

DOUGLAS HERRERA MONTENEGRO

INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RNA DUPLA FITA EM
Phyllosticta spinarum* E *Guignardia citricarpa

Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Genética como requisito
parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa
Kava-Cordeiro

CURITIBA

2007

DOUGLAS HERRERA MONTENEGRO

INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RNA DUPLA FITA EM
Phyllosticta spinarum* E *Guignardia citricarpa

Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Genética como requisito
parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa
Kava-Cordeiro

CURITIBA

2007

“Tudo que os homens conseguem imaginar é uma possibilidade na realidade.”

Willy Karen

Aos meus pais

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos as pessoas que tornaram possível e incentivaram a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Diogenes D. Montenegro Filho e Tânia Mara Herrera Montenegro, que proporcionaram meus estudos e me deram a oportunidade para eu chegar aqui.

Ao meu irmão, Guilherme H. Montenegro, pela “compreensão”.

A toda minha família pelo apoio e incentivo e, por algumas vezes, me darem aquele “empurrãozinho” necessário para eu prosseguir.

Aos meus amigos Betina, Cris, Dani, Daniel, Dilza, Eduardo, Fábio, Fer, Fernando, Jéferson, Lu, Mariah, Pri e Shu por fazerem esses 4 anos passarem num piscar de olhos.

À Lili, por ter aparecido na minha vida no momento certo.

Aos meus colegas de laboratório, Carol, Danny, Eduardo, Fer, Jociney, Josiane, Juliana, Larice, Lis, Lucinir, Maysa, Renata, Rosana e Tati pela ótima convivência e amizade.

À professora Patrícia, pela amizade dentro e fora da sala de aula.

Ao professor Karam, pelas lições de vida ensinadas nas suas aulas.

Às professoras Chirlei e Lygia por ajudarem a fazer o LabGeM funcionar e pela amizade.

À professora Vanessa, pela orientação, incentivo, amizade e ótima convivência durante todo o tempo levado para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
RESUMO	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FITOPATOGÊNICOS.....	4
3.2 OS GÊNEROS <i>Guignardia</i> E <i>Phyllosticta</i>	6
3.3 MANCHA PRETA DE CITROS.....	8
3.4 RNA DUPLA FITA.....	9
3.5 CURA DO RNA DUPLA FITA EM FUNGOS.....	13
3.6 MARCADORES MOLECULARES.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 LINHAGENS UTILIZADAS.....	17
4.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	17
4.2.1 Meio Completo	17
4.2.2. Solução de Vitaminas.....	18
4.2.3 Clorofane.....	18
4.2.4 Clorofil.....	18
4.2.5 Fenol.....	19
4.2.6 Solução de brometo de etídio.....	19
4.2.7 Solução de ciclohexamida.....	19
4.2.8 Solução salina.....	19
4.2.9 Tampão de corrida (“gel loading buffer”).....	20
4.2.10 Tampão de extração de DNA.....	20
4.2.11 Tampão TE.....	20
4.2.12 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (solução estoque).....	20
4.2.13 Tampão TBE 5x (solução estoque).....	20
4.2.14 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (solução estoque).....	21
4.3 PROTOCOLOS.....	21

4.3.1 Esterilização.....	21
4.3.2 Extração de ácidos nucléicos totais.....	21
4.3.3 Eletroforese.....	22
4.3.4 Cura do RNAdf.....	23
4.3.5 RAPD.....	23
4.3.6 Dendrograma	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Caracterização do RNAdf.....	25
5.2 Cura do RNAdf por ciclohexamida.....	26
5.3 Cura do RNAdf por temperatura moderadamente elevada.....	26
5.4 RAPD das linhagens originais e curadas.....	30
6. CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA	1- HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS.	17
FIGURA	1- ACIDOS NUCLEICOS TOTAIS DE LINHAGENS DE <i>P. spinarum</i> E <i>G. citricarpa</i>	25
FIGURA	2- MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE <i>P. spinarum</i> , APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO A 37°C.	27
FIGURA	3- MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR8 DE <i>P. spinarum</i> APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA ELEVADA	28
FIGURA	4- MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA ELEVADA	28
FIGURA	5- ÁCIDOS NUCLEICOS DA LINHAGEM ECPR8 COM SETORES “a”, “b” E “c”, E ECPR3 COM SETOR “a”.	29
FIGURA	6- FIGURA 6 – RAPD DAS LINHAGENS DE <i>P. spinarum</i>	30
FIGURA	7 DENDOGRAMA A PARTIR DO RAPD UTILIZANDO OS PRIMERS OPX11 E OPX14	31

