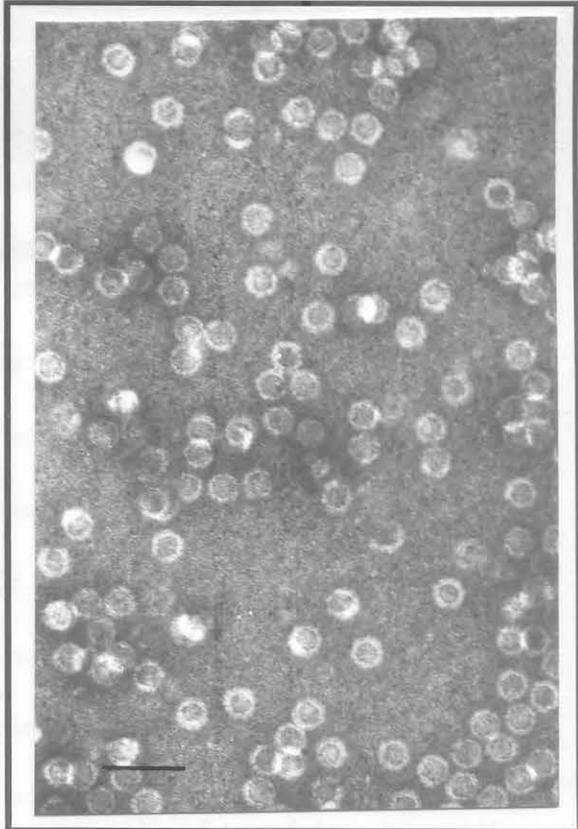
B



C



D



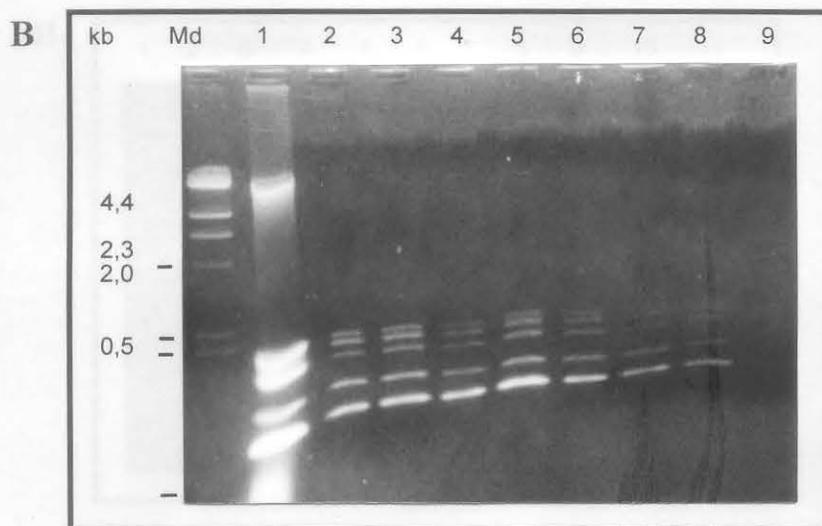
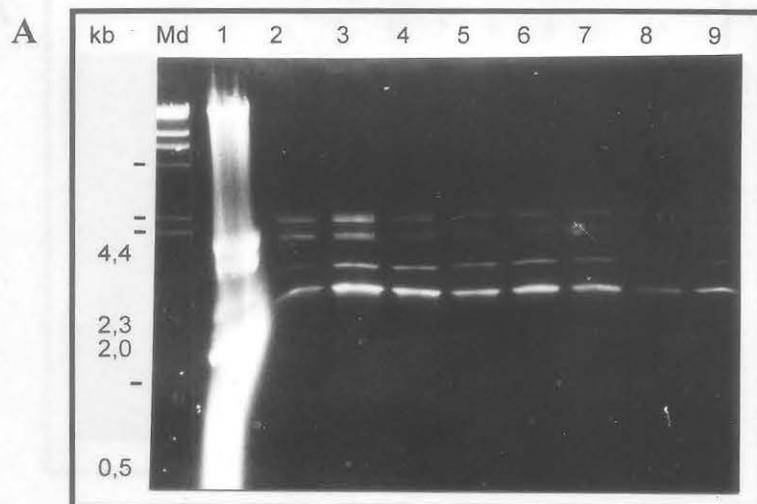


Figura 26. Ácidos nucléicos presentes em diferentes frações dos gradientes isopícnicos de CsCl, a partir das bandas coletadas de gradientes pré-formados de extratos da variante RJd.

A. Gradiente isopícnico de CsCl da banda de densidade 1,20 g/ml de gradiente pré-formado

Ácidos nucléicos totais de extrato de micélio da variante RJd (1) e de frações, em orden decrescente de densidade, de 1,35 g/ml até 1,27 g/ml (2 a 9). (Md) marcador de peso molecular DNA /*Hind*III. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb.

B. Gradiente isopícnico de CsCl da banda de densidade 1,26 g/ml de gradiente pré-formado

Ácidos nucléicos totais de extrato de micélio da variante RJd (1) e de frações, em orden decrescente de densidade, de 1,35 g/ml até 1,27 g/ml (2 a 9). (Md) marcador de peso molecular DNA /*Hind*III. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb.

Os gradientes foram fracionados em 37 alíquotas cada.

Os géis de agarose (0,8%) foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V.

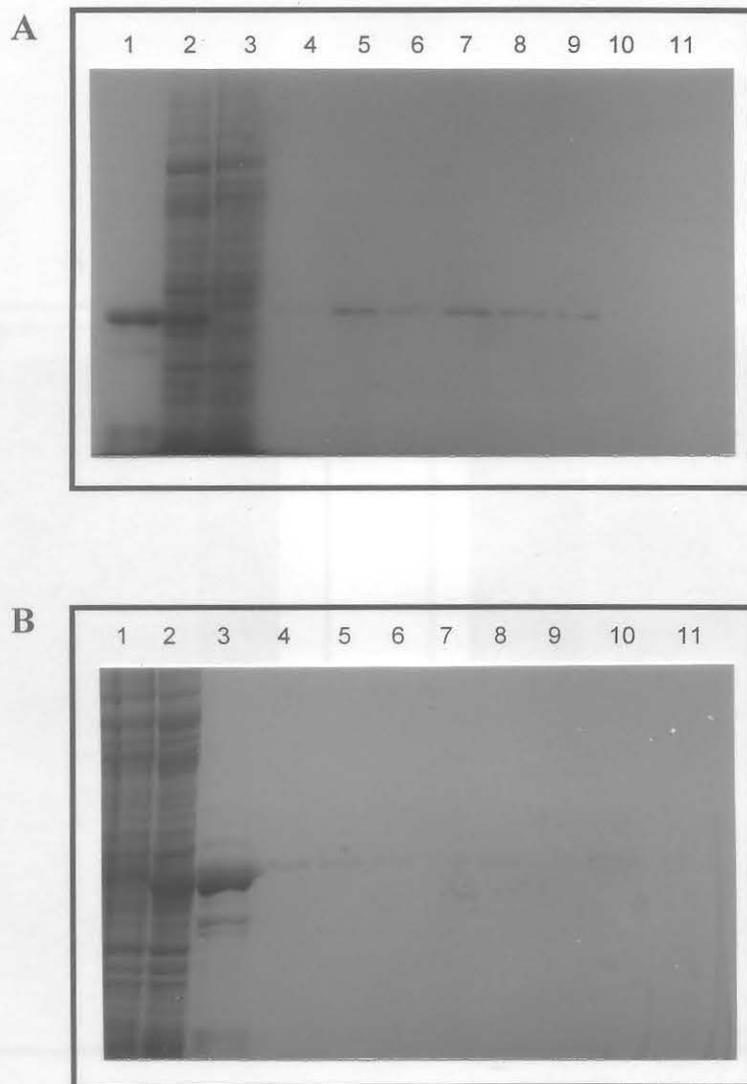


Figura 27. Proteínas presentes em diferentes frações dos gradientes isopícnicos de CsCl, a partir de bandas coletadas de gradientes pré-formados de extratos da variante RJd.

A. Gradiente isopícnico de CsCl da banda de densidade 1,20 g/ml de gradiente pré-formado.

Proteínas totais de micovírus parcialmente purificado (1), extrato de micélio da variante RJd (2), extrato de micélio da linhagem MT (controle) (3) e de frações do gradiente isopícnico, em orden decrescente de densidade: 1,35 g/ml (4); 1,34 g/ml (5); 1,33 g/ml (6); 1,32 g/ml (7); 1,31 g/ml (8); 1,30 g/ml (9); 1,29 g/ml (10) e 1,27 g/ml (11).

B. Gradiente isopícnico de CsCl da banda de densidade 1,26 g/ml de gradiente pré-formado.

Proteínas totais de extrato de micélio da linhagem MT (controle) (1), extrato de micélio da variante RJd (2), micovírus parcialmente purificado (3) e de frações do gradiente isopícnico, em orden decrescente de densidade, de 1,35 g/ml (4); 1,34 g/ml (5); 1,33 g/ml (6); 1,32 g/ml (7); 1,31 g/ml (8); 1,30 g/ml (9); 1,29 g/ml (10) e 1,27 g/ml (11).

Os gradientes foram fracionados em 37 aliquotas cada.

SDS-PAGE 10%.

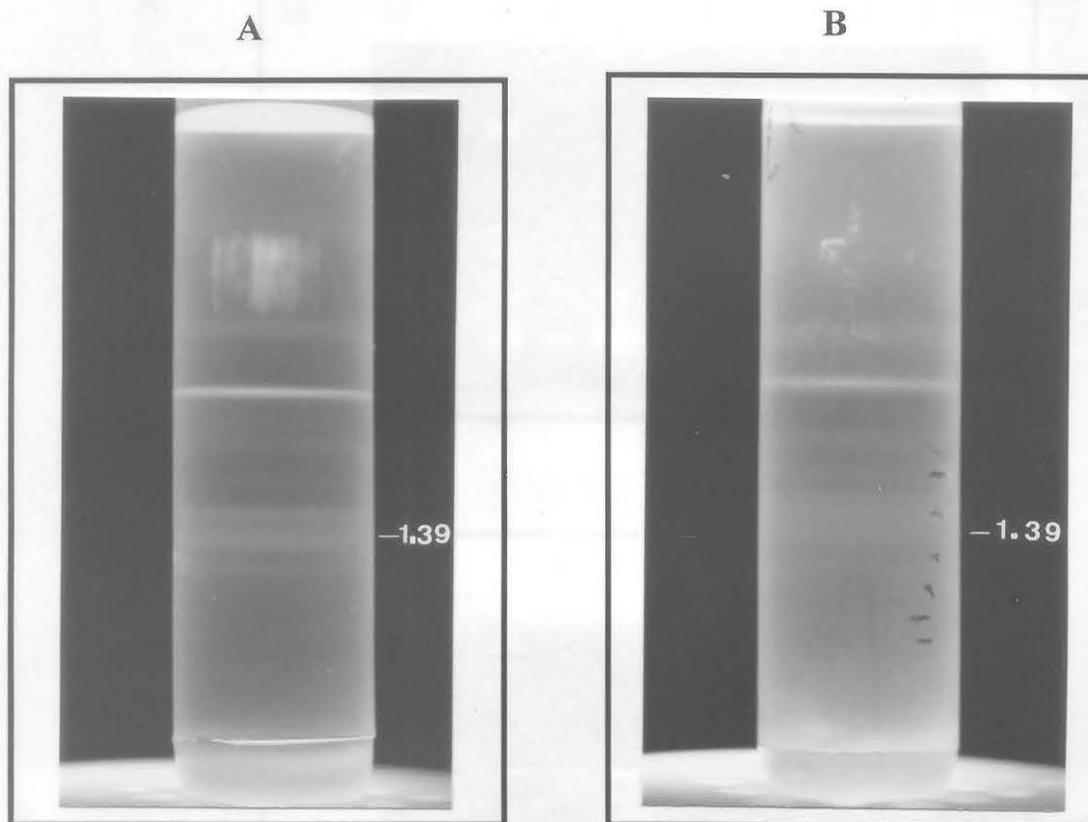


Figura 28. Gradientes isopícnicos de extratos da linhagem RJc e sua variante RJd.
 A. Gradiente isopícnico de CsCl de extrato da linhagem RJc.
 B. Gradiente isopícnico de CsCl de extrato da variante RJd

Os números representam a densidade de flotação em g/ml das bandas indicadas. Todas as etapas no processamento dos extratos das duas linhagens e os gradientes foram realizados simultaneamente.

3.5.2.2. Presença de dsRNA em preparações virais

Foram extraídos os ácidos nucleicos totais das linhagens RJd e RJc, a partir das bandas de gradientes isopícnicos de CsCl e dsRNA foi preparado. Os perfis foram comparados entre si e com os perfis obtidos de preparações de dsRNA diretamente a partir do micélio. Os componentes de dsRNA detectados após a purificação do micovírus são idênticos aos encontrados nas preparações direto do micélio (Figura 29).

3.2.3. Fracçãoção dos gradientes isopícnicos

Os gradientes foram fracionados em 39 alíquotas cada. Os géis de agarose (0,8%) foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.

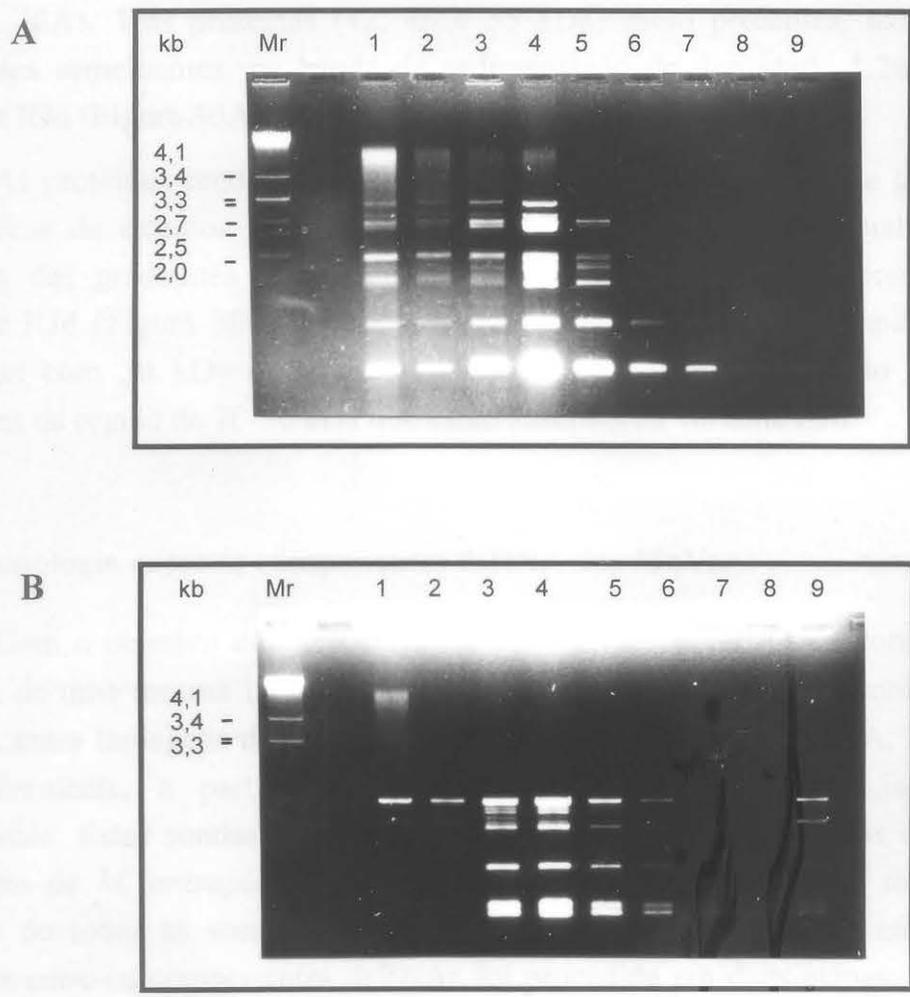


Figura 29. Ácidos nucleicos presentes em diferentes frações dos gradientes isopícnicos de CsCl de extratos da linhagem RJC e da variante RJD.

A. Gradiente de CsCl de extrato da linhagem RJC.

Ácidos nucleicos totais das frações f1 (1); f5 (2); f10 (3); f15 (4); f20 (5); f25 (6); f30 (7); f35 (8); f39 (9); em ordem decrescente de densidade. (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger*. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA do hospedeiro

B. Gradiente de CsCl de extrato da variante RJD.

Idem A.

Os gradientes foram fracionados em 39 alíquotas cada. Os géis de agarose (0,8%) foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.

3.5.2.3. Proteínas em preparações virais

Nos gradientes pré-formados de extratos da linhagem RJc se observa uma banda com densidade média de 1,26 g/ml que foi analisada por SDS-PAGE (Figura 30A). Três proteínas (42, 46 e 55 kDa) estão presentes, também em gradientes semelhantes, na banda de sedimentação de densidade 1,26 g/ml da variante RJd (Figura 30A).

As proteínas predominantes em frações coletadas ao longo de gradientes isopícnicos de extratos da linhagem RJc (Figura 30B) são essencialmente as mesmas dos gradientes pré-formados desta linhagem e aquelas presentes na variante RJd (Figura 30C). Nos gradientes da linhagem RJc não aparecem as proteínas com 30 kDa que estão presentes na variante RJd. Estão presentes proteínas na região de 70-80 kDa que estão ausentes na variante RJd.

3.6. Homologia entre os componentes dsRNA dos MaVs.

Com o objetivo de verificar a possível homologia entre os componentes dsRNA de uma mesma linhagem e as relações entre os diferentes componentes dsRNA entre linhagens diferentes, foram contruídas sondas de cDNA, marcadas radioativamente, a partir de componentes dsRNA individuais isolados e purificados. Estas sondas foram hibridizadas contra dsRNA total das diferentes linhagens de *M. anisopliae* infectadas com micovírus. A Tabela 4 mostra um resumo de todas as sondas utilizadas e os resultados obtidos. A análise das relações entre os componentes dsRNAs foi procedida em duas etapas: (i) foram determinadas as relações entre os componentes de cada MaV, que serão descritas no item 3.6.1 e (ii) foram determinadas as relações dos componentes dsRNA dos MaVs entre si, descritas no item 3.6.2.

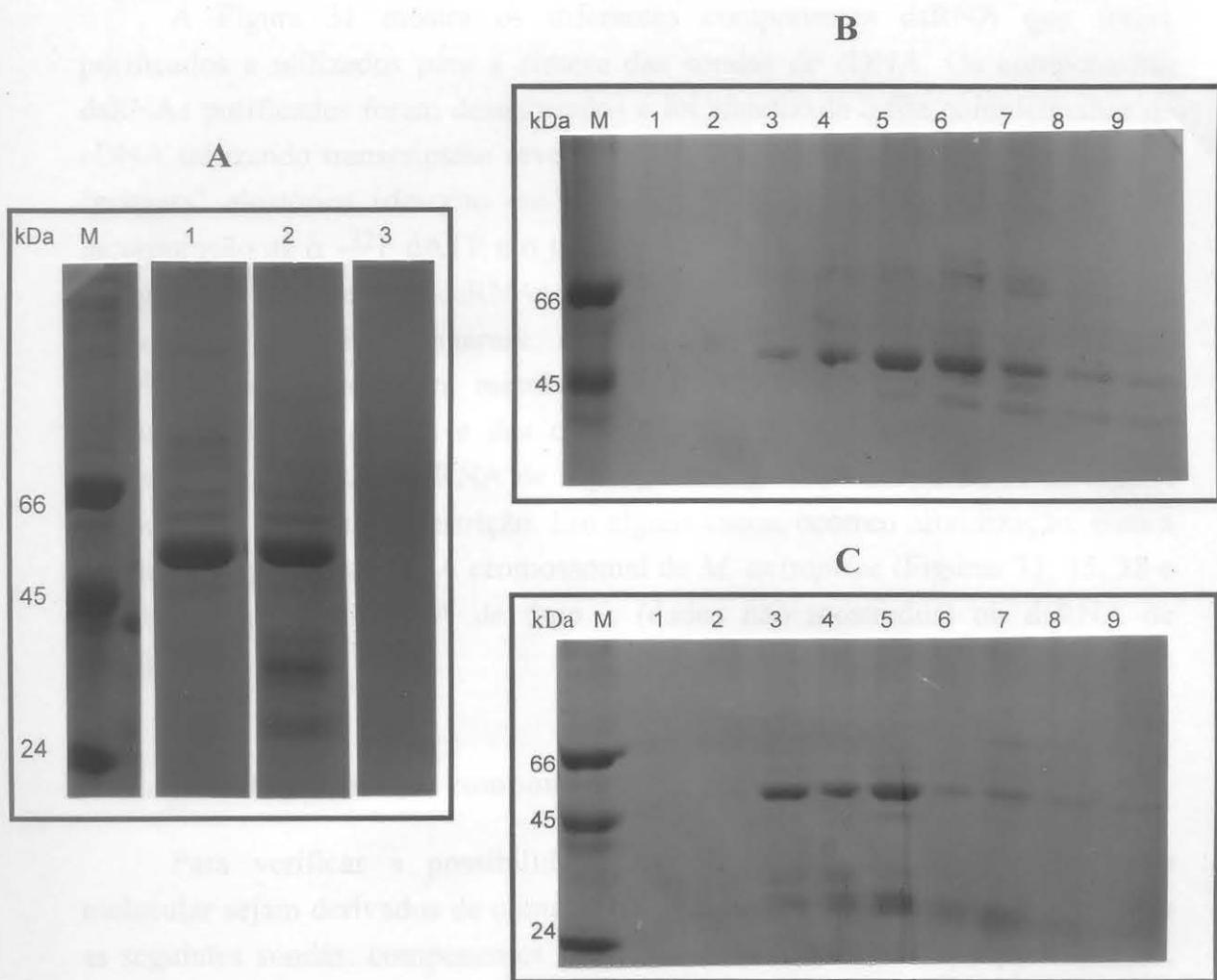


Figura 30. Proteínas das diferentes etapas de purificação do micovírus presentes na linhagem RJc e na variante RJd.

