

OCORRÊNCIA DE RNA FITA DUPLA (RNAfd) EM FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS¹

PATRÍCIA VIEIRA TIAGO² E MÁRCIA CRISTINA FURLANETO³

RESUMO - Elementos de RNA fita dupla (RNAfd) estão presentes em 30% dos fungos, embora seus efeitos na célula hospedeira sejam pouco conhecidos. A maioria dos estudos de RNAfd em fungos têm se baseado em espécies fitopatogênicas, nas quais a presença destes elementos têm sido associada a hipovirulência. Até o momento, a presença de partículas de RNAfd foi relatada para poucas espécies de fungos entomopatogênicos, incluindo *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (= *Metarhizium flavoviride*) e *Paecilomyces fumosoroseus*. Linhagens isogênicas (com e sem RNAfd) de algumas destas espécies têm sido empregadas na tentativa de correlacionar a presença destas partículas com características fenotípicas e virulência.

Termos para indexação: RNA fita dupla, Micovírus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus*.

OCCURRENCE OF DOUBLE STRANDED RNA (RNAfd) IN ENTOMOPATOGENICS FUNGS

ABSTRACT - Double-stranded RNA (dsRNA) are present in about 30% of all fungus, although the effects of dsRNA elements in hosts are not know. Effects of dsRNA on fungal pathogenicity have been studied mainly in plant pathogenic species, and their hypovirulence to hosts is well documented. In the case of entomopathogenic fungi, the presence of dsRNA elements have been described in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (= *Metarhizium flavoviride*), *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. Isogenic strains (one with dsRNA and one without) of these fungus have been investigated for association of phenotypic parameters and virulence.

Index Terms: Double-stranded RNA, Mycovirus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus*.

Aceito para publicação em 21/10/2002.

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

² Profa. M.Sc., Depto. de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso,

Rodovia MT Km 07, C.P. 287, CEP 78300-000, Jardim Aeroporto, Tangará da Serra - MT. E-mail: patiago@unemat.br

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

Micovírus

Micovírus, vírus com genoma de RNA fita dupla (RNAfd), são capazes de infectar uma gama variada de organismos, incluindo os fungos filamentosos. Três famílias de vírus de RNAfd, que infectam fungos, têm sido identificadas: a Hypoviridae que inclui vírus que carecem de capsídio protéico, a Totiviridae na qual estão presentes os vírus com genoma não segmentado e a Partitiviridae que inclui vírus com genoma bisegmentado (Gênero Partivirus) e aqueles com três segmentos (Gênero Chrysovirus) (Murphy citado por Batten et al., 2000). Segundo Moore-Landecker (1996) muitos dos vírus de RNAfd que possuem genoma segmentado podem conter parte de seu genoma em diferentes partículas. Tipicamente de duas a cinco partículas são necessárias para conter o genoma completo.

Micovírus são frequentemente encontrados infectando vários gêneros de fungos (Frazzon et al., 2000). A maioria dessas infecções é latente, porém em alguns casos a presença destas partículas pode interferir no fenótipo do hospedeiro. O estudo dos efeitos de RNAfd em fungos têm se concentrado em espécies fitopatogênicas, nos quais a presença destes elementos têm sido associada a hipovirulência em seus hospedeiros.

Os micovírus são regularmente transmitidos através do contato citoplasmático pela fusão de hifas. Partículas virais podem, também, ser transmitidas para os esporos durante o desenvolvimento do fungo, mas, aparentemente não podem infectar através da parede celular intacta. Segundo Moore-Landecker (1996), os estudos de infecciosidade viral são difíceis de serem realizados devido às dificuldades no isolamento, purificação e transmissão de micovírus para linhagens testes. Segundo Buck citado por Silva et al. (2000), os micovírus não têm a habilidade de lisar as células do hospedeiro sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático. Este modo de transmissão pode refletir numa gama limitada de hospedeiros, já que os fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Este sistema de incompatibilidade vegetativa limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas (McCabe et al., 1999).

Presença de RNAfd em fungos entomopatogênicos

Schrank et al. (1992), foram os primeiros a detectar partículas semelhantes a vírus em isolados de *Metarhizium anisopliae*. Bogo et al. (1996) confirmaram a presença de bandas correspondentes a RNAfd em três dos sete isolados de *M. anisopliae* analisados através de

eletroforese em gel de agarose. Partículas purificadas de um dos isolados foram analisadas por microscopia eletrônica, observando-se capsídios com aproximadamente 35nm, e por SDS-PAGE, foi identificada uma proteína de 46kDa. O padrão de RNAfd foi verificado tanto em micélio quanto em conídio, confirmando a presença dos micovírus durante o desenvolvimento do fungo.

Melzer & Bidochka (1998) verificaram, através de eletroforese em gel de agarose, a presença de partículas de RNAfd em alguns isolados de *M. anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana*, observando padrões distintos de bandas entre alguns isolados e espécies analisadas. Isolados de *M. anisopliae* que continham RNAfd e alguns livres destas partículas foram testados quanto a variações fenotípicas (taxa de crescimento e produção de conidiósporo) e virulência a *Gryllus domesticus*, não sendo observada nenhuma correlação destes parâmetros com presença ou ausência de RNAfd. No entanto, a comparação entre duas linhagens isogênicas (com e sem RNAfd) revelou um aumento significativo, para a linhagem livre de RNAfd, na taxa de crescimento, produção de conidiósporo e virulência.