RESUMO

Fungos são organismos que muitas vezes habitam os mais variados tecidos vegetais. Se há sintomas, os fungos são considerados fitopatogênicos. Se não, o fungo é endofítico. Os fungos utilizados neste trabalho foram isolados de plantas cítricas, como endofíticos (espécie *Phyllosticta spinarum*) ou causando a doença Mancha Preta de Citros (MPC) (espécie *Guignardia citricarpa*). Constatou-se que alguns isolados das espécies de *P. spinarum* e *G. citricarpa* apresentam RNA dupla fita (RNAdf) e os possíveis efeitos destes elementos na virulência ou outras alterações fenotípicas dos seus hospedeiros ainda são desconhecidos. Para entender estes efeitos, é necessária a obtenção de linhagens isogênicas, a mesma linhagem com e sem o RNAdf, pela cura destas partículas virais. Para isto, foram feitos experimentos de cura com linhagens das duas espécies infectadas com RNAdf envolvendo repiques sucessivos de pontas de hifas de colônias em tratamento com ciclohexamida e/ou temperatura moderadamente elevada (37°C). Constatou-se que as concentrações de ciclohexamida utilizadas que variaram de 100 µg/mL até 0,5 µg/mL inibiram o crescimento total dos fungos das duas espécies, enquanto que o tratamento à 37°C por duas gerações foi capaz de gerar alterações fenotípicas nas colônias de duas linhagens de *P. spinarum*, que levaram à formação de setores. Estes foram isolados e, após extração de ácidos nucléicos totais, foi confirmada a eliminação do RNAdf. Linhagens de *G. citricarpa* também foram submetidas a este tratamento e em uma colônia também houve alterações na morfologia, com a formação de setores. A confirmação da cura desta linhagem ainda está em andamento. Análises de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) foram feitas para comprovar a isogenia entre os setores formados (linhagens curadas) em *P. spinarum* e a linhagem original, com o RNAdf. Com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, não foi possível confirmar a isogenia das linhagens e seus setores curados, pois estas apresentaram padrões de bandas semelhantes, mas não idênticos, conforme o esperado em caso de isogenia. Novas extrações de ácidos nucléicos totais das linhagens originais e das curadas estão sendo feitas para serem utilizados nas próximas investigações do perfil de bandas por RAPD. Considerando que os setores curados tenham realmente uma mesma identidade biológica com a linhagem original, uma possível explicação para o observado é que eles, além de perderem RNAdf, também perderam outros elementos genéticos (mini-cromossomos) levando à um padrão de bandas diferente da linhagem com o RNAdf. Na literatura, estes elementos são descritos como não essenciais para a sobrevivência do fungo e são comuns em fungos fitopatogênicos, pois carregam genes responsáveis pelo processo de colonização das plantas.

1. INTRODUÇÃO

Todos os organismos estão interligados, numa conexão pouco ou muito intensa, dependendo do habitat e nicho ecológico que é específico a cada um deles. A interação entre os organismos é classificada de diferentes formas, dependendo principalmente se há prejuízo, benefício ou relação neutra entre eles. Fungos estão diretamente relacionados com espécies vegetais, podendo ser endofíticos ou fitopatogênicos, conforme seus efeitos na planta hospedeira.

No primeiro caso, o fungo vive assintomaticamente nos tecidos da planta por todo ou parte do seu ciclo de vida. Os fungos endofíticos são geralmente intercelulares e podem ser identificados por exame microscópico do tecido ou por isolamento em meios de cultura. Já os fungos fitopatogênicos são aqueles que causam algum dano à planta hospedeira. São identificados pela presença de sintomas da doença que causam ou, em casos onde ainda não há sintomas aparentes, pelos mesmos métodos usados para fungos endofíticos.