A. SDS-PAGE de proteínas de gradientes de CsCl pré-formados.

Proteínas totais da banda de densidade 1,26 g/ml da linhagem RJc (1), da banda de densidade 1,26 g/ml da variante RJd (2), e da fração de igual densidade da linhagem controle E9 (3), (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

B. SDS-PAGE de proteínas de frações de gradiente isopícnico de CsCl da linhagem RJc

Proteínas totais das frações f1 (1); f5 (2); f10 (3); f15 (4); f20 (5); f25 (6); f30 (7); f35 (8); f39 (9); em ordem decrescente de densidade de flotação. (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

C. SDS-PAGE de proteínas de frações de gradiente em equilíbrio de CsCl da variante RJd

Proteínas totais das frações f1 (1); f5 (2); f10 (3); f15 (4); f20 (5); f25 (6); f30 (7); f35 (8); f39 (9); em ordem decrescente de densidade de flotação. (M): marcador de massa molecular. Os números da esquerda representam as massas moleculares em kDa.

A Figura 31 mostra os diferentes componentes dsRNA que foram purificados e utilizados para a síntese das sondas de cDNA. Os componentes dsRNAs purificados foram desnaturados e foi sintetizada a fita complementar de cDNA utilizando transcriptase reversa, em presença de α - ^{32}P dATP, utilizando "primers" aleatórios (descrito em 2.11.4.4). A síntese de cDNA, o nível de incorporação de α - ^{32}P dATP e o tamanho médio dos cDNAs foram verificados em géis de agarose. Os dsRNAs de cada linhagem de *M. anisopliae* foram fracionados em géis de agarose, não desnaturantes, que foram tratados com NaOH e transferidos para membranas de náilon (descrito em 2.11.4.1). A especificidade das sondas e das condições de hibridização foram verificadas usando como controles dsRNA de *Aspergillus niger* (2.1.1.2) e DNA de fago λ clivado com enzimas de restrição. Em alguns casos, ocorreu hibridização, com a região de migração de DNA cromossomal de *M. anisopliae* (Figuras 33, 35, 38 e 39) mas nunca com DNA de fago λ (dados não mostrados) ou dsRNA de *A. niger*.

3.6.1. Homologia entre os componentes dsRNA de um mesmo MaV

Para verificar a possibilidade de que componentes de menor peso molecular sejam derivados de componentes maiores, completos, foram utilizadas as seguintes sondas: componentes M1, S1 e S2 de MaV-RJd, componentes L1, M1 e S2 de MaV-RJc, componentes L de MaV-M5 e de MaV-A1 (ver Tabela 4).

Em MaV-RJd o cDNA do componente M1 hibridiza com M1, M3, S1 e S2 (Figura 32). O cDNA do componente S1 hibridiza com S1 e com S2 (Figura 33) e o cDNA do componente S2 hibridiza somente com S2 (Figura 34). Em MaV-RJc o cDNA do componente L1 hibridiza com L1 e com S2 (Figura 35). O componente M1 hibridiza com M1 e S2 (Figura 36). O componente S2 hibridiza somente com S2 (Figura 37). Em MaV-M5 o componente L hibridiza somente com L (Figura 38). Em MaV-A1 o componente L hibridiza somente com L (Figura 39).

Estes resultados sugerem que, em geral, os componentes dsRNA de menor peso molecular não parecem estar relacionados com os componentes de maior peso molecular do mesmo micovírus. Entretanto, o componente S2 hibridiza com todas as sondas utilizadas.

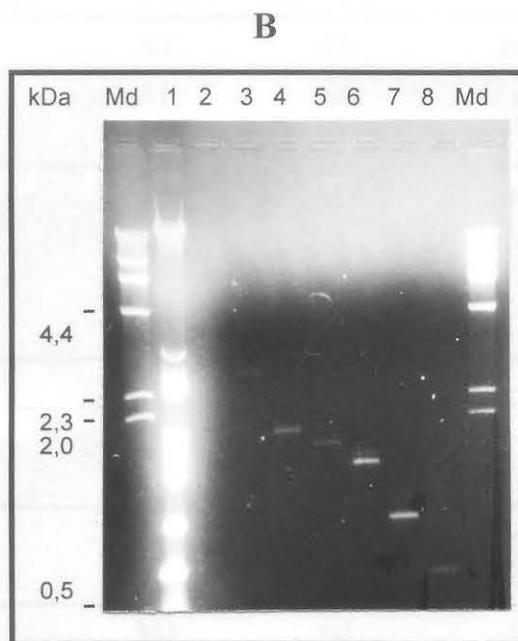
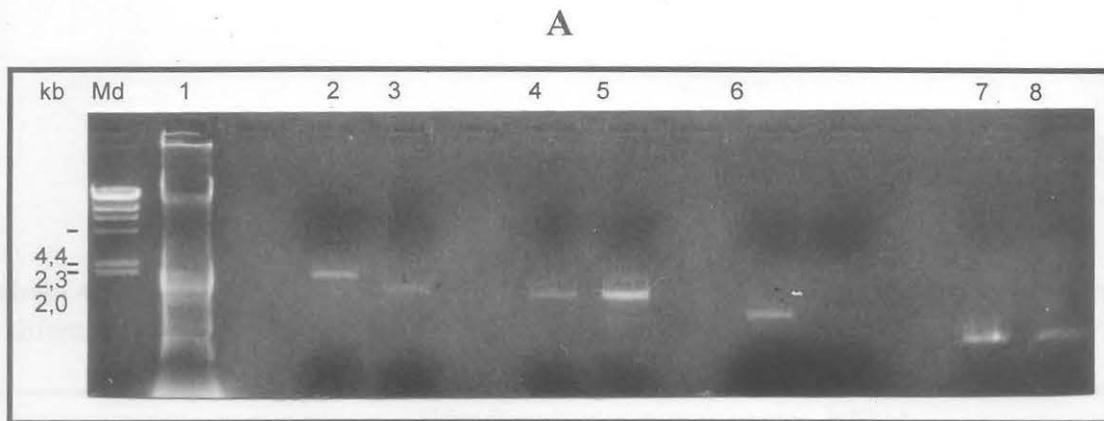


Figura 31. Componentes dsRNA purificados e utilizados para sintetizar sondas de cDNA.

A. Componentes dsRNA da variante RJd.

Ácidos nucléicos totais da variante RJd (1), componente dsRNA M1 (2), M3 (3), M4 (4 e 5), S1 (6) e S2 (7 e 8). (Md) marcador de peso molecular DNA de fago λ clivado com *Hind*III. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA do hospedeiro. O gel de agarose 0,8% foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V.

B. Componentes dsRNA da linhagem RJc.

Ácidos nucléicos totais da linhagem RJc (1), componente dsRNA L1 (2), L3 (3), M1 (4), M3 (5), M4 (6), S1 (7) e S2 (8). (Md) marcador de peso molecular DNA de fago λ clivado com *Hind*III. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA do hospedeiro. PAGE 7,5 % corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V.

Tabela 4: Resumo dos resultados de hibridização de componentes isolados dsRNA com os diferentes MaVs.

| SONDAS | Hibridização dos componentes dsRNA | | | | |
|-------------------|------------------------------------|---------|----------|--------|--------|
| | MaV-RJc | MaV-RJd | MaV-RJwt | MaV-M5 | MaV-AI |
| S2-MaV-RJd | S2 | S2 | S2 | nd | nd |
| S1-MaV-RJd | S1 | S1 | nd | - | - |
| | S2 | S2 | | | |
| M1-MaV-RJd | nd | M1 | nd | nd | nd |
| | | M3 | | | |
| | | S1 | | | |
| | | S2 | | | |
| S2-MaV-RJc | S2 | S2 | nd | - | - |
| M1-MaV-RJc | M1 | M1 | nd | - | - |
| | S2 | S2 | | | |
| L1-MaV-RJc | L1 | | nd | - | - |
| | S2 | S2 | | | |
| L-MaV-M5 | M1 | M1 | nd | L | L |
| | M3 | M3 | | | |
| | S2 | S2 | | | |
| L-MaV-AI | M1 | M1 | nd | L | L |
| | M3 | M3 | | | |
| | S2 | S2 | | | |

nd: não determinado;

-: não hibridiza

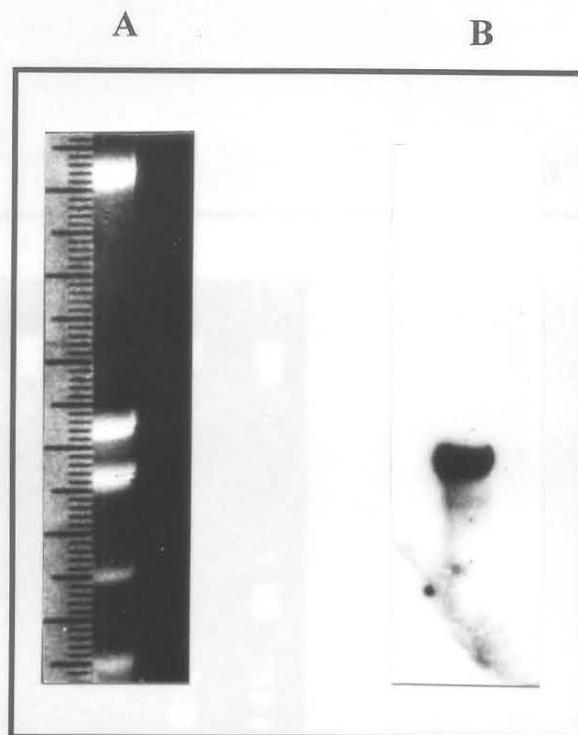


Figura 32. Hibridização de dsRNA da variante RJd, com cDNA do componente M1 homólogo.

A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio

Ácidos nucleicos totais da linhagem RJd. A banda de migração lenta corresponde ao DNA do hospedeiro.

B. Autoradiografia do gel em A.

Hibridização com o cDNA do componente M1, marcado radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

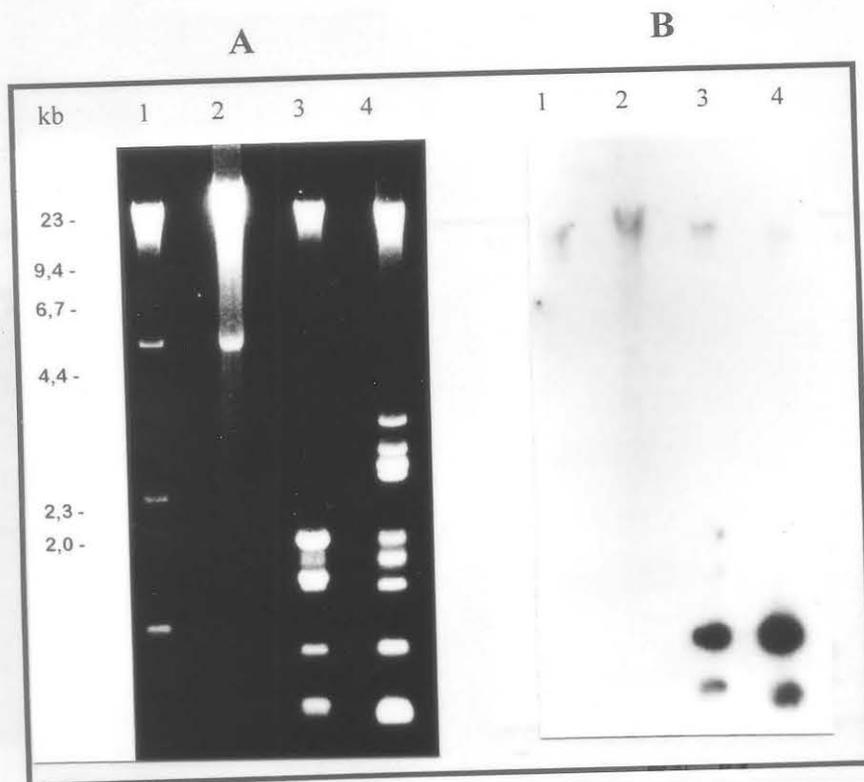


Figura 33. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente S1 da variante RJd.

A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio

Ácidos nucléicos totais das linhagens A1 (1), M5 (2), RJd (3) e RJc (4). Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb do marcador de peso molecular DNA de fago λ clivado com *Hind*III. A banda de migração lenta corresponde ao DNA do hospedeiro.

B. Autoradiografia do gel em A.

Hibridização com o cDNA do componente S1, marcado radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

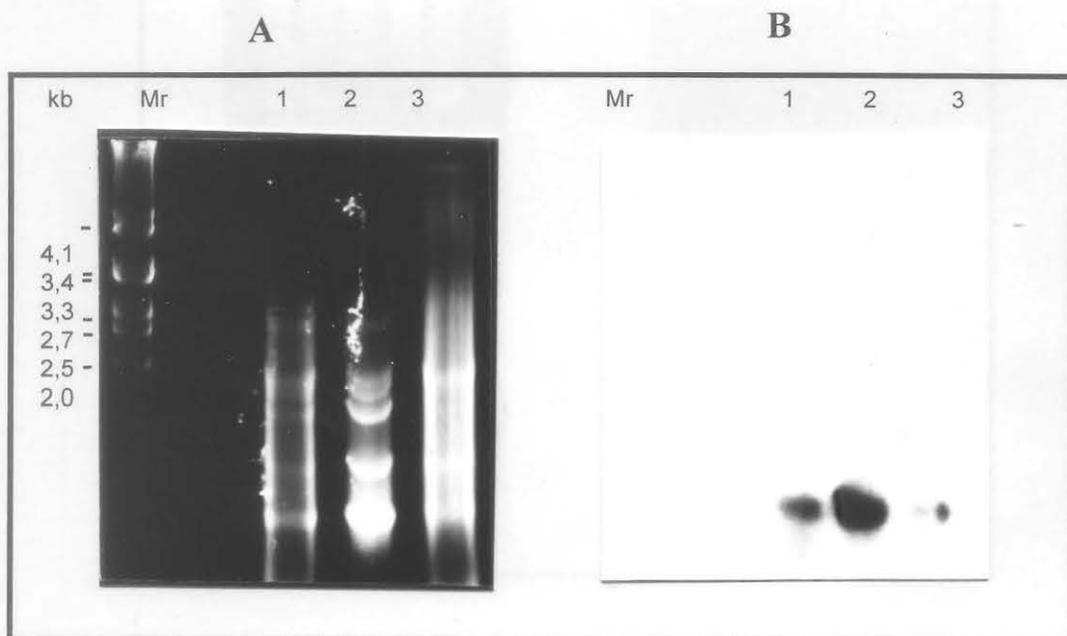


Figura 34. Hibridização de dsRNA da linhagem RJC e da variante RJD, com sondas de cDNA do componente S2 da variante RJD.

A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio

Ácidos nucleicos totais das linhagem RJC (1), RJD (2) e RJC variante (3). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* NRRL 1003. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb.

B. Autoradiografia do gel em A.

Hibridização com o cDNA do componente S2, marcado radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

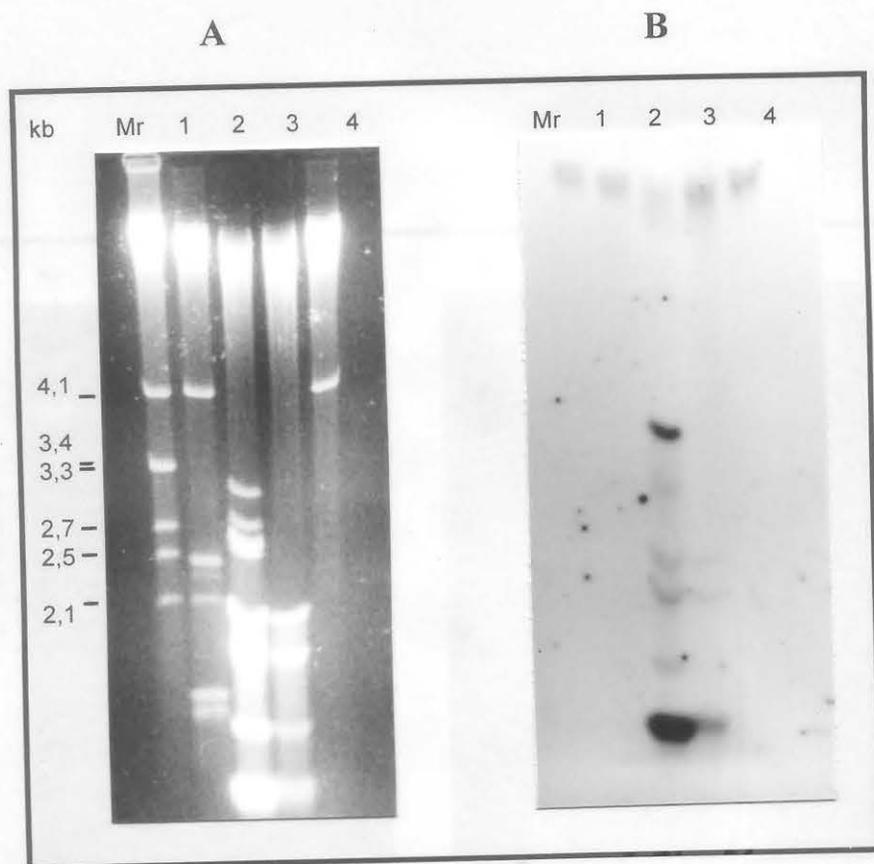


Figura 35. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente L1 da linhagem RJc.

A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio

Ácidos nucléicos totais das linhagens AI (1), RJc (2), RJd (3) e M5 (4). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* NRRL 1003. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA dos hospedeiros.

B. Autoradiografia do gel em A.

Hibridização com o cDNA do componente L1, marcado radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

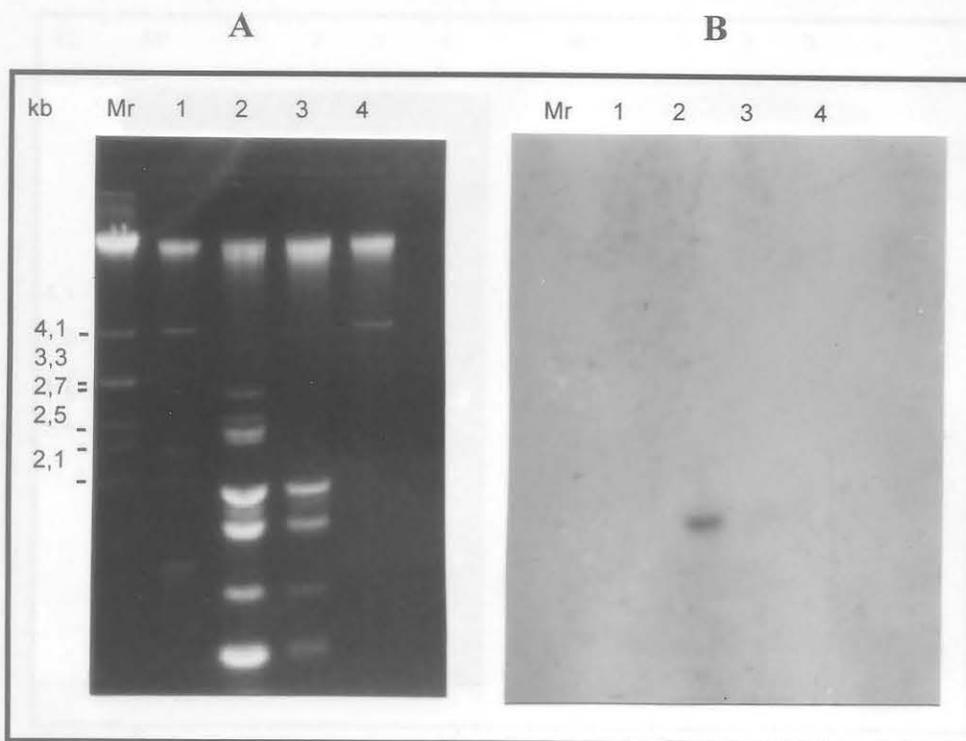


Figura 36. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente M1 da linhagem RJc.