Bidochka et al. (2000) analisaram vários isolados de *M. anisopliae* que possuíam mesmo padrão de bandas após separação eletroforética e observaram por meio da análise de Northern blot, que os RNAfd nem sempre eram homólogos. Estes autores também observaram, por padrões de bandas de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e compatibilidade vegetativa, que os RNAfd homólogos ocorreram preferencialmente em fungos geneticamente relacionados.

Martins et al. (1999) detectaram bandas de RNAfd em cinco dos sete isolados analisados de *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviride*). Linhagens isogênicas (com e sem RNAfd) do isolado CG442 foram obtidas através da transferência de fragmentos de RNAfd, a partir do isolado CG291, via anastomose de hifas. Colônias CG442 foram selecionadas do heterocário baseando-se em sua marca auxotrófica (*met*) e sua isogenia com a linhagem parental foi confirmada utilizando-se marcadores de RAPD. As linhagens isogênicas foram submetidas a testes de virulência contra o gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides*, não sendo observadas diferenças significativas entre estas linhagens quanto à virulência.

Azevedo et al. (2000) detectaram bandas de RNAfd em três dos doze isolados de *Paecilomyces fumosoroseus* analisados. Linhagens isogênicas do isolado Pf92 foram obtidas por cura dos fragmentos de RNAfd através da obtenção de colônias monospóricas. Tais

linhagens foram submetidas a testes de virulência contra a mosca branca *Bemisia tabaci* biotipo B. A presença de RNAfd não causou hipovirulência em *P. fumosoroseus*, semelhante ao observado para *M. anisopliae* var. *acridum* (Martins et al., 1999).

A maioria dos trabalhos, envolvendo fungos entomopatogênicos, relatam a presença de partículas de RNAfd e o possível efeito destas no fenótipo do hospedeiro incluindo taxa de crescimento, produção de conídios e virulência a insetos. Frazzon et al. (2000) analisaram a produção de proteases e quitinases a partir do sobrenadante de cultivo de isolados distintos de *M. anisopliae* (com e sem RNAfd). Segundo estes autores, os isolados infectados por micovírus secretaram menor quantidade destas enzimas. Estudos quanto uma possível correlação entre a presença ou ausência de RNAfd e a expressão de fatores de virulência, como proteases degradadoras de cutícula, foram realizados por Tiago et al. (2002). Linhagens isogênicas de *M. anisopliae* var. *acridum* e *P. fumosoroseus* foram analisadas, não sendo observada nenhuma correlação entre a presença ou ausência de RNAfd e produção de proteases degradadoras de cutícula.

Os micovírus geralmente não têm efeito aparente em seus hospedeiros e parecem ser avirulentos, assim, células saudáveis podem conter um grande número de partículas virais. Segundo Still citado por Moore-Landecker (1996), esta avirulência pode ser em função do tempo de replicação do vírus, ou seja, a síntese de RNAfd e vírion ocorre após a fase log de crescimento do fungo, na qual a síntese de macromoléculas está declinada.

Os estudos realizados até o momento sugerem que estes elementos RNAfd em fungos entomopatogênicos podem estar latentes ou não têm participação na expressão das características analisadas, já que não foram observadas associação de alterações fenotípicas com sua presença. Portanto, o significado biológico destes elementos ainda permanece questionável.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, A.C.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.1, p.61-63, 2000.

- BATTEN, J.S.; SCHOLTHOF, K.G.; MILLER, M.E.; MARTYN, R.D. cDNA probes for detection of specific dsRNA from the fungal pathogen, *Monosporascus cannonballus*. **Journal of Virological Methods**, v.84, p.209-215, 2000.
- BIDOCHKA, M. J.; MELZER, M.J.; LAVENDER, T.M.; KAMP, A.M. Genetically related isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* harbour homologous dsRNA viruses. **Mycological Research**, v.104, n.9, p.1094-1097, 2000.
- BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; GIMÉNEZ, M.P.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, v.100, n.12, p.1468-1472, 1996.
- FRAZZON, A.P.G.; VAZ JUNIOR, I.S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.117-125, 2000.
- MARTINS, M.K.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Double-strand RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Currents Genetics**, v.36, n.1-2, p.94-97, 1999.
- McCABE, P.M.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N.K. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends Microbiology**, v.7, n.9, p.377-381, 1999.
- MELZER, M.J.; BIDOCHKA, M.J. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**, v.90, n.4, p.586-594, 1998.
- MOORE-LANDECKER, E. Fungi in pathological relationships of agricultural importance. In: —. **Fundamentals of the fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. p.404-452.
- SCHRANK, A.; BOGO, M.R.; OLIVEIRA, D.; AZEVEDO, J.L. Mycoviruses infecting isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In: First European Conference on Fungal Genetics. University of Nottingham, Nottingham (**Abstract**), 1992. p.32.
- SILVA, V.N.; PIRES, M.F.C.; CORREA, B. Fungal viruses. **Virus**, v.5, n.1, p.7-13, 2000.

TIAGO, P.V.; DIAS, B.A.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P.; FURLANETO, M.C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production and virulence. In: Reunião de Genética de Microrganismos, 23, Pirenópolis, 2002. **Anais**. Pirenópolis: [s.n.], 2002. p.92.

★★★★★