O gênero *Guignardia* comumente é encontrado como causador de doenças vegetais. A espécie *G. citricarpa* é responsável pela Mancha Preta dos Citros (MPC), uma doença importante no Brasil. A MPC vem causando prejuízo na exportação de frutas cítricas para o mercado internacional e também no mercado interno, pois as laranjas apresentam lesões escuras em suas cascas que não são atrativas para os consumidores. No entanto, o fungo não libera nenhuma toxina conhecida e não há malefícios em se ingerir a fruta ou o suco da fruta. Este mesmo gênero já foi isolado de plantas aparentemente saudáveis e assintomáticas. O gênero *Phyllosticta* geralmente corresponde à fase anamórfica de *Guignardia*, por não apresentar ciclo sexual.

A presença de RNA dupla fita (RNA_{df}) e partículas virais em fungos pode estar associada a diversas alterações fenotípicas nos hospedeiros. Muitos autores observaram alterações na virulência de fungos fitopatogênicos, geralmente hipovirulência em algumas espécies. O mesmo pode ocorrer com *G. citricarpa*, que pode ter sua patogenicidade modificada pela presença de RNA_{df}. Para a compreensão da real influência destes elementos nestas espécies, é necessário obter linhagens livres de RNA dupla fita (linhagens isogênicas) e assim comparar estas linhagens quanto às possíveis alterações morfológicas e também quanto à capacidade de colonização de seus

hospedeiros, e até mesmo alterações na patogenicidade da espécie *G. citricarpa*, responsável pela MPC.

2. OBJETIVOS

- Investigar e confirmar a presença de RNA dupla fita em diferentes isolados de *G. citricarpa* e *P. spinarum*
- Caracterizar os RNAdf por meio de eletroforese em gel de agarose
- Desenvolver um protocolo de cura para as linhagens com RNAdf
- Certificar a isogenia de linhagens curadas e infectadas com RNAdf por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD
- Avaliar possíveis conseqüências fenotípicas relacionadas à presença e ausência do RNAdf.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FITOPATOGÊNICOS

Microrganismos capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal foram denominados de endofíticos pela primeira vez por De Bary em 1866 **(STONE, 1988)**. PETRINI (1991) propôs que a definição fosse expandida para incluir todos os organismos que fossem capazes de colonizar os tecidos internos dos vegetais, sem causar dano aparente.

PETRINI (1986) encontrou fungos endofíticos em todas as espécies vegetais estudadas e concluiu que todas as plantas vivas podem, potencialmente, ser hospedeiras destes fungos.

Alguns trabalhos de melhoramento genético em fungos endofíticos já foram descritos ou pelo menos tiveram seu potencial considerado. MURRAY, LATCH e SCOTT (1992) transformaram o fungo endofítico *Acremonium*, isolado de *Lolium perenne*, e após reintrodução do fungo na planta, verificaram a expressão do gene de interesse. Alguns autores relataram o potencial que fungos endofíticos apresentam para incompatibilizar o desenvolvimento de patógenos (WHITE JR.; COLE, 1985; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; **CALHOUN et al., 1992**, ARNOLD et al., 2003).

ARAÚJO et al. (2001) relacionaram a frequência de várias espécies de bactérias e fungos endofíticos isolados de citros, e por meio de dados obtidos *in vitro*, apresentaram modos de interação destas bactérias com o fungo *Guignardia citricarpa*.

A utilização de plantas transgênicas tem gerado debates no mundo inteiro a respeito dos riscos destas para o meio ambiente e também para o ser humano. AZEVEDO e ARAÚJO (2003), em extensa revisão sobre o tema, demonstram que parece ocorrer pouca ou nenhuma consequência para os microrganismos endofíticos o fato de estarem presentes em uma planta transgênica. Os autores apresentam dados que mostram pequenas alterações na população de endófitos de *Citrus sinensis* previamente inoculado com uma bactéria geneticamente modificada.