A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio

Ácidos nucleicos totais das linhagens Al (1), RJc (2), RJd (3) e M5 (4). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* NRRL 1003. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA dos hospedeiros.

B. Autoradiografia do gel em A.

Hibridização com o cDNA do componente M1, marcado radioativamente com [α - 32 P]dATP.

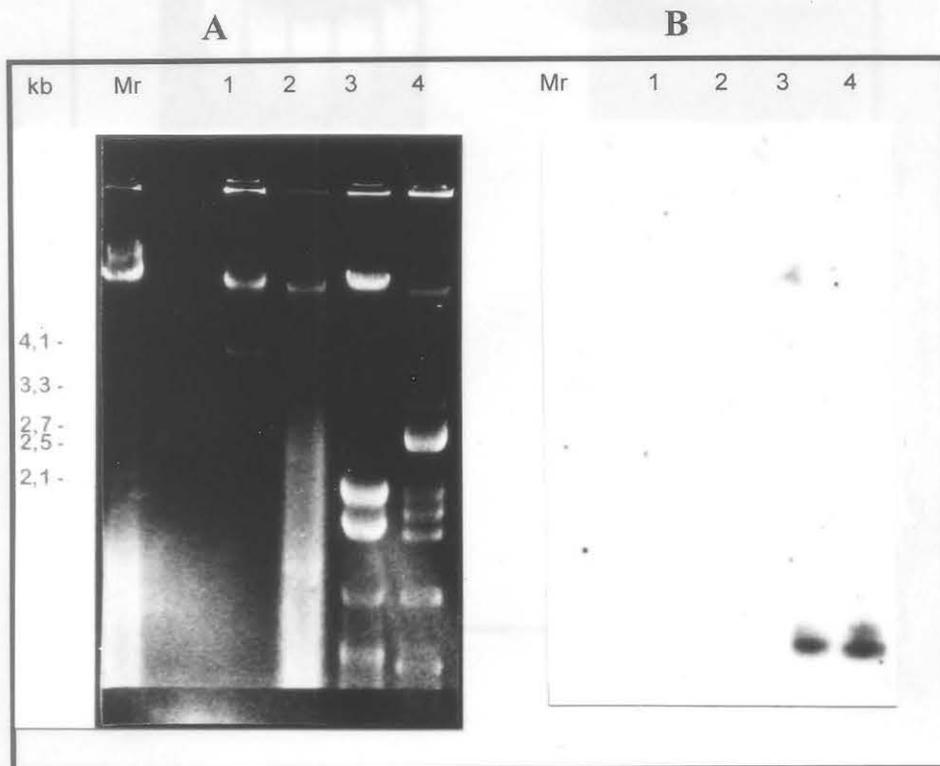


Figura 37. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente S2 da linhagem RJc.

A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio

Ácidos nucleicos totais das linhagens A1 (1), M5 (2), RJd (3) e RJc (4). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* NRRL 1003. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA dos hospedeiros.

B. Autoradiografia do gel em A.

Hibridização com o cDNA do componente S2, marcado radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

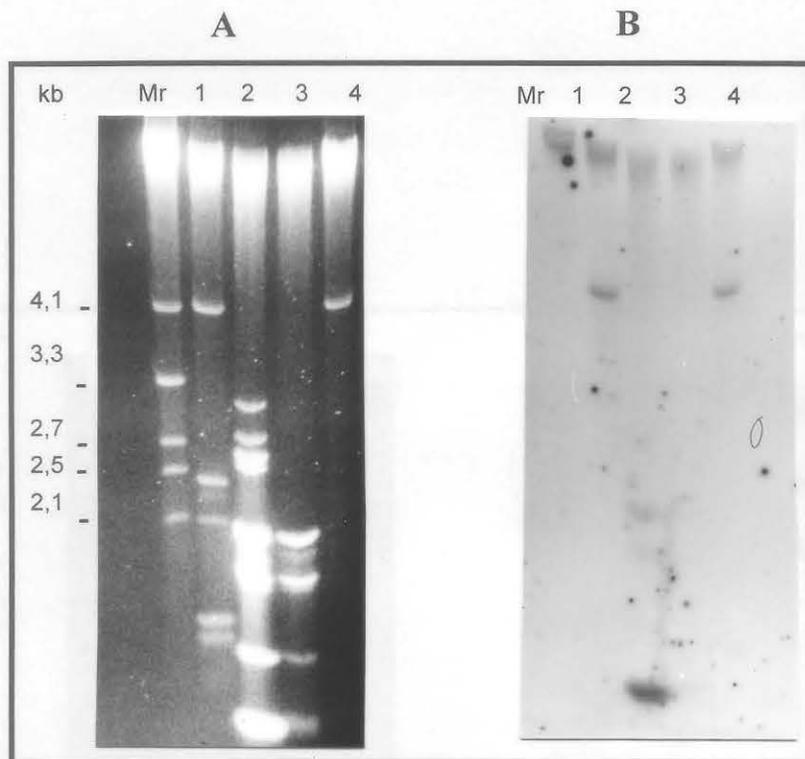


Figura 38. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente L1 da linhagem M5.

A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio

Ácidos nucléicos totais das linhagens Al (1), RJc (2), RJd (3) e M5 (4). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* NRRL 1003. Os números da esquerda representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA dos hospedeiros.

B. Autoradiografia do gel em A.

Hibridização com o cDNA do componente L1, marcado radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

3.5.2. Homologia entre os componentes dsRNA dos diferentes MaVs

A sonda sintetizada a partir do componente S2 purificado de MaV-RJd hibridiza com o componente S7 (0,5 kb) de MaV-RJc (Figura 34). Como controle foi usado uma linhagem RJc1 que é rotineiramente inoculada e mantida de forma (V.L. de Azevedo, comunicação pessoal, 2011). Os dsRNAs usados no gel foram extraídos de esporos das linhagens RJc, RJd e RJw. A intensidade de hibridização foi relativa a quantidade de dsRNA extraído de cada linhagem antes da transforção.

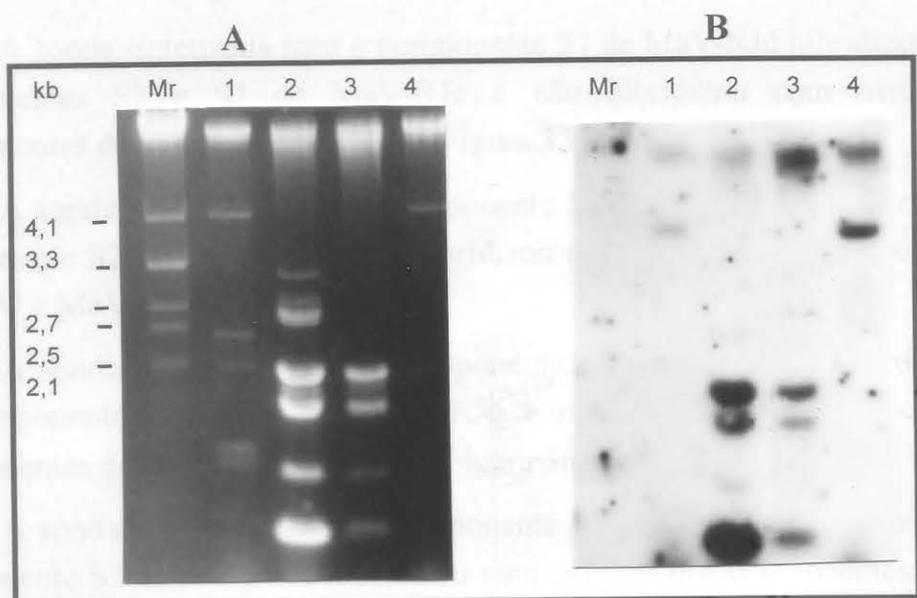


Figura 39. Hibridização de dsRNA dos diferentes MaVs, com sondas de cDNA do componente L1 da linhagem A1.

- A. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio
 - Ácidos nucleicos totais das linhagens A1 (1), RJc (2), RJd (3) e M5 (4). (Mr) marcador de peso molecular dsRNA de *A. niger* NRRL 1003. Os números da direita representam os pesos moleculares em kb. A banda de migração lenta corresponde ao DNA dos hospedeiros.
- B. Autoradiografia do gel em A.
 - Hibridização com o cDNA do componente L1, marcado radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

3.6.2. Homologia entre os componentes dsRNA dos diferentes MaVs

A sonda sintetizada a partir do componente S2 purificado de MaV-RJd hibridiza com componente S2 (0,5 kb) de MaV-RJc (Figura 34). Como controle foi usada uma linhagem RJwt que é rotineiramente inoculada e reisolada de insetos (J.L.de Azevedo, comunicação pessoal, 2.1.1.). Os dsRNAs usados no gel foram extraídos de esporos das linhagens RJc, RJd e RJwt. A intensidade da hibridização foi relativa a intensidade da fluorescência dos componentes dsRNA corados com EtBr no gel, antes da transferência.

A sonda sintetizada para o componente S1 de MaV-RJd hibridizou com os componentes S2 e S1 de MaV-RJc e não hibridizou com nenhum dos componentes de MaV-A1 e MaV-M5 (Figura 33).

A sonda sintetizada para o componente S2 de MaV-RJc hibridizou com o componente S2 de MaV-RJd e não hibridizou com nenhum dos componentes de MaV-A1 e MaV-M5 (Figura 37).

A sonda sintetizada para o componente M1 de MaV-RJc hibridizou com os componentes S2 e M1 de MaV-RJd e não hibridizou com nenhum dos componentes de MaV-A1 e MaV-M5 (Figura 36).

A sonda sintetizada para o componente L1 de MaV-RJc hibridizou com o componente S2 de RJd e não hibridizou com nenhum dos componentes de MaV-A1 e MaV-M5 (Figura 35).

A sonda sintetizada para o componente L de MaV-M5 hibridizou com o componente L de MaV-A1 e com o componente S2 de MaV-RJc e MaV-RJd (Figura 38).

A sonda sintetizada para o componente L de MaV-A1 hibridizou com o componente L de MaV-M5 e com os componentes S2, M3 e M1 de MaV-RJc e MaV-RJd (Figura 39).

Como esperado MaV-RJc e a variante MaV-RJd compartilham vários componentes dsRNA. Os dsRNAs da região L estão ausentes em MaV-RJd. Embora os componentes S2, aparentemente, sejam os mesmos em géis de agarose, em géis de poliacrilamida eles se diferenciam (Figura 3A). Nos experimentos de hibridização não foi possível determinar se algum dos componentes S2 de MaV-RJd são derivados de L1. Da mesma forma, aparentemente os componentes L de MaV-A1 e MaV-M5 são os mesmos, pois hibridizam cruzado, o que sugere que esses micovírus são muito relacionados.

Entre os MaV-RJs e MaV-AI e MaV-M5 existe homologia do componente S2 de MaV-RJs com os componentes L de MaV-RJc, MaV-AI e MaV-M5, e o componente L de MaV-AI hibridiza com os componentes M3 e M1 de MaV-RJs.

Deste modo, embora as relações de homologia, a nível de dsRNA, entre os MaVs analisados seja complexa, é possível generalizar que MaV-AI está relacionado com MaV-M5 e que estes são relacionados com alguns componentes de dsRNA dos MaV-RJs. A análise é dificultada pois o componente M1 de MaV-RJc não hibridiza com os componentes L de MaV-AI e MaV-M5 enquanto o oposto ocorre. O mesmo acontece entre os componentes S2 de MaV-RJd e MaV-RJc com os componentes L de MaV-AI e MaV-M5.

3.7. Caracterização sorológica dos micovírus

Com o objetivo de caracterizar sorologicamente os quatro MaVs foram produzidos antisoros, a partir de preparações parcialmente purificadas de micovírus, que foram utilizados para testes de difusão radial (DD) e Western.

3.7.1. Imunizações

Foram utilizadas, na primeira imunização de coelhos, preparações parcialmente purificadas de MaV-RJd, MaV-AI e MaV-M5. As imunizações posteriores foram realizadas utilizando preparações de micovírus purificadas em gradientes pré-formados de CsCl. Estas preparações foram diluídas em tampão fosfato (2.10.1.2) e suas características espectrofotométricas estão apresentadas na Tabela 5. No cálculo da concentração viral, o coeficiente de extinção molar a 260 nm foi considerado como 5 por analogia com outros vírus isométricos com dsRNA (NATSUAKI *et al.*, 1986; LUISONI *et al.*, 1987)

Desde a primeira sangria de prova, os testes sorológicos de precipitação em campo escuro e de DD evidenciaram a presença de anticorpos para MaV-RJd. Durante a imunização com MaV-AI e MaV-M5 não foram detectados anticorpos com estas duas técnicas.

Tabela 5: Características espectrofotométricas e concentração de micovírus utilizados como imunógenos

| Micovírus | Imunização | Diluição | Densidade g/ml | A260 | A260/280 | A260/240 | mg/ml inoculados |
|-----------|------------|----------|----------------|------|----------|----------|------------------|
| MaV-RJd | 1° | 1/10 | ND | 0,48 | 1,35 | 1,14 | 0,96 |
| | 2° | 1/1 | 1,10 | 2,25 | 1,37 | 1,15 | 0,45 |
| | 3° | 1/1 | 1,26 | 0,52 | 1,53 | 1,23 | 0,54 |
| | 4° | 1/1 | 1,22 | 0,29 | 1,63 | 1,37 | 0,06 |
| MaV-A1 | 1° | 1/10 | ND | 0,46 | 1,9 | 1,53 | 0,92 |
| | 2° | 1/1 | 1,10 | 0,58 | 1,5 | 1,26 | 0,12 |
| | 3° | 1/1 | 1,30 | 0,55 | 1,61 | 1,25 | 0,11 |
| | 4° | 1/1 | 1,25 | 0,58 | 1,92 | 1,53 | 0,12 |
| | reforço | 1/1 | 1,10 | 0,81 | 1,88 | 1,47 | 0,08 |
| MaV-M5 | 1° | 1/10 | ND | 1,30 | 1,80 | 1,46 | 2,60 |
| | 2° | 1/1 | 1,1 | 0,85 | 1,56 | 1,21 | 0,17 |
| | 3° | 1/1 | 1,18 | 0,33 | 1,41 | 1,15 | 0,07 |
| | 4° | 1/1 | 1,27 | 0,96 | 1,18 | 1,74 | 0,19 |
| | reforço | 1/1 | 1,05 | 1,73 | 1,04 | 1,61 | 0,16 |

ND: não determinado;

a: leitura de absorbância medida a 260 nm

O volume inoculado foi sempre 1 ml. As imunizações de reforço foram administradas em duas doses de 0,5 ml cada.

3.7.2. Titulação dos antisoros

Os soros obtidos anti MaV-RJd, MaV-A1 e MaV-M5 foram titulados por DD e microprecipitação (Tabela 6). O título do antisoro para MaV-RJd por DD, após 24 hs, foi de 1/32 contra micovírus parcialmente purificado (Figura 40A) e de 1/16 contra homogenato de micélio, sendo a imunoprecipitação mais difusa neste caso (Figura 40B). O título por microprecipitação após 2 h foi de 1/64 com micovírus parcialmente purificado (Figura 10C).

Tabela 6: Titulação dos soros obtidos nas imunizações com micovírus parcialmente purificado de cada MaVs ou extrato total de micélio de cada linhagem.

| Técnica | Antisoro | Antígeno | Título 2-4 hs | Título 24 hs |
|-------------------|----------|-------------|---------------|--------------|
| DD | RJd | RJd-VPP | nd | 1/32 |
| | | RJd-Extrato | nd | 1/16 |
| | Al | Al-VPP | nd | - |
| | M5 | M5-VPP | nd | - |
| Microprecipitação | RJd | RJd-VPP | 1/64 | 1/2024 |
| | | E6-PP | - | 1/4 |
| | Al | Al-VPP | 1/4 | inesp. |
| | M5 | M5-VPP | - | inesp. |

Como controle foram utilizadas preparações da linhagem E6 tratadas de igual forma às purificações virais (PP); DD: dupla difusão; VPP: vírus parcialmente purificado; nd: não determinado; -: sem reação; inesp.: reações não específicas.

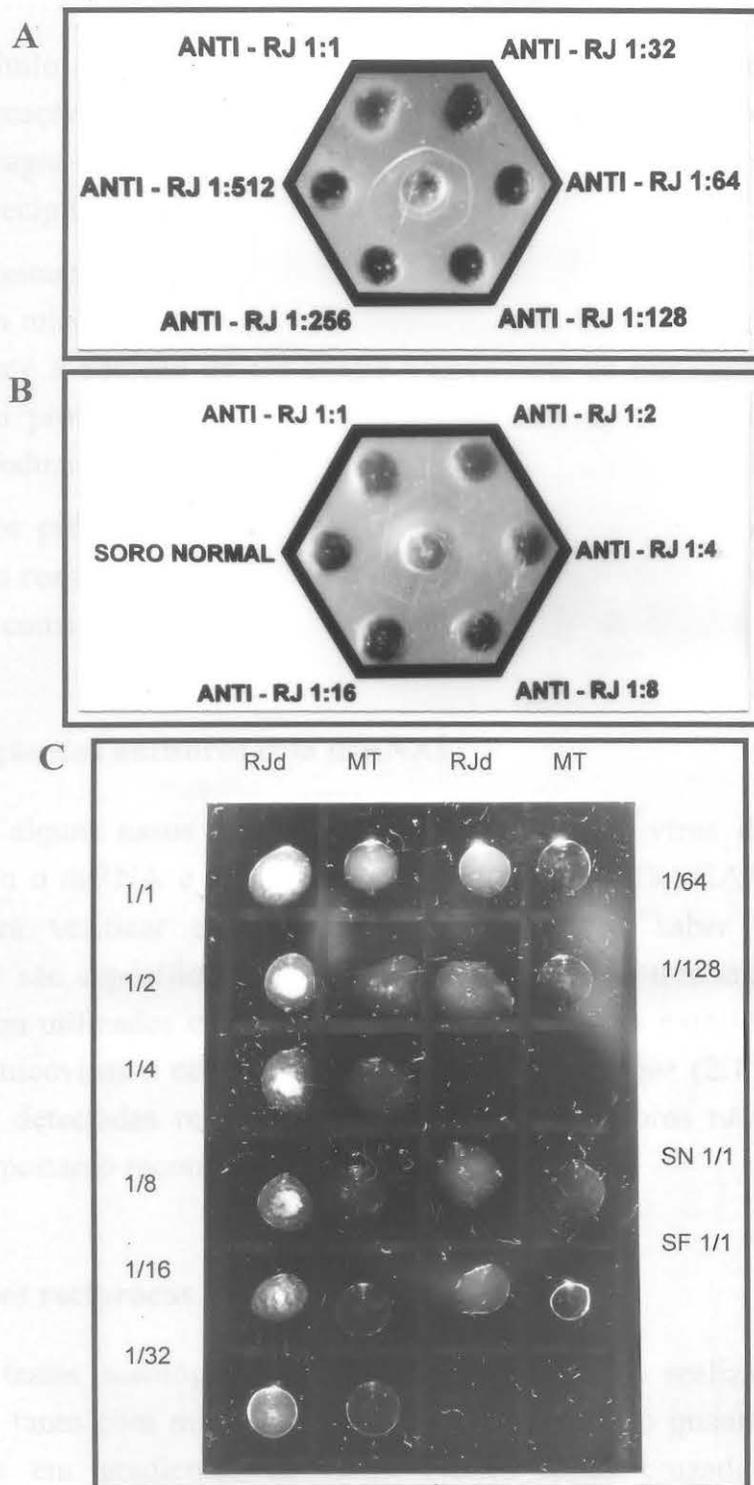


Figura 40. Determinação do título do soro anti MaV-RJd.

A. Teste de dupla difusão, com MaV-RJd parcialmente purificado (orifício central), e diluições do antisoro (orifícios externos).

B. Teste de dupla difusão, com homogenato da variante RJd (orifício interno), e diluições do antisoro e soro normal (pré-imune)(orifícios externos).

C. Teste de microprecipitação (2 h), nas diluições do antisoro indicadas na figura.

Vírus parcialmente purificado (RJd) e homogenato da linhagem MT com o mesmo tratamento (MT) (controle). Outros controles foram soro normal sem diluição (SN 1/1) e NaCl 0,85% (SF).

O título do soro anti MaV-A1, por microprecipitação, foi de 1/4 e não produziu reação visível com seu homólogo por DD. O soro anti MaV-M5 somente reagiu com seu homólogo em Western (3.7.5) e não reagiu nas reações de microprecipitação e DD.

As leituras do teste de microprecipitação realizadas após 24 hs mostraram reação com micovírus parcialmente purificado da linhagem RJd até a diluição de 1/2.048 e até a diluição de 1/4 contra homogenato da linhagem E6, processado seguindo o protocolo da purificação parcial. Estes resultados indicam que o antisoro produzido é específico para MaV-RJd e está em alto título.