Os modelos de interação fungo endofítico e planta certamente ainda não são totalmente conhecidos, mas vários fatores envolvidos na colonização da

planta devem ser comuns às linhagens fitopatogênicas. O sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas de apressórios (KUBO et al., 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina (SHAW; KUO; HOCH, 1998). Este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a ação mecânica do apressório (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo penetrar na planta (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997).

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para identificar a rota de infecção de fungos fitopatogênicos. MAOR et al. (1998) desenvolveram um protocolo de transformação para o fungo *Cochliobolus heterostrophus*, patogênico de milho, utilizando como marcador o gene GFP ("Green Fluorescent Protein"). Os autores utilizaram uma linhagem de *C. heterostrophus* transformada para infectar uma planta sadia e acompanhar o desenvolvimento da infecção. SOLOMON, TAN e OLIVER (2003), em recente revisão sobre o tema, ressaltaram que o sucesso nas etapas de infecção e colonização por fungos fitopatogênicos depende das habilidades do fungo em utilizar as fontes de nutrientes disponíveis na planta, penetrar nesta planta e também evitar os mecanismos de defesa da planta.

BLANCO (1999) identificou, em *G. citricarpa*, um marcador molecular do tipo RAPD exclusivo de linhagens patogênicas de citros, o qual foi clonado e seqüenciado. Esta seqüência aparentemente não é codificadora e, a partir dela, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificar esta seqüência por PCR. Desta forma, linhagens de *G. citricarpa* podem ser identificadas e com a utilização destes oligonucleotídeos iniciadores existe a possibilidade de um diagnóstico rápido de plantas infectadas com linhagens patogênicas deste fungo, mesmo antes do aparecimento das lesões que caracterizam a doença. Outra consideração importante da autora a respeito da diferenciação de linhagens endofíticas (não patogênicas) e linhagens patogênicas de *Guignardia* spp é baseada em agrupamentos obtidos a partir de

dados gerados por RAPD. O fato de linhagens endofíticas isoladas de citros agruparem juntamente com linhagens patogênicas de goiabeira (*G. psidii*) levou à sugestão de que estes endofíticos não são patógenos latentes do hospedeiro de onde foram isolados e sim patógenos de outras espécies vegetais, incapazes de causar doenças em plantas cítricas.

3.2 OS GÊNEROS *Guignardia* E *Phyllosticta*

O gênero *Guignardia*, descrito em 1892 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomórfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos mitospóricos geralmente saprófitos ou semiparasitas de folhas.

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (CARROLL; CARROLL, 1978; PETRINI, 1986; LEUCHTMANN et al., 1992; GLIENKE, 1995; PENNA, 2000). No entanto existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como arroz (SUGHA; SINGH; SHARMA, 1986), cana-de-açúcar (PONS, 1990), tabaco (PATEL; PATEL; TILVA, 1988), eucalipto (CROUS et al., 1993) e também frutíferas como abacate e tomate (BAKER, 1938), manga e mamão (McMILLAN JR., 1986), uva (IBRAHIM; BAYCA, 1989), e principalmente em citros (McONIE, 1964a, 1964b; HERBERT; GRECH, 1985; JOHNSTON; FULLERTON, 1988).

A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro de onde é isolado e, menor importância é dada a características como sintomatologia e estruturas morfológicas (picnídio, conídio e micélio) (VAN DER AA, 1973). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, vem sendo possível traçar um perfil mais preciso na caracterização destas espécies e várias classificações estão sendo revistas.