Soros préimunes e soro anti MRDV (controle de "Maize Rough Dwarf Virus") não reagiram com os MaVs nem contra homogenatos de linhagens de *M. anisopliae* consideradas "livres de micovírus".

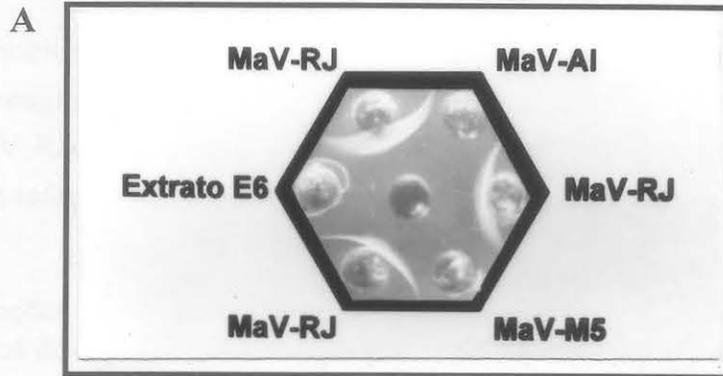
3.7.3. Reação dos antisoros com dsRNAs

Em alguns casos anticorpos produzidos contra vírus dsRNA em geral reconhecem o dsRNA e portanto não são específicos (IKEGAMI e FRANCKI, 1977). Para verificar esta possibilidade e portanto saber se os antisoros produzidos são específicos para as proteínas virais, os três antisoros contra os MaVs foram utilizados em testes de DD contra dsRNAs extraídos das linhagens contendo micovírus e contra dsRNA de *Aspergillus niger* (2.1.1). Nestes testes não foram detectadas reações, indicando que os antisoros não reconhecem os dsRNAs e portanto reconhecem proteínas dos MaVs.

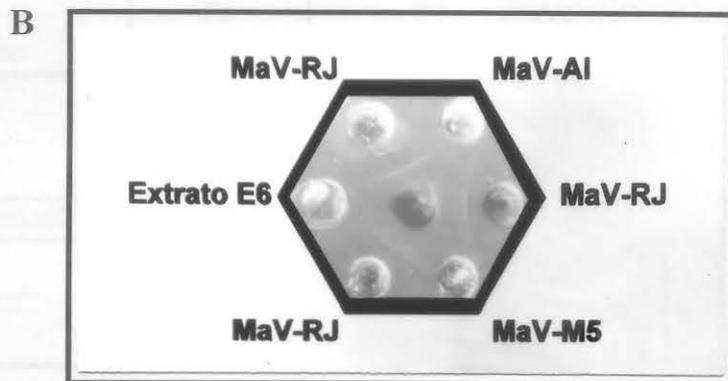
3.7.4. Testes recíprocos em dupla difusão

Os testes sorológicos cruzados por DD foram realizados com várias repetições, tanto com micovírus parcialmente purificado quanto com micovírus purificados em gradientes de CsCl. Nestes testes cruzados cada antisoro produzido foi reagido contra cada um dos MaVs. A Tabela 7 mostra estes resultados, onde o soro anti MaV-RJd reage somente contra seu homólogo e contra MaV-RJc (Figura 41A). Os soros anti MaV-A1 e anti MaV-M5 reagem contra MaV-RJd (Figura 41B e C). O antígeno MaV-RJc não foi testado contra estes dois últimos soros.

RJd



AI



M5

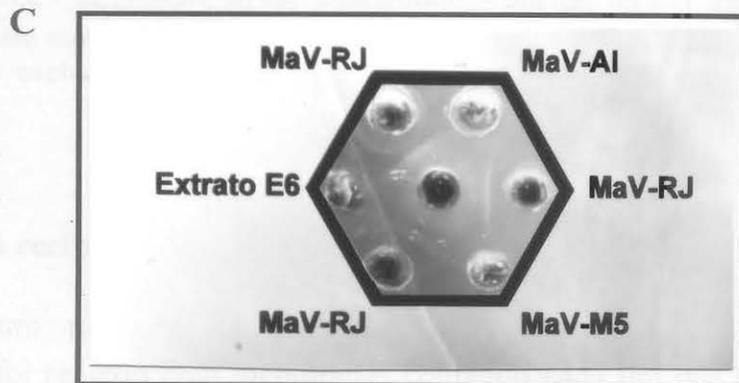


Figura 41. Relações sorológicas dos MaVs, por teste de dupla difusão em gel de ágar.

A. Soro anti MaV-RJd.

B. Soro anti MaV-AI.

C. Soro anti MaV-M5.

Os antisoros foram aplicados nos orifícios internos. Os antígenos (orifícios externos), foram preparações parcialmente purificadas de MaV-RJd, MaV-AI e MaV-M5.

Além do teste de DD o soro anti MaV-RJd reconheceu, em microprecipitação, preparações de de MaV-RJc parcialmente purificado, reagindo até as mesmas diluições em que reage com seu homólogo.

Em conclusão, os soros anti MaV-A1 e MaV-M5, embora com baixa intensidade, reagiram contra MaV-RJd. Apesar de não ter ocorrido reação entre soro anti MaV-RJd contra MaV-A1 e MaV-M5, o primeiro resultado indica que existe alguma relação sorológica entre os três micovírus.

Tabela 7: Relações sorológicas dos MaVs das linhagens A1, M5, RJc e RJd, obtidas em testes recíprocos de dupla difusão em ágar (DD), microprecipitação e Western.

| Método | As | Ag | | | |
|--------------------------------|-----|------|------|----|----|
| | | RJd | RJc | A1 | M5 |
| DD | RJd | +++ | +++ | - | - |
| | A1 | + | nd | - | - |
| | M5 | + | nd | - | - |
| Microprecipitação ^a | RJd | 1/64 | 1/64 | nd | nd |
| Western ^b | RJd | 46 | 46 | * | * |
| | A1 | 46 | 46 | 80 | 80 |
| | M5 | 46 | 46 | 80 | 80 |

+ reação positiva, - sem reação, nd não determinado; ^a diluição do soro até onde a reação foi positiva; ^b massa molecular (em kDa) das principais bandas de proteínas reveladas, * muitas bandas difusas reveladas; As antisoro; Ag antígeno.

3.7.5. Testes recíprocos em Western

Em um primeiro grupo de experimentos, cada um dos antisoros produzidos foi reagido com membranas contendo cada um dos antígenos MaV-RJd, MaV-RJc, MaV-A1 e MaV-M5 (2.10.2.2). Foram utilizados controles com extratos da linhagem E6, "livre de micovírus" (Figura 42). Em um segundo grupo de experimentos, cada membrana contendo só um antígeno foi dividida e exposta a cada um dos antisoros, sendo usado como controle um soro pré-imune (Figura 43). Os resultados destes dois experimentos foram coincidentes e serão descritos a seguir.

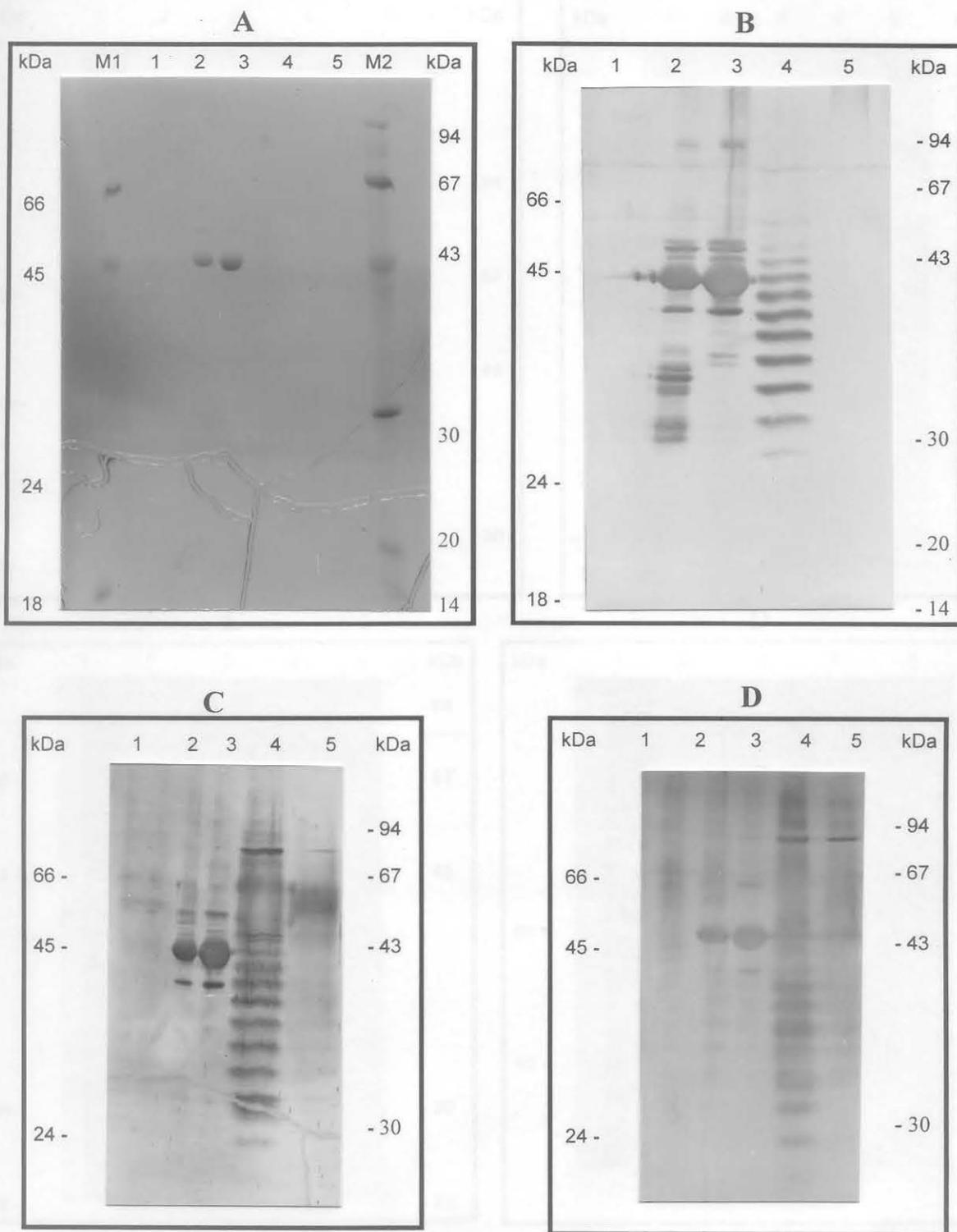


Figura 42. Relações sorológicas dos MaVs, por Western blot, onde diferentes antígenos foram revelados com um antisoro.

A. SDS-PAGE de proteínas.

B. Proteínas transferidas a membrana, reveladas com soro anti MaV-RJd.

C. Proteínas transferidas a membrana, reveladas com soro anti MaV-AI.

D. Proteínas transferidas a membrana, reveladas com soro anti MaV-M5.

Banda de gradiente pré-formado da linhagem E9 (1,26 g/ml)(controle) (1), RJd (1,25 g/ml) (2), RJc (1,26 g/ml) (3), AI (1,18 g/ml) (4) e M5 (1,26 g/ml) (5). M): marcador de massa molecular. Os números representam as massas moleculares em kDa.

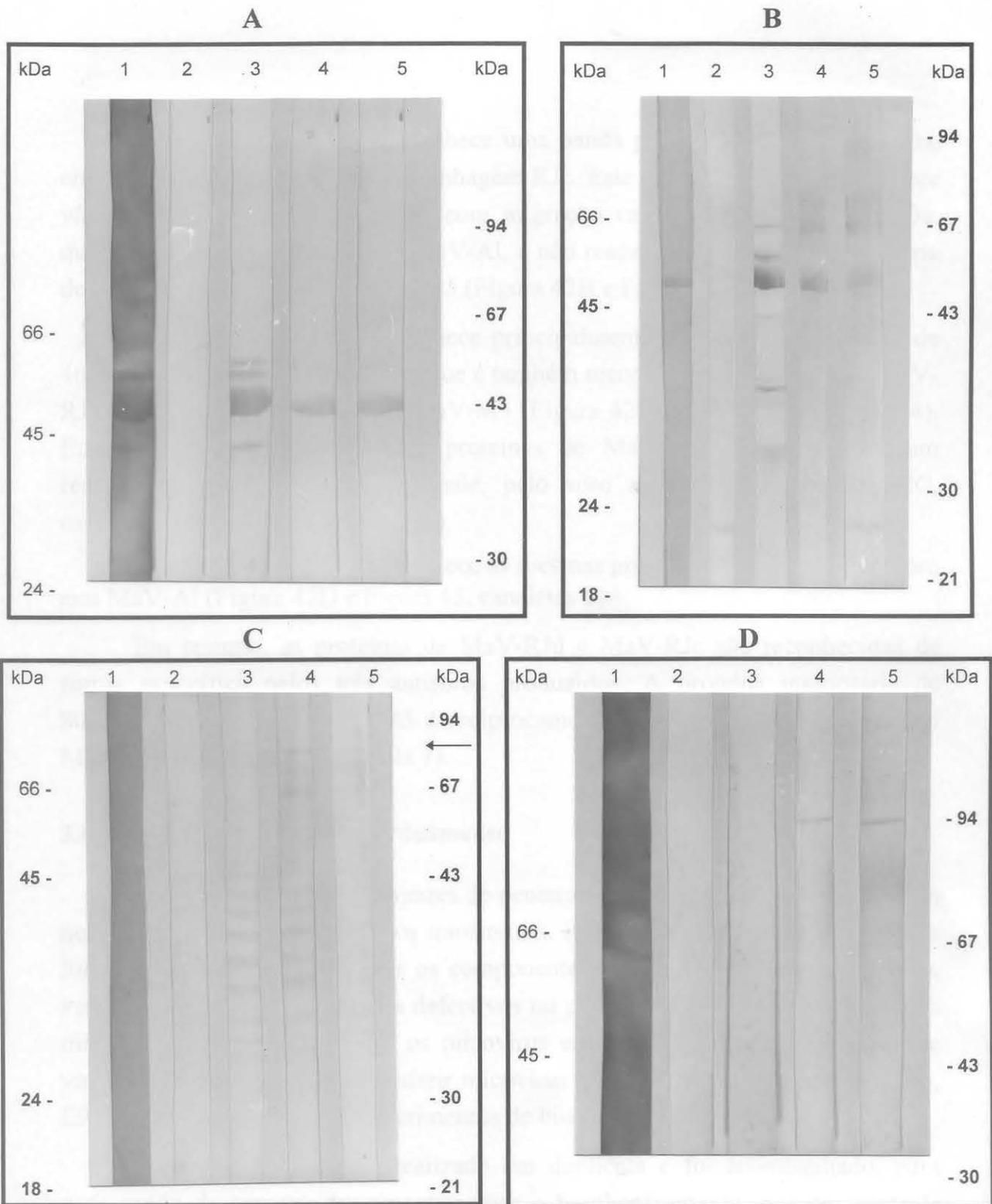


Figura 43. Relações sorológicas dos MaVs, por Western blot, onde diferentes antisoros reagiram com um antígeno.

A. MaV-RJc.

Proteínas detectadas na banda de 1,26 g/ml de gradiente pré-formado, reveladas com "amido black" 0,1% (1); com soro normal 1/10 (2); com soro anti MaV-RJd 1/100 (3); com soro anti MaV-Al 1/10 (4); e com soro anti MaV-M5 1/10 (5).

B. MaV-RJd.

Proteínas detectadas na banda de 1,25 g/ml de gradiente pré-formado, reveladas idem A.

C. MaV-Al.

Proteínas detectadas na banda de 1,18 g/ml de gradiente pré-formado, reveladas idem A.

D. MaV-M5.

Proteínas detectadas na banda de 1,26 g/ml de gradiente pré-formado, reveladas idem A.

O soro anti MaV-RJd reconhece uma banda principal na região 46 kDa, em extratos da variante RJd e da linhagem RJc. Este antisoro também reconhece várias outras bandas de proteína, com migração variando entre 60 e 24 kDa, quando reagido contra antígeno MaV-AI, e não reage com a proteína majoritária de 80 kDa de MaV-AI e de MaV-M5 (Figura 42B e Figura 43, canaletas 3).

O soro anti MaV-AI reconhece principalmente a proteína majoritária de 46 kDa de MaV-RJd e MaV-RJc, que é também reconhecida pelo soro anti MaV-RJd, e a proteína de 80 kDa de MaV-M5 (Figura 42C e Figura 43, canaletas 4). Em alguns experimentos outras proteínas de MaV-RJd e MaV-RJc foram reconhecidas, em menor intensidade, pelo soro anti MaV-AI (Figura 42C, canaleta 3 e Figura 43B, canaleta 4).

O soro anti MaV-M5 reconhece as mesmas proteínas descritas para o soro anti MaV-AI (Figura 42D e Figura 43, canaletas 5).

Em resumo, as proteínas de MaV-RJd e MaV-RJc são reconhecidas de forma específica pelos três antisoros produzidos. A proteína majoritária de 80 kDa de MaV-AI e MaV-M5 é reciprocamente reconhecida pelos soros anti MaV-AI e anti MaV-M5 (Tabela 7).

3.8. Experimentos de bombardeamento

Os micovírus não são capazes de penetrar ativamente em seus hospedeiros nem se conhecem vetores que os transmitam. Para estudar suas relações com os fungos hospedeiros, determinar os componentes necessários para sua replicação, verificar a presença de dsRNAs defectivos ou partículas interferentes e infecções mixtas, é necessário introduzir os micovírus em fungos "sadios" ou "livres de vírus". Com o objetivo de transferir micovírus purificados para as linhagens E6, E9 e MT, foram realizados experimentos de biobalística.

Cada experimento foi realizado em duplicata e foi acompanhado, para cada modo de preparo das amostras para o bombardeamento, por um controle sem bombardear e por um controle bombardeado com uma preparação obtida a partir da linhagem E6 "livre de vírus" com o mesmo tratamento que o realizado para a purificação de micovírus ou dsRNA. Nos experimentos de cotransformação, foram agregados outros dois controles, o bombardeamento somente com DNA do plasmídeo, e o bombardeamento dos esporos da linhagem receptora com DNA de outro plasmídeo sem marca de seleção (pUC 18).

Foram realizados oito experimentos em diferentes condições:

(1) Esporos das linhagens hospedeiras E6, E9, MT e M5 foram bombardeados com preparações de MaV-RJd, MaV-AI e MaV-M5 purificadas ou parcialmente purificadas.

(2) Esporos das linhagem E6 foram bombardeados com preparações de dsRNA de MAV-RJd.

(3) As colônias bombardeadas foram diretamente analisadas para a presença de dsRNA, ou foram inicialmente selecionadas para a resistência a benomil, em experimentos de cotransformação com o vetor pBT6.

(4) O bombardeamento foi efetuado diretamente sobre esporos espalhados em meio de cultura sólido ou em suspensões aquosas, e depois transferidos para os meios de cultivo.

Em nenhum dos experimentos foi evidenciada a presença de dsRNA transferido.

3.8.1. Sobrevivência de *M. anisopliae* a benomil

No primeiro experimento de cotransformação do fungo com micovírus e plasmídeo pBT6 foi observado o crescimento de muitas colônias em meio contendo 5 µg/ml de benomil. Para solucionar este problema foi realizado um experimento com diferentes concentrações de benomil em meio MCC. Foram testadas concentrações de 0, 5, 7, 9, 13 e 15 µg/ml. As placas foram inoculadas com esporos da linhagem E6, e observadas após quatro e sete dias de incubação a 28°C. Após quatro dias não apareceram colônias nas concentrações analisadas. Entretanto após sete dias de incubação um número elevado de colônias abortivas foi encontrado em concentrações inferiores a 13 µg/ml de benomil. Segundo estes resultados, nos experimentos seguintes (detalhados anteriormente) foram utilizados 10 e 20 µg/ml de benomil segundo indicado em cada caso.

4. DISCUSSÃO

Os micovírus foram descritos inicialmente na década de 60 mas somente a partir dos anos 80 atraíram a atenção de diversos grupos de pesquisa. Esta atração se deveu principalmente a dois aspectos: (i) a elucidação dos mecanismos envolvidos na replicação dos micovírus e (ii) a descoberta, em diferentes sistemas, da interferência do genoma viral com características fenotípicas do hospedeiro. Principalmente os trabalhos com o fungo fitopatogênico *Cryphonectria parasitica* demonstraram claramente o efeito de hipovirulência causado no fungo por ação direta de sequências de dsRNA.

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico, com aplicação comercial no controle de insetos praga em agricultura. Especialmente no Brasil este fungo é utilizado amplamente para o controle de insetos em plantações de cana-de-açúcar e pastagens, tendo ainda potencial de aplicação para insetos praga de outras culturas.

A descoberta da presença de dsRNA e de partículas virais em *M. anisopliae* imediatamente coloca em questão a possível interferência do genoma viral nos processos de entomopatogenicidade. Este trabalho inicia a caracterização de alguns aspectos básicos fundamentais para que seja possível acessar suas possíveis interferências com o hospedeiro.

Demonstramos que nas linhagens RJ, Al e M5 de *M. anisopliae*, as bandas de ácidos nucléicos extra DNA, presentes em extratos totais do fungo, eram compostas por dsRNA. Estas bandas são resistentes ao tratamento com DNase I e sensíveis a altas concentrações de RNase A. Estas bandas extras são ainda resistentes ao tratamento com nuclease S₁, se tornando sensíveis após desnaturação com calor (BOGO *et al.*, 1996a).

O perfil eletroforético dos dsRNA presentes nas linhagens de *M. anisopliae* analisadas parece variar um pouco conforme as condições de cultivo do fungo. Na linhagem M5 foi observado o aparecimento progressivo de componentes dsRNA adicionais, de menor peso molecular, em diferentes preparações ao longo do tempo (comparar Figura 3B, canaleta 2 e Figura 4,

canaleta 4). Na linhagem AI os componentes dsRNA do perfil eletroforético foram aumentando em intensidade com culturas sucessivas, chegando a apresentar doze componentes dsRNA, entre 100 pb e 4,1 kb (comparar Figura 3B, canaleta 1 e Figura 4, canaleta 1). Na linhagem RJ também foi observada uma variação nos componentes de migração mais rápida (comparar Figura 36A, canaletas 2 e 3, e Figura 37A, canaletas 3 e 4). SHAPIRA *et al.* (1991a) observaram que a migração eletroforética de um componente dsRNA presente em *Cryphonectria parasitica* pode se alterar a medida que o fungo sofre cultivos sucessivos. Estes autores mostraram que todas as preparações de dsRNA do fungo mantiveram os componentes de migração lenta (dsRNA L) porém o número e a concentração dos componentes de migração rápida variou significativamente entre as preparações. Os autores demonstram que estas alterações são deleções que ocorrem nos componentes dsRNA L, gerando componentes dsRNA M e S de migração rápida, que mantêm suas sequências de replicação e empacotamento.

A linhagem RJc, utilizada rotineiramente no laboratório, originou espontaneamente uma variante, RJd, que não apresenta pelo menos quatro componentes dsRNA de migração lenta (dsRNAs L), presentes na linhagem original. Esta variante RJd é estável pois mantém seu perfil eletroforético após passagens consecutivas. ANAGNOSTAKIS e DAY (1970) também observaram uma variação no número e na concentração de componentes dsRNA extraídos de algumas linhagens de *C. parasitica*, quando o genoma dsRNA era transferido, por anastomose, de linhagens hipovirulentas para linhagens virulentas (onde o dsRNA está ausente). Os autores sugerem que estas alterações ocorrem em novos hospedeiros de acordo com a carga genética de cada linhagem. EL SHERBEINI *et al.* (1984) também descreveram um fenômeno semelhante em uma linhagem "killer" de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta variante foi mantida separada da linhagem original durante dez anos e apresentou uma deleção de um dos componentes de dsRNA sem entretanto perder o fenótipo "killer".

Nas análises comparativas, através de eletroforese e hibridização, que realizamos com as linhagem RJc e sua variante RJd de *M. anisopliae* verificamos que além da ausência de alguns componentes de dsRNA na variante RJd, alguns dos componentes que comigram nas duas linhagens não são idênticos (Figura 3). Isto sugere que as alterações ocorridas são mais complexas do que a simples deleção completa de alguns dos componentes. Aparentemente ocorreram deleções completas de alguns componentes e parciais de outros. A análise criteriosa destas alterações é complexa e deveria incluir a determinação das

seqüências de cada um dos dsRNAs. Em *C. parasitica*, que apresenta um perfil de componentes mais simples, foi verificado através de sequenciamento que alguns dos componentes de menor peso molecular são derivados por deleção de componentes maiores, além disso foi observada a inserção de RNA estranho em alguns componentes e foi especulado que estas inserções possam ser oriundas de RNA ribossomal do hospedeiro (TARTAGLIA *et al.*, 1986; SHAPIRA *et al.*, 1991b). As alterações do perfil de dsRNA da variante RJd pode ser devida a alterações na carga genética do hospedeiro, por exemplo mutação de algum fator do hospedeiro envolvido na replicação do dsRNA viral. Além das alterações nos componentes dsRNA da linhagem RJc e sua variante RJd, se observam alterações fenotípicas como alteração na morfologia das colônias. Entretanto estas alterações fenotípicas não podem ser diretamente atribuídas as alterações ocorridas no perfil de dsRNA e portanto a presença de genes virais interferindo com o hospedeiro, pois a alteração da carga genética pode ser responsável pelas alterações fenotípicas entre elas a alteração no perfil de dsRNA. Outros autores já tentaram relacionar alterações fenotípicas do hospedeiro diretamente com o conteúdo de dsRNA viral. EL SHERBEINI *et al.* (1984) relataram que uma linhagem de *S. cerevisiae* perdeu sua característica "killer" após perder espontaneamente um componente dsRNA (componente M). BOTTACIN *et al.* (1994) observaram alterações na taxa de crescimento e na virulência de isolados do fungo fitopatogênico *Chalara elegans* contendo perfil de dsRNA alterado. Entretanto o exemplo mais claro de interferência de dsRNA viral com o fenótipo do hospedeiro foi demonstrado em *C. parasitica* onde as alterações na virulência e características fenotípicas foi relacionada diretamente ao dsRNA L após clonagem do cDNA completo e transformação de um hospedeiro livre de dsRNA (CHOI e NUSS, 1992a).

As alterações nos componentes dsRNA da linhagem RJc e sua variante RJd não provocam nenhuma alteração detectável nas proteínas virais pois o perfil eletroforético destas proteínas é idêntico nas duas linhagens. Também o perfil de reação destas proteínas com antisoro, detectado por Western é idêntico.

A análise da morfologia das colônias de *M. anisopliae* utilizadas neste trabalho mostra que em geral existe um crescimento diferencial entre linhagens que contém (A1, M5 e RJc) ou não (E6, E9 e MT) dsRNA. As linhagens infectadas apresentam menor taxa de crescimento. Este tipo de observação já havia sido descrito para isolados contendo dsRNA de outros fungos, tais como *Helminthosporium victoriae* (LINDBERG, 1960), *Penicillium stoloniferum* (BANKS *et al.*, 1968), *Ophiostoma (Ceratocystis) ulmi* (BRASIER, 1983),

Cercospora beticola (BRILLOVA e SLADKA, 1989), *Rhizoctonia solani* (WU *et al.*, 1989), *Mycosphaerella pinodes* (YAMADA *et al.*, 1991), *Sclerotinia sclerotiorum* (BOLAND, 1992) e *Chalara elegans* (BOTTACIN *et al.*, 1994). Em isolados de *C. parasítica* (ANAGNOSTAKIS, 1982; ELLISTON, 1985), *Leucostoma peroonii* (HAMMAR *et al.*, 1989), *Mycosphaerella pinodes* (YAMADA *et al.*, 1991) e *Sclerotinia sclerotiorum* (BOLAND, 1992) infectados com dsRNAs, foram observadas alterações na morfologia das colônias. No caso de *M. anisopliae* a morfologia das diversas linhagens é muito diferente e não é possível atribuir alterações na morfologia das colônias diretamente a presença de dsRNA.

A análise por ME de preparações purificadas de micovírus mostrou partículas virais isométricas semelhantes nas três linhagens de *M. anisopliae* aqui analisadas (RJ, Al e M5), embora apresentem diversidade no perfil de dsRNA. Os dsRNAs extraídos destas preparações mostraram um perfil de componentes idêntico aquele obtido de extração de micélios e esporos. Isto sugere que pelo menos alguns dos componentes dsRNA estão dentro dos capsídeos. A ausência de dsRNAs e partículas virais nas linhagens não infectadas (E6, E9 e MT) indica que estas estruturas estão associadas.

Nas preparações de MaV-RJd, onde os componentes dsRNA de maior peso molecular de MaV-RJ não estão presentes, foi observado só um tipo de partículas, com diâmetros de aproximadamente 35 nm. Entretanto MaV-Al e MaV-M5 parecem apresentar partículas de dois diâmetros diferentes, de 38 e 43 nm, e de 35 e 43 nm, respectivamente. BOGO *et al.* (1996a) determinaram que o diâmetro das partículas do vírus presente na linhagem RJ era de aproximadamente 25 nm. LEAL *et al.* (1994) determinaram o diâmetro das partículas de micovírus isolados de duas linhagens de *M. anisopliae* encontrando partículas icosaédricas de 33 nm de diâmetro. A diferença entre os diâmetros das partículas de MaV-Al com MaV-M5 e MaV-RJd pode ser devida ao pequeno número de partículas medidas.

A principal diferença entre as partículas virais das linhagens de *M. anisopliae* é que as MaVs de Al e M5, diferentemente de MaV-RJ, foram purificadas em muito menor concentração, a despeito de uma alta concentração de dsRNAs. Esta dificuldade em purificar maiores quantidades de partículas virais também foi descrita por GILLINGS *et al.* (1993) para micovírus de *Pytium irregulare*. Duas explicações prováveis podem ser sugeridas, baixa estabilidade das partículas virais e características genéticas das linhagens hospedeiras, por exemplo produção de proteases. Estudos anteriores mostraram que,

principalmente em relação a enzimas extracelulares e proteases, existem diferenças marcantes entre as linhagens do fungo (ROSATO *et al.*, 1981).

Durante o processo de purificação de cada um dos micovírus não se observou, em geral, diferenças no perfil eletroforético dsRNA nem nas proteínas detectadas nas bandas de gradientes de césio pré-formados e isopícnicos. A análise do conteúdo de dsRNA e proteínas das diferentes bandas de cada um dos gradientes não variou muito, e as medidas de seu espectro de absorção indicaram maiores concentrações de nucleoproteínas nas bandas mais visíveis, ainda que suas relações $A_{260/280}$ e as absorbâncias máximas e mínimas tenham se mantido praticamente constantes entre as bandas de cada gradiente e cada micovírus. A análise por ME revelou maiores concentrações de partículas virais nas bandas mais visíveis sem que se notassem diferenças evidentes no tamanho das partículas completas entre as bandas.

Estas diferentes bandas nos gradientes poderiam ser devidas a sedimentação diferencial de partículas com ou sem conteúdo de dsRNA (vazias, cheias ou ainda com conteúdo parcial de dsRNA), com maior ou menor grau de dano durante o processo de purificação, a formação de agregados ou a uma combinação destes dois fatores. Nossas análises por ME dos diferentes MaVs mostraram a presença de partículas com e sem a penetração do agente de contraste. Em micovírus esta característica não define partículas que contêm (cheias) ou não (vazias) os ácidos nucléicos (BOTZARTH, 1979). Os diâmetros estimados das partículas foram diferentes entre as partículas onde o contrastante penetrou ou não.

Uma outra razão da presença de distintas bandas nos gradientes pode ser excesso de material, impedindo assim a completa sedimentação das partículas. Entretanto as diversas bandas estiveram presentes mesmo em gradientes onde pequena concentração de micovírus estava presente. A hipótese mais imediata de presença de populações mistas de micovírus é pouco provável pois as diferentes bandas apresentam conteúdo semelhante de dsRNA e proteínas.

Outros autores também descrevem sua dificuldade em diferenciar as bandas obtidas em gradientes durante a purificação de micovírus, mesmo depois de exaustiva purificação. BANKS *et al.* (1970) obtiveram bandas discretas do complexo viral presente em *Aspergillus foetidus* (AfV) mediante centrifugação isopícnica em gradientes de césio, mas estas não apresentavam diferenças em seu conteúdo. Posteriormente, RATTI e BUCK (1972), observaram que tanto o vírus F de *A. foetidus* (AfV-F) quanto o vírus S presente no mesmo fungo (AfV-S)

forneceram bandas múltiplas em gradientes lineares de césio. A eficiência do fracionamento foi avaliada em centrifugação analítica em equilíbrio, porém somente para AfV-S se obteve a separação de seus dois tipos de partículas componentes. Os micovírus de *U. maydis* apresentaram três bandas principais quando foram submetidos a rigorosa purificação com PEG, dois ciclos de purificação diferencial e gradiente de densidade de sacarose. Mesmo assim cada banda continha todos os componentes dsRNA (BOZARTH *et al.*, 1981). Estes autores obtiveram a separação de diferentes tipos de partículas após centrifugação das bandas isoladas em gradientes de césio. KIM e BOZARTH (1985) para purificar os complexos virais presentes em *P. stoloniferum* (PsV) e *A. ochraceous* (AoV) utilizaram PEG, ultracentrifugação e gradientes lineares de sacarose obtendo três bandas para AoV e quatro bandas para PsV. As partículas presentes nestas bandas não puderam ser diferenciadas pelo espectro de absorção nem através de ME. A posterior centrifugação em gradientes isopícnicos de césio separaram seis bandas, para cada complexo viral, que também não puderam ser diferenciadas por espectro de absorção ou ME.

Estes trabalhos são clássicos em micovirologia. Resultados similares foram obtidos em alguns vírus crípticos (grupo de vírus vegetais semelhantes em muitas características aos micovírus, BUCK, 1986). Após gradientes isopícnicos de césio, foram obtidas diversas bandas nas preparações de um mesmo vírus, diferentes só na porcentagem de partículas penetradas e não penetradas pelo contrastante (LISA *et al.*, 1981). Quando tentamos uma purificação mais exaustiva dos MaV-RJ, não foram observadas bandas discretas nos gradientes de sacarose e apenas quantidades muito pequenas de dsRNA foram detectadas em algumas frações do gradiente. Isto provavelmente se deve a baixa estabilidade ou concentração de micovírus nas amostras analisadas. Para MaV-A1 e MaV-M5 somente foi possível recuperar pequenas quantidades de vírus a partir de gradientes isopícnicos quando as preparações foram pré-tratadas com inibidores de proteases, mais uma vez sugerindo a produção de proteases específicas nas diferentes linhagens de *M. anisopliae* utilizadas.

Portanto nossas tentativas para determinar a presença de mais de um tipo de micovírus na linhagem RJ, através de gradientes de sacarose seguidos de gradientes pré-formados e isopícnicos de césio, não foram bem sucedidas. Em outros fungos, metodologias diferentes foram aplicadas para a detecção de complexos virais. BUCK e KEMPSON-JONES (1970) separaram duas bandas de migração sorológicamente distintas de preparações virais de *P. stoloniferum* após eletroforese direta das preparações de micovírus. Estas partículas virais não

puderam ser separadas através de gradientes de centrifugação. Posteriormente (1973) estes mesmos autores separaram os diferentes micovírus em colunas de DEAE-celulose eluídas com gradientes de NaCl. RATTI e BUCK (1972) utilizando diálise separaram duas classes de partículas virais de *A. foetidus* com mobilidade eletroforética diferente, mas com tamanhos muito próximos.

Outro dado obtido foi relativo as proteínas presentes em preparações purificadas de micovírus de *M. anisopliae*, que provavelmente representam as proteínas virais. Foram observadas variações nas estimativas de massa molecular em diferentes géis SDS-PAGE e também em membranas de Western, portanto, a estimativa de massa molecular utilizada representa os valores médios obtidos em diferentes experimentos. Nas preparações purificadas de MaV-RJ se detectam por SDS-PAGE três bandas principais de proteínas, com 46, 42 e 55 kDa (em ordem decrescente de concentração). As proteínas detectadas nas preparações de MaV-Al (80 kDa) e MaV-M5 (80 e 76 kDa) aparecem em baixa concentração e portanto foram considerados os resultados dos experimentos de Western.

São vários os exemplos na literatura onde, como neste trabalho, mais de uma banda de proteína viral é encontrada em preparações purificadas, embora, em geral, seja atribuída apenas uma proteína como componente do capsídeo composto (MOR *et al.*, 1984; LIU e LIANG, 1985; SHEPHERD, 1990). BUCK (1986) comenta que ainda que muitos micovírus de dsRNA pareçam possuir o capsídeo por uma espécie principal de proteína outras bandas presentes podem ter uma variedade de origens, como: (i) produtos de degradação da proteína, (ii) proteínas contaminantes do hospedeiro, (iii) RNA polimerase, (iv) agregados da proteína do capsídeo, (v) polipeptídeos estruturais adicionais ou (vi) mistura de micovírus ou variantes.

Exemplos de mais de uma banda de proteína presente em preparações de micovírus, devido provavelmente a mistura de vírus ou variantes, ou a produtos de degradação, são os complexos de micovírus de *A. oschaereum* (AoV) e de *P. stoloniferum* (PsV). O micovírus AoV apresenta três polipeptídeos, sendo dois principais com 60 e 41 kDa e um minoritário de 51 kDa (KIM e BOZARTH, 1985). O micovírus PsV-F apresenta um polipeptídeo principal de 47 kDa e um minoritário de 59 kDa (BUCK e KEMPSON-JONES, 1974). O peso molecular dos polipeptídeos do capsídeo do micovírus PsV-S (principal 51 kDa e minoritário 42 kDa, KIM e BOZARTH, 1985) foi o mesmo encontrado por BUCK e KEMPSON-JONES (1974), porém a relação de concentração entre eles foi invertida. É possível que o polipeptídeo minoritário tenha sido derivado do maior por proteólise durante a purificação do micovírus (KIM e BOZARTH,

1985). Em AfV-S a proporção do polipeptídeo minoritário aumenta quando a preparação do micovírus é armazenada o que provavelmente representa proteólise (BUCK e RATTI, 1975).

Segundo MATTHEWS (1991), ácido nucléico incluído em um capsídeo protéico geralmente é considerado um vírus, entretanto para comprovar sua natureza viral é necessário que possa ser transmitido para um hospedeiro sadio e que a enfermidade se produza. Entretanto, a maioria dos trabalhos em micovírus utiliza o termo vírus para designar partículas morfológicamente similares a vírus que foram purificados e tenha sido demonstrada a presença de ácidos nucléicos incluído no capsídeo protéico, mesmo em situações onde a infectividade não tenha sido demonstrada (BUCK, 1986). Este é o caso das estruturas descritas em *M. anisopliae* neste trabalho, portanto empregamos neste trabalho indistintamente os termos vírus ou micovírus.

As características de diâmetro das partículas, número e pesos moleculares dos componentes dsRNA e pesos moleculares das proteínas dos micovírus de *M. anisopliae* descritos neste trabalho, não correspondem as famílias nem aos grupos descritos em micovírus. Várias destas características são semelhantes a alguns micovírus isométricos ainda não classificados, tais como o vírus de *Rhizoctonia solani* ou ovírus de *Allomyces arbusculata* (BUCK, 1986). É possível que os micovírus de *M. anisopliae* venham a ser classificados em uma família a ser criada.

Para investigar se a aparente complexidade do perfil eletroforético dos dsRNAs dos MaVs corresponde a uma complexidade genética foram construídas sondas de cDNA para analisar as homologias entre os diversos componentes. Em geral, as sondas sintetizadas para os componentes de maior peso molecular hibridizaram com seus dsRNAs correspondentes e com alguns dos componentes de menor peso molecular, mas o inverso não ocorreu. Por exemplo, sondas do componente S2 foram específicas para este componente enquanto sondas do componente S1 hibridizaram com seu homólogo e com o componente S2. Esta não reciprocidade pode ter, pelo menos, duas explicações: (i) os dsRNAs de maior peso molecular purificados podem estar contaminados com componentes de menor peso molecular devido a formação de estruturas secundárias que retardariam a migração dos componentes de baixo peso molecular ou (ii) o perfil de S2, por exemplo, pode ser mais complexo que o detectado nos géis corados com brometo de etídio, assim produtos de deleção dos componentes de maior peso molecular poderiam contaminar a região de migração de S2. Este tipo de

contaminação não estaria sendo detectado nos géis mas seria revelado pela hibridização que apresenta uma sensibilidade maior.

Três dos nove componentes dsRNA presentes na variante RJd (M1, S1 e S2) e três dos treze componentes da linhagem RJc (L1, M1 e S2), foram sintetizados como cDNAs. Estas sondas hibridizaram fortemente com os dsRNAs correspondentes e fracamente com outros dsRNAs de menor peso molecular do mesmo perfil. Os controles nas membranas, DNA de bacteriófago λ (não mostrado) e dsRNA de *Aspergillus niger*, não hibridizaram, em geral, com as sondas o que revela especificidade nas hibridizações. Isto sugere a existência de algum nível de homologia entre os componentes dsRNAs de MaV-RJd e entre os dsRNAs de MaV-RJc. A ocorrência de sequências terminais homólogas nos diferentes componentes dsRNA é um fenômeno comum em vírus de RNA dupla fita incluindo os dsRNAs de *C. parasitica* (HIREMATH *et al.*, 1986).

Em relação a hibridização dos dsRNAs de *M. anisopliae* ocorreram duas exceções aos padrões discutidos até aqui. Primeira, todas as sondas hibridizam fortemente com o componente S2. Um resultado semelhante foi observado em *C. parasitica*, cujo dsRNA consiste principalmente de componentes dsRNA L, e cujas sondas hibridizaram fortemente com os componentes de menor peso molecular (HIREMATH, *et al.*, 1986). Os autores explicam este fenômeno como sendo os dsRNAs menores compostos de componentes defectivos, originados por deleções internas dos componentes de maior peso molecular. Esta sugestão foi confirmada experimentalmente por SHAPIRA *et al.* (1991b). Em nosso trabalho o componente S2 da linhagem RJc e da variante RJd também hibridizam fortemente com as sondas dos componentes de maior peso molecular das linhagens A1 e M5. Portanto a luz dos resultados aqui apresentados não se pode descartar a possibilidade do componente S2 ser defectivo.

A segunda exceção foi o componente L2 da linhagem RJc. Nas linhagens RJ de *M. anisopliae*, todos os componentes mostraram hibridização cruzada (fraca) com algum outro componente dsRNA presente no perfil eletroforético, com exceção do componente L2, que não hibridiza com a sonda sintetizada para L1. Deste componente não foi sintetizada sonda mas seria interessante observar seu perfil de hibridização com os outros componentes L, considerando a possibilidade de representar um componente único ou um satélite, pois os satélites não são parte do "genoma" do micovírus e não apresentam similaridades com ele (BUCK, 1986; MATTEWS, 1991). Um resultado semelhante foi observado em *S. cerevisiae*, onde os componentes L constituem duas famílias, uma de componentes L-A relacionados entre eles, distinguíveis apenas com base

em sua sequência de nucleotídeos, na sua função ou em ambos; e outra família de componentes L-BC que apresentam o mesmo tamanho dos anteriores mas não apresentam sequências relacionadas, a nível de hibridização (revisto por WICKENER, 1992).

MaV-AL também apresenta um perfil eletroforético com múltiplos componentes dsRNA e em MaV-M5, o perfil simples com dsRNA de alto peso molecular, paulatinamente apresentou dsRNAs menores, tornando o perfil mais complexo com o suceder das sub-culturas. Estes dsRNAs "novos" sempre estão em concentração menor que o componente de maior peso molecular, mesmo sendo levado em conta que este último incorpora mais brometo de etídio devido ao seu tamanho. Poderia se sugerir que estes componentes de menor peso molecular seriam simplesmente produtos de replicação parcial ou deleções dos componentes maiores, entretanto, eles não hibridizaram com as sondas sintetizadas a partir dos componentes maiores de MaV-A1 ou MaV-M5 nem com nenhuma das sondas sintetizadas a partir dos componentes dsRNA dos MaV-RJs. É possível, embora não existam dados experimentais para suportar essa hipótese, que estes dsRNAs menores sejam componentes únicos que ao longo das sub-culturas aumentam seu número de cópias.

Em relação as homologias entre os diferentes MaVs os experimentos de hibridização indicam que existe similaridade entre MaV-A1, MaV-M5 e os MaV-RJs. Entretanto esta homologia depende do componente analisado. Sondas sintetizadas a partir do componente dsRNA de maior peso molecular de MaV-A1, hibridizam com o componente dsRNA de maior peso molecular de MaV-M5, e o inverso também ocorre. Isto demonstra alta homologia entre estes dois MaVs. Estas sondas hibridizam também com os componentes M1, M3 e S2 dos MaV-RJs, mas o inverso não ocorre. Esta ausência de reciprocidade também foi observada em relação a sorologia, como será discutido mais adiante. A correspondência entre sorotipagem e similaridade de sequências já foi descrita anteriormente e foi utilizada para caracterização de sorotipos específicos de micovírus (DE MATTOS, *et al.*, 1989; JACKWOOD, *et al.*, 1990; KIBENGE, 1992). Como conclusão geral dos resultados de hibridização podemos dizer que MaV-A1 e MaV-M5 são muito relacionados, senão o mesmo micovírus, e que estes estão relacionados a alguns componentes dos MaV-RJs.

No estabelecimento de interrelações entre micovírus o uso de sorologia é claramente indicado (LISTER, 1979). O poder de discriminação dos anticorpos pode ser observado em uma comparação de 19 isolados do fungo *Gaeumannomyces graminis* onde foram descritas partículas virais com vários

grupos de sorotipos e grau de relacionamento, indicando que mesmo partículas virais de tamanho semelhante e com densidade em gradientes de CsCl semelhantes e isoladas do mesmo organismo, na mesma localidade, podem apresentar diferenças significativas em seus sorotipos (FRICK e LISTER, 1978).

Para obter mais dados para a caracterização dos MaVs foram realizados testes sorológicos e para tanto antisoros foram preparados utilizando preparações de micovírus na imunização de coelhos. Uma ocorrência comum no preparo de antisoros com micovírus é a presença de proteínas contaminantes do fungo hospedeiro durante a imunização e portanto anticorpos que reagem com proteínas do hospedeiro podem mascarar a reação com o micovírus. Para evitar esta possível interferência os antisoros obtidos foram testados com extratos de duas linhagens de *M. anisopliae* "livres de micovírus" (E6 e MT). Nestes testes os antisoros não reagiram, demonstrando que não reagem com proteínas do hospedeiro e portanto são específicos para os micovírus. Outra possível interferência é a presença de anticorpos que reagem contra o ácido nucléico (dsRNA). Os anticorpos contra dsRNA são capazes de reagir, com pouca especificidade, com um amplo espectro de diferentes dsRNA (IKEGAMI e FRANCKI, 1977). Os antisoros produzidos contra os MaVs neste trabalho foram testados com dsRNAs, em reação de DD, fornecendo resultados negativos, confirmando assim que os anticorpos reagem com as proteínas dos micovírus e não com os dsRNAs.

Os antisoros contra MaV-M5 e MaV-A1 não reagiram com seus homólogos nas provas de DD, mas formaram bandas fracas de precipitação quando reagidos com MaV-RJ. O antisoro contra MaV-A1 reage com seu homólogo em microprecipitação, e ambos soros contra MaV-A1 e MaV-M5, reagem com suas proteínas homólogas em Western, portanto ocorreu formação de anticorpos contra MaV-A1 e MaV-M5 nos coelhos imunizados. Provavelmente a reação fraca ou ausente em DD, possa ser devida a pouca sensibilidade desta prova, comparada com outros testes tais como Western, e a pequena quantidade de proteínas virais presentes nas preparações de MaV-A1 e MaV-M5, podendo ser atribuída a uma quantidade menor de micovírus no fungo, uma vez que tanto na análise eletroforética como na ME as quantidades são menores que nas preparações de MaV-RJ, ou a presença de proteases nas preparações. De fato, somente obtivemos bandas visíveis nos gradientes de CsCl quando as preparações de MaV-A1 e MaV-RJ foram tratadas com inibidores de proteases. Outros autores descrevem sua dificuldade em obter reações nas provas de DD em alguns vírus crípticos já que o vírus não é detectado mediante este teste ou os vírus

difundem pobremente no ágar quando resuspendidos em tampão fosfato (LUISONI *et al.*, 1987; KOENIG e LESEMANN, 1980). Com os MaV-RJs estes problemas não ocorreram e sempre foram obtidas quantidades significativas de micovírus e proteínas virais. O antisoro contra MaV-RJ reage com seus homólogos MaV-RJc e MaV-RJd mas não reage com MaV-A1 e MaV-M5.

Nos testes de relação em Western, os soros contra MaV-A1 e contra MaV-M5 reconhecem a proteína de 80 kDa em MaV-A1 e em MaV-M5, indistintamente. O soro contra MaV-A1 reage com MaV-RJs, principalmente com a proteína de 46kDa, mas o inverso não ocorreu. As reações solorógicas recíprocas entre MaV-M5 e MaV-RJs são basicamente iguais às obtidas entre MaV-A1 e MaV-RJs. A partir destes dados podemos concluir que MaV-A1 e MaV-M5 são estreitamente relacionados entre si e mantém alguma relação com MaV-RJ. Esta conclusão é idêntica aquela obtida a partir dos dados de homologia entre os componentes dsRNA.

Os micovírus não são capazes de penetrar ativamente células do fungo hospedeiro, não existem evidências de rotas extracelulares de infecção e não são conhecidos vetores envolvidos na sua transmissão (GRENTE e SAURET, 1969a,b; SHAPIRA *et al.*, 1991a). Portanto, o entendimento da relação entre os micovírus e seus hospedeiros depende do desenvolvimento de sistemas que possibilitem sua transmissão a hospedeiros livres de micovírus e de experimentos de cura (NUSS e KOLTIN, 1990).

Em *M. anisopliae* a anastomose é comum entre as hifas, entre conídios e entre conídios e tubos germinativos (TINLINE, 1971). Portanto uma possibilidade de transmissão de micovírus seria a anastomose entre linhagens infectadas e não infectadas. Tentamos, sem sucesso, a transmissão dos MaVs através de anastomose, provavelmente devido ao baixo grau de complementariedade entre as linhagens de *M. anisopliae* utilizadas (BOGO *et al.*, 1996a).

Como alternativa para a transmissão dos MaVs tentamos a introdução dos micovírus utilizando bombardeamento com partículas. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso em *M. anisopliae* para a introdução de DNA por transformação (ST. LEGER *et al.*, 1995; BOGO *et al.*, 1996b). As linhagens de *M. anisopliae* utilizadas como receptoras foram inicialmente analisadas para a ausência de dsRNA e de partículas ao microscópio eletrônico. Estas linhagens também não apresentam bandas de proteínas relacionadas aos micovírus quando submetidas ao mesmo protocolo utilizado para purificação dos micovírus.

Preparações dos MaVs foram aderidas a partículas de tungstênio e bombardeadas para as linhagens receptoras. Não foram obtidos transformantes contendo dsRNA. Algumas variações foram examinadas em relação ao modo de preparo da amostras para o bombardeamento, o grau de pureza das preparações de micovírus e sua concentração, as condições de bombardeamento e os métodos de seleção das colônias bombardeadas. Nenhuma destas variações se mostrou eficaz. A não transferência pode ser devida a várias causas sendo as mais importantes: (i) é possível que durante o processo de bombardeamento as partículas de micovírus tenham sido degradadas, perdendo sua capacidade de replicação, (ii) não sabemos se fatores do hospedeiro são importantes para a replicação viral e se as linhagens livres de micovírus são permissivas a replicação, (iii) não dispomos de um método eficiente de análise dos transformantes. No primeiro caso deveríamos examinar as partículas adicionadas de micovírus por microscopia eletrônica para verificar se existem alterações importantes nas partículas. Para tentar contornar a possível interferência do hospedeiro na replicação do micovírus utilizamos a linhagem M5 infectada com MaV-M5, que apresenta um perfil de dsRNA mais simples (normalmente apenas um componente dsRNA está presente) e diferente do perfil de MaV-RJd. Entretanto não foram obtidos transformantes com perfil de dsRNA de MaV-RJd. Certamente uma das maiores dificuldades nestes experimentos de transmissão dos MaVs é a falta de uma metodologia simples que permita identificar as colônias transformadas depois do bombardeamento. Tentamos um sistema de cotransformação onde o vetor pBT6, que codifica para resistência a benomil, foi misturado com as partículas virais de forma a permitir a seleção de colônias resistentes a benomil e entre estas procurar aquelas que estivessem replicando os micovírus. Esta alternativa também não foi bem sucedida.

Os experimentos de transferência por bombardeamento realizados neste trabalho não abordaram todos os aspectos possíveis de serem analisados e portanto não são conclusivos sobre o insucesso da transferência. Os trabalhos na literatura referentes à transmissão de micovírus com preparações livres de células quando aplicadas a hifas de fungos, células ou esferoplastos são inconclusivas (NUSS e KOLTIN, 1990, NUSS, 1992). Não existe na literatura descrição da tentativa de transferência de micovírus utilizando bombardeamento com partículas. No caso de *Cryphonectria parasitica* a transferência do micovírus foi obtida através da síntese do cDNA completo (CHOI e NUSS, 1992a,b) e de transcritos sintéticos correspondentes à fita de RNA codante (CHEN *et al.*, 1994), a partir do dsRNA viral, utilizando métodos convencionais de transformação em

fungos filamentosos. Esta alternativa para os MaVs não está imediatamente disponível uma vez que o perfil de componentes dsRNA é mais complexo. Uma alternativa é a utilização do componente dsRNA de alto peso molecular de MaV-M5 para síntese do cDNA completo e sua transformação para linhagens de *M. anisopliae* "livres de vírus".

5. CONCLUSÕES

A dificuldade de detectar as colônias portadoras de micovírus, após o bombardeamento, provavelmente poderá ser contornada desenvolvendo técnicas para análise de um grande número de colônias utilizando por exemplo ELISA ou "dot blot".

Este trabalho representa uma contribuição importante na caracterização dos micovírus associados a *M. anisopliae* e abre a perspectiva de que a possível interferência dos dsRNAs com a entomopatogenicidade seja estudada. Futuros trabalhos com os MaVs poderão abordar os seguintes aspectos: (i) utilizar métodos mais potentes para verificar se a linhagem RJ está infectada por mais de um tipo de micovírus, empregando por exemplo diálise e eletroforese para separar diferentes partículas virais, (ii) observar se os perfis de dsRNA são alterados após a passagem do fungo em insetos, (iii) verificar a presença de micovírus, nos insetos infectados por *M. anisopliae*, (iv) identificar o gene que codifica a RNAPol do micovírus que provavelmente está associada ao capsídeo, (v) transferir os micovírus para linhagens não infectadas utilizando bombardeamento ou eletroporação, acoplados ao desenvolvimento de sistemas mais eficientes de detecção das colônias infectadas, (vi) eliminar os dsRNAs através de cura para verificar as possíveis alterações fenotípicas associadas aos micovírus e (vii) verificar a localização dos micovírus nas células do fungo.

5. CONCLUSÕES

1. As linhagens Al, M5 e RJ de *Metarhizium anisopliae* apresentam micovírus. Propõe-se a denominação MaV-Al, MaV-M5 e MaV-RJ, respectivamente, para os vírus presentes em cada uma destas linhagens.
2. As linhagens E6, E9 e MT deste fungo não apresentam micovírus.
3. O diâmetro das partículas virais é de 35 nm para MaV-RJs e MaV-M5, e de 38 nm para MaV-Al.
4. Os MaV-RJs apresentam uma proteína majoritária de 46 kDa e duas proteínas minoritárias de 42 e 55 kDa. MaV-Al e MaV-M5 apresentam uma proteína principal de 80 kDa.
5. O ácido nucléico dos três micovírus é dsRNA. Os perfis eletroforéticos apresentam vários componentes dsRNAs. Estes componentes em MaV-RJ apresentam, em geral, muito baixa homologia entre si, com exceção do componente S2 que hibridiza fortemente com todas as sondas produzidas, e do componente L2 que não hibridiza com L1 nem com nenhuma sonda produzida.
6. Existe alta homologia de seqüências entre MaV-Al e MaV-M5, e estes apresentam homologia com alguns componentes dsRNAs dos MaV-RJs.
7. Sorologicamente MaV-Al e MaV-M5 são estreitamente relacionados e mantêm um relacionamento mais distante com MaV-RJs.
8. A variante MaV-RJd se distingue de MaV-RJc na falta dos componentes dsRNA de maior peso molecular e no perfil eletroforético dos componentes dsRNA de menor peso molecular. Existem alterações na morfologia das colônias da linhagem derivada RJd, mas não existem dados experimentais para que sejam diretamente associadas as alterações dos componentes dsRNA.
9. Não foi possível transferir por bombardeamento os micovírus ou os dsRNAs para linhagens "livres de vírus".

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL AIDROOS, K. 1980. Demonstration of parasexual cycle in the entomopatogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Transac. British Mycolog. Soc.** 75:473-477.
- ALBOURY, J. 1979. Some morfological changes in fungi induced by fungal viruses. In: MOLITORIS, H. P., HOLLINGS, M., WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses**. Springer - Verlag, Berlin, Heilelberg, NY. p. 78-93.
- ALVES, S. B. 1986. Agentes entomopatogenicos no controle microbiano. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Editora Manole Ltda. 407p.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. 1981. Stability of dsRNA components of *Endothia parasitica* through transfer and subculture. **Exp. Mycol.** 5(3):236-242.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. 1982. Biological control of chestnut blight. **Science** 215:466-471.
- ANAGNOSTAKIS, S. L.; DAY, P. R. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. **Phytopathology** 69:1226-1229.
- ARAMBURU, J.; MORENO, P. 1994. Detection of double-stranded RNA (dsRNA) in crude extracts of virus -infected plants by indirect ELISA. **J. Phytopathol.** (Berlin) 141(4):375-385.
- ARMALEO, D.; YE, G. N.; KLEIN, T. M.; SHARK, K. B.; SANFORD, J. C.; JOHNSTON, S. A. 1990. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Curr. Genet.** 17:97-103.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. 1989. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York, Jonh Wiley & Sons, Inc. 2 V.

- AZEVEDO, J. L.; MESSIAS, C. L.; SILVEIRA, W. D. 1987. Genetics and breeding of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Parasexually and protoplast fusion. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; BRAVO, J.E.; TAVARES, F.C.A.; PADOCK, E.P. (eds). **Biotechnology of plants and microorganisms**. Academic Press, London.
- BAILEY, A.M.; MENA, G. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. 1993. Transformation of four pathogenic *Phytophthora spp* by microprojectile bombardment on intact mycelia. **Curr. Genet.** **23**:42-46.
- BAGAGLI, E. 1987. **Parameiosis em *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN**. Dissertação apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre. Piracicaba. SP. Brasil.
- BAGAGLI, E., VALADARES, M. C. C. & AZAVEDO, J. L. (1991) Parameiose in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Rev. Bras. Genet.** **14**: 261-271
- BANKS, G. T.; BUCK, K. W.; CHAIN, E. B.; HIMMELWEIT, F., MARKS, J. E. TYLER, J. M.; HOLLING, M.; LAST, F. T. 1968. Viruses in fungi and interferon stimulation. **Nature** (London) **218**: 542-545.
- BANKS, G. T.; BUCK, K. W.; CHAIN, E. B.; DARBYSHIRE, J. E.; HIMMELWEIT, F.; RATTI, G.; SHARPE, T. J.; PLANTEROSE, D. N. 1970. Antiviral activity of double-stranded RNA derived from a virus isolated from *Aspergillus foetidus*. **Nature** (London) **227**: 505.
- BARBARA, D. J.; ASHBY, S. C.; MORTON, A. 1987. Double - stranded RNA in *Verticillium albo - atrum*. **Plant Pathol.** **36(2)**:229-231.
- BARRETO, C. C.; CARDOSO, L. A.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L.; VAINSTEIN, M. H. 1994a. Efficient transformation of *Paecilomyces* by particle bombardment. In: Anais do XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Caxambu, Brasil. p.61.
- BARRETO, C. C.; PINTO JR., H.; AUGUSTIN, C.; SCHRANK, A. 1994b. Amplification of genomic sequences related to chitinases from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. XXIII Reunião Anual da SBBq e BM. Caxambu. Brasil
- BEN-TZIVI, B.S.; KOLTIN, Y.; MAVARECH, M.; TAMARKIN, A. 1984. RNA polymerase activity in virions from *Ustilago maydis*. **Mol. Cell. Biol.** **4(1)**:188-194.

- BERKS, R. 1963. Untersuchungen über individuelle Unterschiede von Antiseren gegen Kartoffel X-Virus bei Reaktionen mit verwandten Viren. **Phytopathology Z** 47:301-313.
- BOBEK, L.A.; BRUENN, J. A.; FIELD, L. J.; GROSS, K. W. 1982. Cloning of cDNA to a yeast viral double-stranded RNA and comparison of three viral RNAs. **Gene** 19(2):225-230.
- BOGO, M. R.; AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M.S.S.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. 1991. Mycoviral dsRNA from a strain of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Caxambu. Res, 2.01
- BOGO, M. R.; GONZAGA, E. S.; OCAMPOS, M.; SCHRANK, A. 1992. DNA mediated transformation of *Metarhizium anisopliae* using Benomyl resistance (ben^R) markers. Resumos da 13^o Reunião Anual de Genética de Microorganismos 119.
- BOGO, M. R.; da COSTA, A. T.; SCHRANK, A. 1993a. Transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation. Resumos da XXII Reunião Anual da SBBq 58.
- BOGO, M. R., OCAMPOS, M.; SCHRANK, A. 1993b. Cloning of the β -tub gene from a ben^R mutant of *Metarhizium anisopliae*. Resumos da XXII Reunião Anual da SBBq 57.
- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; SILVA, D. M.; GIMENEZ, M. P.; AZEVEDO, J. L.; SCHRANK, A. 1996a. Double-stranded RNA and isometric viral particles isolated from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research** (in press).
- BOGO, M. R.; VAINSTEIN, M. H.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E.; SCHRANK, A. 1996b. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, aceito em abril de 1996.
- BOISSONNET-MENES, M.; LECOQ, H. 1976. Transmission de virus par fusion de protoplastes chez *Pyricularia oryzae*. **Physiol. Veg.** 14:251-257.
- BOLAND, G. J. 1992. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian J. Plant Pathology** 14(1):10-17.

- BOLLAG, D.M.; EDELSTEIN, S.J. 1991. **Protein methods**. New York. Wiley-Liss Inc., 230p.
- BOTTACIN, A. M.; LEVESQUE, C. A.; PUNJA, Z. K. 1994. Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. **Phytopathol.** **84(3)**: 303-312.
- BOZARTH, R. F. 1975. The problem and importance of transmission of mycoviruses using cell free extracts. **Proc. Int. Congr. Virol.** (Madrid) Abstract, p.148.
- BOZARTH, R. F. 1979. Physicochemical properties of mycoviruses: An overview. In: MOLITORIS, H. P.; HOLLINGS, M.; WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY. p. 48-61.
- BOZARTH, R. F.; HARLEY, E. H. 1976. The electroforetic mobility of double-stranded RNA in polyacrylamide gels as a function of molecular weight. **Biochem. Biophys Acta** **432**: 329-335.
- BOZARTH, R. F.; KOLTIN, Y.; WEISSMANN, M. B.; PARKER, R. L.; DALTON, R. E.; STEINLAUF, R. 1981. The molecular weight and packaging of dsRNAs in the mycovirus form *Ustilago maydis* killer strains. **Virology** **113**:492-502.
- BRASIER, C. M. 1983. A cytoplasmically transmitted disease of *Ceratocystis ulmi*. **Nature** **305**:220-222.
- BRILLOVA, D.; SLADKA, O. 1989. Transmission of virus-like particles from the infected into the healthy strains of *Cercospora beticola* Sacc. **Ceska Mykologie** **43(3)**:155-165.
- BRUENN, J. A. 1980. Virus-like particles of yeast. **Annu. Rev. Microbiol.** **34**:49-68.
- BRUENN, J. A.; NEMEROFF, M. E.; LEE, M.; PIETRAS, D. F.; DOWHANICK, J. J.; FIELD, L. J. 1988. Structure, transcription and replication of killervirus dsRNAs. In: KOLTIN, Y.; LEIBOWITZ, M. J. (eds.). **Viruses of fungi and simple eukaryotes**. Dekker, New York. p.117-132.
- BUCK, K.W. 1979a. Virion-associated RNA polymerases of double-stranded RNA mycoviruses. In: MOLITORIS, H. P., HOLLINGS, M., WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY. p. 62-77.

- BUCK, K.W. 1979b. Replication of double-stranded RNA mycovirus. In: LEMKE, P. A. (ed.). **Viruses and plasmids in fungi**. Dekker, New York. p. 93-160.
- BUCK, K. W. 1980. Viruses and killer factors of fungi. In: GOODAY, G. W.; LLOYD, D.; TRINCI, A. P. J. (eds.). **The Eukaryotic Microbial Cell**. Soc. Gen. Microbiol. Syn N°30. Cambridge. Univ. Press. p.329.
- BUCK, K.W. 1984. A new double- stranded RNA virus from *Gaeumannomyces graminis*. **J. Gen. Virol.** **65 (5)**:987-990.
- BUCK, K.W. 1986. Fungal virology- an overview. In: BUCK, K. W. (ed.). **Fungal virology**. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 2-84.
- BUCK, K.W.; KEMPSON-JONES, G. F. 1970. Three types of virus particle in *Penicillium stoloniferum*. **Nature** **225**:945-946.
- BUCK, K. W.; KEMPSON-JONES, G. F. 1973. Biophysical properties of *Penicillium stoloniferum* virus S. **J. Gen. Virol.** **18**:223-235.
- BUCK, K. W.; GIRVAN, R. F. 1977. Comparison of the biophysical and biochemical properties of *Penicillium cyaneo-fulvum* virus and *Penicillium chrysogenum* virus. **J. Virol.** **34**: 145
- BUCK, K.W.; LHOAS, P.; BORDER, D.J.; STREET, B.K. 1973. Virus particles in yeast. **Biochem. Soc. Trans.** **1**: 1141.
- BUCK, K. W.; KEMPSON-JONES, G. F. 1974. Capsid polipeptides of two viruses isolated from *Penicillium stoloniferum*. **J. Gen. Virol.** **22**:441.
- BUCK, K. W.; RATTI, G. 1975. Biophysical and biochemical properties of two viruses isolated from *Aspergillus foetidus*. **J. Gen. Virol.** **27**:211-224.
- BUCK, K.W.; RATTI, G. 1977. Molecular weight of double-stranded RNA: a re-examination of *Aspergillus foetidus* virus S RNA components. **J. Gen. Virol.** **37**:215-219.
- BUCK, K. W.; GIRVAN, R. F.; RATTI, G. 1973. Two serologically distinct double - stranded ribonucleic acid viruses isolated form *Aspergillus niger*. **Trans. Biochem. Soc.** **1**: 1138-1140.
- BUCK, K. W.; ALMOND, M. R.; McFADDEN, J. J. P.; ROMANOS, M. A.; RAWLINSON, C. J. 1981a. Properties of thirteen viruses and virus variants obtained from eight isolates of the wheat take-all fungus, *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*. **J. Gen. Virol.** **53**:235.

- BUCK, K. W.; ROMANOS, M. A.; RAWLINSON, C. J. 1981b. A satellite double-stranded RNA in a virus from *Gaeumannomyces graminis*. **J. Gen. Virol.** **57(2)**: 375-385.
- BUCK, K. W.; ACKERMANN, H. W.; BOZARTH, R. F.; BRUENN, J. A.; KOLTIN, Y.; RAWLINSON, C. J.; USHIYAME, R.; WOOD, H. A. 1984. Six groups of double-stranded RNA mycoviruses. **Intervirology** **22(1)**:17-23.
- BULL, A.T.; TRINCI, A.P.J. 1977. The physiology and metabolic control of fungal growth. **Adv. Microbial Physiol.** **15**: 1.
- BURNETT, J. P.; FRANK, B. H.; DOUTHART, R.J. 1975. Ionic-strength effects on stability and conformation of *Penicillium chrysogenum* mycophage double-stranded RNA. **Nucleic Acid Res.** **2**:759-771.
- CATEN, C. E. 1972. Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. **J. Gen. Microbiol.** **72**: 221.
- CHANG, T. H.; BANERSEE, N.; BRUENN, J.; HELD, W.; PEERY, T.; KOLTIN, Y. 1989. A very small viral double-stranded RNA. **Virus Genes** **2(2)**:195-206.
- CHEN, K.; LIANG, P.; YU, M.; CHANG, S. T. 1988. A new double-stranded RNA virus from *Volvariella volvacea*. **Mycologia** **80(6)**:849-853.
- CHEN, B. S., CHOI, G. H.; NUSS, D. L. 1993. Mitotic stability and nuclear inheritance of integrated viral cDNA in engineered hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. **EMBO J.** **12 (8)**:2991-2998.
- CHEN, B. S.; CHOI, G. H.; NUSS, D.L. 1994. Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. **Science (Washington)** **264(5166)**: 1762-1764.
- CHENG, R. H.; CASTON J, R.; WANG, G.; GU, F.; SMITH T. J.; BAKER, T. S.; BOZARTH, R. F.; TRUS, B. L.; CHENG, N.; WICKNER, R. B.; STEVEN, A. C. 1994. Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers. **J. Mol. Biol.** **244(3)**:255-258.
- CHOI, G. H.; NUSS, D. L. 1992a. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious cDNA. **Science** **257**:800-803.
- CHOI, G. H.; NUSS, D. L. 1992b. A viral gene confers hypovirulence-associated traits to the chestnut blight fungus. **EMBO J.** **11**:473-477.

- CHUNG, P. H.; BEDKER, P. J.; HILLMAN, B. I. 1994. Diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence-associated double-stranded RNAs within a chestnut population in New Jersey. **Phytopathol.** **84** (9):984-990.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** **34**:457-483.
- CLEWELL, B. D.; HELINSKY, D. R. 1969. Sepercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular form. **Proc. Nat Acad. Sci. USA** **62**: 1159-1166.
- DAY, P. R.; ANAGNOSTAKIS, S. L. 1973. The killer system in *Ustilago maydis*: heterokaryon transfer and loss of determinants. **Phytopathol.** **63**:1017-1018.
- DAY, P.R.; DODDS, J. A. 1979. Viruses of plant pathogenic fungi. In: LEMKE, P.A. (ed.). **Viruses and plasmids in fungi**. Dekker, New York, p. 201-238.
- DE MATTOS, C.C.; DE MATTOS, C.A.; OSBURN, B.I.; DANGLER, C.A.; CHUANG, R. Y.; DOI, R.H. 1989. Recombinant DNA probe for serotype-specific identification of bluetongue virus 17. **Am. J. Vet. Res.** **50**(4): 536-541.
- DERRICK, K. S.; FRENCH, R. C.; CLARK, C. A.; GABRIEL, C. J. 1984. Detection of double - stranded RNA by serologically specific electron microscopy. **J. Virol. Meth.** **9**(4):293-299.
- DETROY, R.W., FREER, S.N.; FENNELL, D.I. 1973. Relationship between the biosynthesis of virus-like particles and mycophenolic acid in *Penicillium stoloniferum* and *Penicillium brevicompactum*. **Can. J. Microbiol.** **19**:1459.
- DETROY, R. W.; WORDEN, K. A. 1979. Interactions of fungal viruses and secondary metabolites. In: MOLITORIS, H. P., HOLLINGS, M., WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses**. Springer - Verlag, Berlin, Heilelberg, NY. p. 94-107.
- DICKINSON, M.J.; ZHANG, R.; PRYOR, A. 1993. Nucleotide sequence relationships of double-stranded RNAs in flax rust, *Melampsora lini*. **Current Genetics** **24**(5):428-432.
- DOBROTA, M.; HINTON, R. 1992. Conditions for density gradient separations. In: RICKWOOD, D. (ed.). **Preparative Centrifugation: a practical approach**. Oxford University Press, New York, p. 77-142.

- DURBAHN, C. M.; NUSS, D. L.; FULBRIGTH, D. W. Molecular analysis of the dsRNA associated with hypovirulence in a Michigan strain of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Phytopathol.** in press.
- EDMONSON, S. P.; LANG, D.; GRAY, D. M. 1984. Evidence for sequences heterogeneity among the double stranded RNA segments of *Penicillium crysogenum* mycovirus. **J. Gen. Virol.** **65(9)**:1591-1599.
- EL-SHERBEINI, M.; BOSTIAN, K.A. 1987. Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**:4293-4297.
- EL-SHERBEINI, M.; TIPPER, D. J.; MITCHELL, D. J.; BOSTIAN, K. A. 1984. Virus-like particle capsid proteins encoded by different L double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: their roles in maintenance of M double-stranded killer plasmids. **Mol. Cell. Biol.** **4**:2818.
- ELLIS, L.F.; KLEINSCHMIDT, W. J. 1967. Virus-like particles of a fraction of statolon, a mould product. **Nature (London)** **215**:649-650.
- ELLISTON, J. E. 1985. Characterization of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. **Phytopathology** **75**:151-158.
- ENEBAK, S.A.; HILLMAN, B. I.; MAC DONALD, W. L. 1994. "A hypovirulent isolate of *Cryphonectria parasitica* with multiple, genetically unique dsRNA segments" **Molecular Plant-Microbe Interactions** **7(5)**:590-595.
- ESTEBAN, R.; WICKNER, R. B. 1986. Three different M1 RNA-containing viruslike particles types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo M1 double-stranded RNA synthesis. **Mol. Cell. Biol.** **6**:1552-1561.
- ESTEBAN, R.; WICKNER, R.B. 1988. A deletion mutant of L-A dsRNA replicates like M1 dsRNA. **J. Virol.** **62**:1278-1285.
- ESTEBAN, R.; FUJIMURA, T.; WICKNER, R. B. 1988. Site specific binding of viral plus single-stranded RNA to replicase-containing open virus-like particles of yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**:4411-4415.
- FAHIMA, T.; KAZMIERCZAK, P.; HANSEN, D.R.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N. K. 1993. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-stranded of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Virology** **195** (1):81-89.

- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. **Ann. Rev. Entomol.** **23**:409-442.
- FIELD, L. J.; BRUENN, J. A.; CHANG, T. H.; PINHASI, O.; KOLTIN, Y. 1983. Two *Ustilago maydis* viral dsRNAs of different size cide for the same product. **Nucleic Acids Res.** **11(9)**:2765-2814.
- FINKLER, A.; PEERY, T.; TAO, J.; BUENN, J.; KOLTIN, Y. 1992. Immunity and resistance to the KP6 toxin of *Ustilago maydis*. **Molecular & general genetics** **233(3)**:395-403.
- FRANCKI, M. G.; KIRBY, G. C. 1991. Detection of double stranded RNA viruses in isolates of Australian smut fungi and their serological relationship to viruses found in *Ustilago maydis* form the USA. **Autralian J. of Botany** **39(1)**: 59-66.
- FRANCKI, R.I.B.; BOCCARDO, G. 1983. The plant Reoviridae. In: JOKLIK, W.K. (ed.). **Reoviruses**. The Viruses. pg 505-563.
- FRICK, L.J.; LISTER, R.M. 1978. Serotype variability in virus-like particles from *Gaeumannomyces graminis*. **Virology** **85**:504-517.
- FRIED, H. M.; FINK, G.R. 1978. Electron microscopic heteroduplex analysis of "killer" double-stranded RNA species from yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **75**:4224-4228.
- FUJIMURA, T.; WICKNER, R. B. 1988a. Gene overlap results in a viral protein having an RNA binding domain and a major coat protein domain. **Cell** **55**:663-671.
- FUJIMURA, T.; WICKNER, R. B. 1988b. Replicase of L-A virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. In vitro conversion of exogenous L-A and M, single-stranded RNAs to double-stranded form. **J. Biol. Chem.** **263(1)**:454-460.
- FUJIMURA, T.; ESTEBAN, R.; WICKNER, R.B. 1988. Double-stranded RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic control and in vitro replication. In: KOLTIN, Y.; LEIBOWITZ, M. J. (eds.). **Viruses of fungi and simple eukariotes**. pp.91-116. Dekker, New York.
- FULBRIGHT, D. W. 1984. Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology** **74**:722-724.
- GABRIEL, C.J. 1986. Detection of double - stranded RNA by immunoblot electrophoresis. **J. Virol. Methods** **13(4)**:279-283.

- GHABRIAL, S.A. 1980. Effects of fungal viruses on their hosts. **Annual Review of Phytopathology** 18: 441-461.
- GHABRIAL, S.A.; HAVENS, W. M. 1992. The *Helminthosporium victoriae* 190s mycovirus has two forms distinguishable by capsid protein composition and phosphorylation state. **Virology** 188(2):657-665.
- GILLINGS, M.R.; TESORIERO, L.A.; GUNN, L.V. 1993. Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pytium irregulare*. **Plant Pathology** 42:6-15).
- GRENTE, J.; SAURET, S. 1969a. L' hypovirulence exclusive phenomene original in pathologie vegetal. **C.R. Hebd Seances Acad. Sci. (France) Ser. D.** 268: 3347-3350.
- GRENTE, J.; SAURET, S. 1969b. L' hypovirulence exclusive" est-elle contrôlée par des determinants cytoplasmiques? **C.R. Hebd Seances Acad. Sci. (France) Ser. D.** 268: 3173-3176.
- GROVES, D. P.; CLARE, J. J.; OLIVER, S. G. 1983. Isolation and characterization of a double-stranded RNA virus-like particles from the yeast *Yarrowia lipolitica*. **Curr. Genet.** 7(3):185-190.
- GUBLER, U.; HOFFMAN, B. J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. **Gene** 25:263-269.
- HAMMAR, S.; FULBRIGHT, D. W.; ADAMS, G. C. 1989. Association of double - stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology** 79(5): 568-572.
- HANNIG, E. M.; WILLIAMS, T. L.; LEIBOWITZ, M. J. 1986. The internal polyadenylate tract of yeast killer virus M 1 double-stranded RNA is variable in length. **Virology** 152(1): 149-158.
- HANSEN, D. R.; VAN ALFEN, N. K.; GILLIES, K.; POWELL, N. A. 1985. Naked dsRNA associated with hypovirulence of *Endothia parasitica* is packaged in fungal vesicles. **J. Gen. Virol.** 66:2605-2614.
- HARMSSEN, M. C.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; WESSELS, J. G. H. 1989. Molecular analysis of *Agaricus bisporus* double-stranded RNA. **J. Gen. Virol.** 70(6):1613-1616.
- HARMSSEN, M. C.; TOLNER, B.; KRAM, A.; GO, S. J.; DE-HAAN, A.; WESSELS, J. G. H. 1991. Sequences of tree dsRNAs associated with La France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). **Current Genetics** 20(1-2):137-144.

- HAWKSWORTH, D.L.; SUTTON, B.C.; AINSWORTH, G.C. 1983. **Dictionary of the fungi**. 7. ed. Kew, Commonwealth, Mycological Institute, 445 p.
- HILLMAN, B. I.; TIAN, Y.; BEDKER, P. J.; BROWN, M. P. 1992. A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. **J. Gen. Virol.** **73**: 681-686.
- HILLMAN, B. I.; HALPERN, B. T.; BROWN, M. P. 1994. A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. **Virology** **201(2)**:241-250.
- HILLMAN, B. I., FULBRIGHT, D. W., NUSS, D. L.; VAN ALFEN, N. K. 1995. Hypoviridae. In: MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAUO, M. A.; SUMMERS, M. D. (ed.). **Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee for the Taxonomy of viruses.** (Archives of Virology. Supplementa, Supplement 10) Springer-Verlag Wien New York. 586 pp.
- HIREMATH, S.; L'HOSTIS, B.; GHABRIAL, S. A.; RHOADS, R. E. 1986. Terminal structure of hypovirulence-associated dsRNA in the chestnut blight fungus *Endothia parasitica*. **Nucleic Acids Res.** **14(24)**:9877-9896.
- HOLLAND, J.; SPINDLER, K.; HORODYSKI, F.; GRABAU, E.; NICOL, S.; VAN DE POL, S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. **Science** **215**:1577-1585.
- HOLLINGS, M. 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushrooms. **Nature** **196**: 962-965.
- HOLLINGS, M. 1979. Taxonomy of fungal viruses. In: MOLITORIS, H. P., HOLLINGS, M., WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses**. Springer - Verlag. Berlin, Heilelberg, NY. p. 165-175.
- HUAN, B.; SHEN, Y.; BRUENN, J. A. 1991. In vivo mapping of a sequence required for interference with the yeast killer virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**:1271-1275.
- HUXHAM, I. M., SAMUELS, K. D. L.; HEALE, J. B.; McCORKINDALE, N. J. 1989. In vivo and in vitro assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. **Journal of Invertebrate Pathology** **53**: 143-151.

- ICHO, T.; WICKNER, R. B. 1989. The double stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. **J. Biol. Chem.** **264(12)**:6716-6723.
- IKEGAMI, M.; FRANCKI, R.I.B. 1973. Presence of antibodies to double-stranded RNA in sera of rabbits immunized with rice dwarf and maize rough dwarf viruses. **Virology** **56**: 404-406.
- IKEGAMI, M.; FRANCKI, R.I.B. 1977. Antigenic variation among double-stranded RNAs from viruses and a synthetic polyribonucleotide. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** **43**: 59
- JACKWOOD, D.J.; KIBENGE, F.S.B.; MERCADO, C.C. 1990. The use of biotin-labeled complementary DNA probes for the detection of infectious bursal disease viruses. **Avian Diseases** **34(1)**: 129-136.
- KIBENGE, F.S.B. 1992. Differ detection of infectious bursal disease virus serotypes, using cDNA probes to VP2 coding region. **Am. J. Vet. Res.** **53(8)**: 1337-1342.
- KIM, J. W.; BOZARTH. R. F. 1985. Intergeneric occurrence of related fungal viruses: the *Aspergillus ochraceous* virus complex and its relationship to the *Penicillium stoloniferum* virus S. **J. Gen. Virol.** **66(9)**: 1991-2002.
- KINSEY, J. A.; HELBER, J. 1989. Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 1929-1933.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E. D.; WU, R.; and SANFORD, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature** **327**:70-73.
- KOENIG, R.; GIVORD, L. 1974. Serological interrelationships in the turnip yellow mosaic virus group. **Virology** **58**: 119-125.
- KOENIG, R.; LESEMANN, D.E. 1980. Two isometric viruses in poinsettias. **Plant Disease** **64**: 782-784.
- KOENIG, R.; GIBBS, A. 1986. Serological relationships among tombusviruses. **J. Gen. Virol.** **67**: 75-82.
- KOONIN, E. V. 1992. Evolution of double - stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive - stranded RNA viruses. **Semin. Virol.** **3(5)**:327-339.

- KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V. 1993. Evolution and taxonomy of positive -stran RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. **CRC. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** **28(5)**:375-430.
- KUCERA, M. 1980. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleri mellonella* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology** **35**: 304-310.
- KUTAITE, E.; CITAVICIUS, D.; GOLEBEV, W.; TIKHOMIROVA, L. 1990. Isolation and characterization of virus-like particles from killer strains *Sporidiobolus salmonicolor* Fell et Tallman 1981. **Eksperimentine Biologija** **0(3)**:3-9.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the level of bacteriophage T4. **Nature (London)** **227**:680-684.
- LAI, H. C.; ZACHARIAH, K. 1975. Detection of virus-like particles in coremia of *Penicillium claviforme*. **Can. J. Genet. Cytol.** **17**: 525-533.
- LEAL, S.C.M., BERTIOLI, D.J.; BALL, B.V.; BUTT, T.M. 1994. Presence of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metharhizium anisopliae*. **Biocontrol Sc. Tech.** **4**:89-94.
- LECOQ, H.; BOISSONNET - MENES, M.; DELHOTAL, P. 1979. Infectivity and transmission of fungal viruses. 1979. In: MOLITORIS, H. P., HOLLINGS, M., WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses**. Springer - Verlag, Berlin, Heilelberg, NY. p. 34-47.
- LEE, M.; PIETRAS, D. F.; NEMEROFF, M. E.; CORSTANJE, B. J.; FIELD, L. J.; BRUENN, L. A. 1986. Conserved regions in defective interfering viral double-stranded RNAs from a yeast virus. **J. Virol.** **58(2)**:402-407.
- LEIBOWITZ, M. J.; HUSSAIN, I.; WILLIAMS, T.L. 1988. Transcription and translation of the yeast killer virus genome. In: KOLTIN, Y.; LEIBOWITZ, M. J. (eds.). **Viruses of fungi and simple eukaryotes**. Dekker, New York. p. 117-132.
- LEMKE, P. A. 1977. Double - stranded RNA viruses among filamentous fungi. In: SCHLESSINGER, D. (ed.). **Microbiology**. Am. Soc. Microbiol., Washington DC, p. 568-570.
- LHOAS, P. 1971. Infection of protoplasts from *Penicillium stoloniferum* with ds-RNA viruses. **J. Gen. Virol.** **13**:365-367.
- LINDBERG, G. D. 1960. Reduction in pathogenicity and toxin production in diseased *Helminthosporium victoriae*. **Phytopathology** **50**:457-460.

- LISA, V.; LUISONI, E.; MILNE, R.G. 1981. A possible virus cryptic in carnation. **Ann. Appl. Biol.** **98**: 431-437.
- LISTER, R. M. 1979. Serological screening for fungal viruses. In: MOLITORIS, H.P.; HOLLINGS, M.; WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses**. Springer-Verlag. Berlin, Heilelberg, NY. p. 150-164.
- LIU, H. D.; LIANG, P. Y. 1985. Intracellular appearance, morphological feature and properties of *Aspergillus niger* virus. **Acta Microbiol. Sinica** **25(2)**: 108-114.
- LIU, H. D.; LIANG, P. Y. 1989. Virus of *Aspergillus niger* and the production of glucoamylase. **Acta Microbiol. Sinica** **29(4)**:258-264.
- LIUSHITS, M. A.; AMOSOVA, O. A.; LYUBCHENKO, Y. L. 1990. Flexibility difference between double-stranded RNA and DNA as revealed by gel electrophoresis. **J. Biomolecular Structure & Dynamics** **7(6)**:1237-1250.
- LUISONI, E.; MILNE, R.G.; ACCOTTO, G.P.; BOCCARDO, G. 1987. Cryptic viruses in hop trefoil (*Medicago lupulina*) and their relationships to other cryptic viruses in legumes. **Intervirology** **28**: 144-156.
- LUKACS, N. 1994. Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA. **J. Virol. Methods** **47(3)**:255-272.
- MARTIN, R. M.; VAN - ALFEN, N. K. 1991. The movement of viral - like RNA between colonies of *Cryphonectria parasitica*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** **4(5)**:507-511.
- MATTHEWS, R. E. F. 1957. **Plant Virus Serology**. Cambridge University Press, 128 p.
- MATTHEWS, R. E. F. 1991. **Plant virology**. Academic Press, Inc. , London. 835 p.
- MESKAUSKAS, A.; CITAVICIUS, D. 1992. The K2 - type killer toxin -and immunity- encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. **Gene (Amsterdam)** **111(1)**: 135-139.
- MESSIAS, C. L. 1979. **Parasexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin**. Tese de Doutorado, Esalq, Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J. L. 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Can. J. Genet. Cytol.** **22**:309-314.

- MILNE, R. G.; LUISONI, E. 1988. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: MARAMOROSH, K., KOPROWSKI, H. (eds) **Methods in Virology**, vol VI. Academic Press, New York, San Francisco, London, pp 265-281.
- MOLLITORIS, H. P.; HOLLINGS, M.; WOOD, H. A. 1979. Preface. In: MOLITORIS, H. P., HOLLINGS, M., WOOD, H. A. (eds.). **Fungal viruses**. Springer - Verlag, Berlin, Heilelberg, NY. p. V-VII .
- MOR, H.; STEINLAUF, R.; BARASH, I. 1984. Virus - like particles and double - stranded RNA in *Geotrichum candidum*, the causal agent of citrus sour rot. **Phytopathology** **74(8)**: 921-924.
- MORRIS, T.J.; DODDS, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. **Phytopath.** **69**:854-858.
- MORTEN, K. J.; HICKS, R. G. T. 1992. Changes in double-stranded RNA profiles in *Agaricus bisporus* during subculture. **FEMS Microbiology Letters** **91(2)**: 159-163.
- NATSUAKI, T.; NATSUAKI, K.T.; OKUDA, S.; TERANAKA, M.; MILNE, R.G.; BOCCARDO, G.; LUISONI, E. 1986. Relationships between the cryptic and temperate viruses of alfalfa, beet and white clover. **Intervirolgy** **25**: 69-75.
- NEWTON, A. C. 1987. Ocurrance of double-stranded RNA and virus-like particles in *Septoria nodorum*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **88(1)**: 113-116.
- NOGAWA, M.; SHIMOSAKA, M.; KAGEYAMA, T.; OKAZAKI, M. 1993. A double stranded RNA mycovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *robiniae*. **FEMS Microbiology Letters** **110(2)**:153-157.
- NOSEK, J.; FILIPP, D.; BEDERKOVA, K.; GRIAC, P. 1993. Isolation of a dsRNA virus from *Dipodascus (Endomyces) magnusii*. **Curr. Genet.** **23(3)**: 219-222.
- NUSS, D. L. 1992. Biological control of Chestnut blight: an example of virus mediated attenuation of fungal pathogenesis. **Microbiological Reviews** **56(4)**:561-576.
- NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. 1990. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** **28**:37-58.
- OLIVEIRA LIMA, A.; DIAS DA SILVA, W, 1970. **Imunologia Imunopatologia Alergia - Métodos**. Guanabara Koogan S.A. Ed. 673p.

- ORBACH, M. J., PORRO, E. B.; YANOFSKY, C. 1986. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. **Mol. Cell. Biol.** **6(7)**: 2452-2461.
- OUCHTERLONY, O. 1958. Diffusion - in - gel methods for immunological analysis. **Prog. Allergy** **5**:1.
- PALLET, I. H. 1972. Production and regeneration of protoplasts from various fungi and their infection with fungal viruses. Abst 3rd Symp Yeast Protoplasts, Salamanca, Spain, p, 78.
- PAUL, C. P.; FULBRIGHT, D. W. 1988. Double-stranded RNA molecules from Michigan hypovirulent isolates of *Endothia parasitica* vary in size and sequences homology. **Phytopathol.** **78**: 751-755.
- PEREIRA, H.G. 1991. Double - stranded RNA viruses. **Sem. Virol.** **2**:39-53.
- PFEIFFER, I.; KUCSERA, J.; FERENCZY, L. 1994. Identification of double stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma* strains. **Fungal Genetics Newsletter** **41(A)**:82.
- PINTO JR., H. 1994. **Genes envolvidos no metabolismo de radicais superóxido no fungo entomopatogênico *Metharhizium anisopliae*.** Dissertação de Mestrado. 94p. Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Brasil.
- POLASHOK, J. J.; HILLMAN, B. J. 1994. A small mitochondrial dsRNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**:8680-8684.
- POSPISEK, M.; PALKOVA, Z.; JANDEROVA, B.; KORB, J. 1994. Isolation and characterization of the dsRNA virus from the yeast *Endomyces magnusii*. **FEMS Microbiology Letters** **116(2)**:231-236.
- POWELL, W. A.; VAN-ALFEN, N. K. 1987. Two nonhomologous viruses of *Cryphonectria (Endothia) parasitica* reduce accumulation of specific virulence - associated polypeptides. **J. Bacteriol.** **169(11)**:5324-5326.
- RADLER, F.; HERZBERGER, S.; SCHOENIG, L.; SCHAWARZ, P. 1993. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. **J. Gen. Microbiol.** **139(3)**:495-500.

- RASMUSSEN, J. L.; KIKKERT, J. R.; ROY, M. K.; SANFORD, J. C. 1994. Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. **Plant Cell Reports** 13:212-217.
- RATTI, G.; BUCK, K. W. 1972. Virus particles in *Aspergillus foetidus*: a multicomponent system. **J. Gen. Virol.** 14:165-175.
- RATTI, G.; BUCK, K. W. 1978. Semiconservative transcription in particles of a double-stranded RNA mycovirus. **Nucleic Acids Res.** 5: 3843-3854.
- REILLY, J. D.; BRUENN, J., HELD, W. 1984. The capsid polypeptides of the yeast viruses. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 121(2): 619-625.
- RICHARDS, O. C.; HEY, T. D.; EHRENFELD, E. 1987. Poliovirus snapback double-stranded RNA isolated from infected HeLa cells is deficient in poly(A). **J. Virol.** 61(7): 2307-2310.
- RIDLEY, S. P.; WICKNER, R. B. 1983. Defective interference in the killer system of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Virol.** 45(2):800-812.
- ROBERTS, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: BURGESS, A.D. **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London, Academic Press. p.441-464.
- ROMAINE, C. P.; SCHLGNHAUFER, B.; GOODIN, M. M. 1994. Vessicle-associated double-stranded ribonucleic acid genetic elements in *Agaricus bisporus*. **Curr. Genet.** 25(4):128-134.
- ROOPER, J. A. 1985. Recombinação em Fungos Filamentosos. In: AZEVEDO, J. L., coord. **Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética**. Piracicaba, Fealq, cap. 4, p.29-33.
- ROSATO, Y. B., MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 38:1-3.
- RUSSELL, P.J.; HAMBIDGE, S.J.; KIRKEGAARD, K. 1991. Direct introduction and transient expression of capped and non-capped RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.** 19: 4949-53.
- RYTTER, J. L.; ROYSE, D.J.; ROMAINE, C. P. 1991. Incidence and diversity of double-stranded RNA in *Lentinula edodes*. **Mycologia** 83(4):506-510.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbour, 3 V.

- SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. 1987. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Part. Sci. Techn.** 5: 27-37.
- SCHAFFER, H. E.; SEDEROFF, R. R. 1981. Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. **Analytical Biochemistry** 115:113-122.
- SCHMITT, M. J.; NEUHAUSEN, F. 1994. Killer toxin secreting double stranded RNA mycovirus in the yeast *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. **J. Virol.** 68(3):1765-1772.
- SCHRANK, A.; BASSANESI, M. C.; PINTO JR, H.; COSTA, S. V.; BOGO, M. R.; SILVA, M. S. N. 1993. Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metharhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura** 45:200-205.
- SEROUSSI, E.; PEERY, T.; GINZBERG, I.; KOLTIN, Y. 1989. Detection of killer-independent dsRNA plasmids in *Ustilago maydis* by a simple and rapid method of extraction of dsRNA. **Plasmid** 21:216-225.
- SHAPIRA, R.; CHOI, G. H.; NUSS, D. L. 1991a. Virus- like genetic organization and expresion strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. **EMBO J.** 10 (4):731-739.
- SHAPIRA, R.; CHOI, G. H.; HILLMAN, B. I.; NUSS, D. L. 1991b. The contribution of defective RNAs to the complexity of viral- encoded double-stranded RNA populations present in hypovirulent strains of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **EMBO J.** 10(4):741-746.
- SHATKIN, A. J.; SIPE, J. D.; LOH, P. 1968. Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Virol.** 2:986-991.
- SHEPHERD, H.S. 1990. Characterization and localization of a virus-like particle in a *Drechslera* sp. **Experimental Mycology** 14(3):294-298.
- SILVA, M. S. N.; SCHRANK, A. 1994. Cloning of the *TRP* gene coding for PRAI activity from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. XXIII Reunião Anual da SBBq e BM. Caxambu. Brasil.
- SMITHSON, S.L.; PATERSON, I.C.; BAILEY, A.M.; SCREEN, S.E.; HUNT, B.A.; COBB, B.D.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M. 1995. Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene** 166:161-165.

- SOMERS, J. M. 1973. Isolation of suppressive mutants form killer and neutral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** **74**: 571-579.
- SOMMER, S. S.; WICKNER, R. B. 1982a. Co-curing of plasmids affecting killer double-stranded RNAs of *Sacharomyces cerevisiae*: [HOK], [NEX], and the abundance of L are related and further evidence that M1 requires L. **J. Bacteriol** **150(2)**:545-551.
- SOMMER, S. S.; WICKNER, R. B. 1982b. Yeast L dsRNA consist of at least three distinct RNAs; evidence that the non-mendelian genes [HOX], [NEX] and [EXL] are on the these dsRNA. **Cell** **31**:429-441.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **98**: 503-517.
- STANWAY, C. A.; BUCK, K. W. 1984. Infection of protoplasts of the wheat take-all fungus, *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*, with double-stranded RNA viruses. **J. Gen. Virol.** **65(11)**:2061-2065.
- ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R. M. 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology** **48**: 85-95.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A.K. 1986b. Cuticle-degradating enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal of General Microbiology** **132**:1509-1517.
- ST LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. 1988a. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **J. Invert. Pathol.** **52**:285-293
- ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. 1988b. Regulation of production of enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology** **150**:423-416.
- ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. 1989. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading proteases during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology** **13**:253-262.
- ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. 1990. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology** **136**:1779-1789.

- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. 1991a. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 58:415-426.
- ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. 1991b. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 57:299-310.
- ST. LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. 1992a. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading- protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Biochem.** 204:991-1001
- ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. 1992b. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene** 120:119-124.
- ST. LEGER, R.J.; FRANK, D.C.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. 1992c. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry** 204: 991-1001.
- ST. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. 1994. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 313(1): 1-7.
- ST. LEGER, R. J.; SHIMIZU, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D.W. 1995. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. **FEMS Microbiol. Lett.** 131: 289-294.
- ST. LEGER, R.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93:6349-6354.
- TARTAGLIA, J.; PAUL, C.P.; FULBRIGHT, D. W.; NUSS, D.L. 1986. Structural properties of double - stranded RNAs associated with biological control of chestnut blight fungus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83:9109-9113.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. **Analytical Biochemistry** 132:14-19.

- TAVANTZIS, S. M.; BANDY, B. P. 1988. Properties of a mycovirus from *Rhizoctonia solani* and its virion-associated RNA polymerase. **J. Gen. Virol** 69(7): 1465-1477.
- THIELE, D.J., HANNING, E. M.; LEIBOWITZ, M. J. 1984. Genome structure and expression of a defective interfering mutant of the killer virus yeast. **Virology** 137(1):20-31.
- TINLINE, R. D. 1971. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. **Mycologia** 63:713-721.
- TINLINE, R.D.; NOVIELLO, C. 1971. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia** 63: 701-712.
- TRENTON, B.Y.; LE-DALL, M.T.; HESLOT, H. 1987. UV-induced curing of the double-stranded RNA virus of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Curr. Genet.** 12(1):37-39.
- TRINCI, A.P.J. 1971. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. **J. Gen. Microbiol.** 67:325.
- UEMURA, H.; WICKNER, R. B. 1988. Suppression of the chromosomal mutations affecting M1 virus replication in *Saccharomyces cerevisiae* by a variant of a viral RNA segment (L-A) that encodes coat protein. **Mol. Cell. Biol.** 8(2):938-944.
- UYEDA, I.; LEE, S. Y.; LENG, G. W.; AO, G. M.; DENG, Z.P.; LIANG, X. S.; OHSIMA, K.; SHIKATA, E. 1990. Size of double-stranded RNA genome segments of rice dwarf and rice ragged stunt viruses determined by electron microscopy. **J. Electron Microscopy** 39(1):54-58.
- VÁGVÖLGYI, CA.; VARGA, J.; FERENCZY, L. 1993. Detection of double-stranded RNA in *Mucor ramannianus*. **Fungal Genetics Newsletter** N°40:79.
- VALVERDE, R. A. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease** 74(3): 255-258.
- VAN ETTEN, J. L.; BURBANK, D. E.; CUPPELS, D. A.; LANE, L. C.; VIDAVER, A.K. 1980. Semiconservative synthesis of single-stranded RNA by bacteriophage phi 6 RNA polymerase. **J. Virol.** 33:769-773.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1982. **Serology and Immunochemistry of Plant Viruses**. Academic Press, Inc. New York. 302 p.

- VAN SLOGTEREN, D.H.M. 1955. Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil. VIII Proc. Conf. Potato Virus Diseases. 2nd, 1954, pp. 51-54. Veenman and Zonen, Wageningen.
- VARGA, J.; KEVEL, F.; VAGVOLGYI, C.; VRIESEMA, A.; CROFT, J. H. 1994. Double stranded mycovirus in section Nigri of the *Aspergillus* genus. **Canadian J. Microb.** **40(4)**:325-329.
- VIEIRA, J.; MESSING, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp17-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene** **19**:259-268
- WEINSTEIN, L. A.; LEIBOWITZ, M. J. 1986. 5S RNA and tRNA-like molecules are associated with killer virus dsRNA of yeast. **J. Gen. Virol.** **67(1)**:191-195.
- WEINSTEIN, L. A.; CAPALDO - KIMBALL, F.; LEIBOWITZ, M. J. 1993. Genetics of heat-curability of killer virus of yeast. **Yeast** **9(4)**:411-418.
- WEISSOVA, K.; F. E.; CIKOVA, H.; TURNA, J. 1991. Double-stranded RNA from mitochondrial extract of *Penicillium chrysogenum*. **Biologia (Bratislava)** **46(12)**:1097-1102.
- WESELOSKI, M.; WICKNER, R. B. 1984. Two new double-stranded RNA molecules showing non-Mendelian inheritance and heat inducibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** **4**:181-187.
- WICKNER, R.B. 1992. Double stranded and simple stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Microbiol.** **46**: 347-375.
- WICKNER, R.B. 1993 Double-stranded RNA virus replication and packaging. **J. Biol. Chem.** **268**:3797-3800.
- WIDNER, W. R.; WICKNER, R. B. 1993. Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral messenger RNA. **Mol. Cell. Biol.** **13(7)**:4331-4341.
- WILLIAMS, J.; CECCARELLI, A.; SPURR, N. 1993. **Genetic Engineering**. Bios Scientific Publishers. READ, P.; BROWN, T. (Eds). Oxford, UK. Information Press.
- WOOD, H.A. 1973. Viruses with double-stranded RNA genomes. **J. Gen. Virol.** **20**: 61-85.

- WOOD, H. A.; BOZARTH, R. F. 1972. Properties of viruslike particles of *Penicillium chrysogenum*: one double- stranded RNA molecule per particle. **Virology** 47: 604-609.
- WOOD, H. A.; BOZARTH, R. F. 1973. Heterokarion transfer of viruslike particles associated with a cytoplasmically enherited determinant in *Ustilago maydis*. **Phytopathol.** 63: 1019-1021.
- WOOD, H. A.; BOZARTH, R. F.; MISLIVEC, P.B. 1971. Virus-like particles associated with an isolate of *Penicillium brevicompactum*. **Virology** 44: 592.
- WU, W. S.; CHANG, L.; CHEN, Y. M. 1989. Identification of the decline factors in *Rhizoctonia solani*. **Plant Protection Bulletin** 31(2):192-201.
- YAMADA, T.; SENO, M.; SHIRAISHI, T.; KATO, H.; AN, C.; YOSHIDA, T.; OKU, H. 1991. Isolation and characterization of double - stranded RNAs from the pea pathogen *Mycosphaerella pinodes*. **Plant and Cell Physiology** 32(1):65-72.
- ZELIKOVITCH, N.; EYAL, Z.; BEN-ZVI, B.; KOLTIN, Y. 1990. Double-stranded RNA mycoviruses in *Septoria tritici*. **Mycol. Res.** 94(5): 590-594.
- ZHANG, L.; CHURCHILL, A. C. L.; KAZMIERCZAK, P.; KIM, D. H.; VAN ALFEN, N. K. 1993. Hypovirulence- associated traits induced by a mycovirus of *Cryphonectria parasitica* are mimicked by targeted inactivation of a host gene. **Mol. Cell. Biol.** 13(12):7782-7792.