OKANE, NAKAGIRI e ITO (2001) isolaram fungos do gênero *Guignardia* (anamorfo: *Phyllosticta*) de folhas saudáveis de plantas da família Ericaceae. Morfologicamente, o anamorfo *Phyllosticta*, apresentou-se muito semelhante à espécie *P. capitalensis* P. Henn., conhecido como patogênico de orquídeas. Dados de seqüenciamento de regiões ITS1 e ITS2 ("internal transcribed spacer

regions of ribosomal DNA”), incluindo 5,8S rDNA, demonstraram a identidade dos isolados com *P. capitalensis*. Com estes resultados, os autores descreveram o endofítico ascomiceto como a nova espécie *Guignardia endophyllicola*, cujo anamorfo correspondente é *Phyllosticta capitalensis*. Previamente descrito apenas como patógeno de orquídeas, este fungo foi comprovadamente identificado como endofítico de plantas da família Ericaceae. Também PANDEY, REDDY e SURYANARAYANAN (2003) caracterizaram linhagens de *Phyllosticta* isoladas de folhas de árvores tropicais por meio de análise de ITS-RFLP e seqüenciamento de regiões ITS e identificaram estes isolados como *P. capitalensis*. Desta forma, comprovaram que este fungo, apesar de inicialmente descrito como patógeno de orquídeas, pode ser encontrado como endofítico de várias espécies vegetais.

Em recente trabalho, BAAYEN et al. (2002), compararam dezenas de linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp, *Phyllosticta* spp e *G. citricarpa* isoladas de diferentes espécies vegetais de diversas regiões da Ásia, África, Austrália e América. Foram utilizados dados morfológicos e também moleculares (seqüências ITS e AFLP). Os dados morfológicos obtidos estão de acordo com os descritos por McONIE (1964a), em que linhagens patogênicas apresentam crescimento lento em comparação com linhagens endofíticas, que apresentam crescimento mais rápido e fácil produção de peritécio e ascósporos em meio de cultura. Com os dados moleculares foi possível agrupar os isolados estudados em quatro grupos. Os grupos I e II foram os mais numerosos, sendo que no grupo I ficaram os isolados (38 no total) de lesão de citros (mancha preta), com crescimento mais lento e que foram então, identificados como *G. citricarpa*. No grupo II (43 isolados), os dados moleculares apontaram para uma grande identidade destes isolados com o fungo *G. mangiferae*, sendo que estes isolados eram provenientes de citros e também de outras plantas assintomáticas ou com sintomas bem discretos (pequenas manchas). Com base nestes dados, estes isolados foram classificados como *Guignardia mangiferae*. Os grupos III e IV apresentaram apenas um isolado cada e os dados moleculares apontaram para as espécies *Phyllosticta telopeae* e *P. spinarum*, respectivamente. Estes resultados têm uma grande importância econômica, pois a União Européia apresenta leis fitossanitárias específicas para fungos quarentenários como *G. citricarpa*. A

classificação de linhagens endofíticas como não-patogênicas, mesmo que isoladas de citros, é uma informação bastante relevante para exportações dos frutos, já que estes fungos não seriam enquadrados como fitopatógenos de citros.

3.3 MANCHA PRETA DO CITROS

A citricultura brasileira, em 2006, foi responsável pela exportação de 2 bilhões de dólares e alcançou um domínio de 81% de todo o mercado internacional de suco de laranja. Apesar da grande importância econômica e social que representa a citricultura para o país, este setor ressentiu-se de vários problemas de natureza fitossanitária e vem sofrendo com o avanço de pragas naturais. Desde 1990, a área plantada caiu 21% (SALOMÃO, 2007). Um grave problema que ajuda a aumentar o prejuízo decorre da Mancha Preta do Citros, uma doença que causa danos nos produtos e exportações brasileiras.

O primeiro relato da doença foi descrito em 1895 na Austrália, ocasionando elevadas perdas na produção e pós-colheita. Por volta da década de 30, a enfermidade foi encontrada na região litorânea da província de Transvaal, tornando impróprios para a exportação mais de 90% dos frutos de pomares não protegidos (ROBBS, 1990). Hoje a MPC apresenta uma ampla distribuição geográfica, registrada na África, Ásia, Oceania, América Central, América do Sul e Antilhas (ROBBS; BITTENCOURT, 1995).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1940, em frutos coletados em Piracicaba, São Paulo. Em 1980 a doença ressurgiu no Rio de Janeiro, afetando Mexerica do Rio (ROBBS; PIMENTEL; RIBEIRO, 1980). No início da década de 90 a MPC foi identificada atingindo o município de Conchal, uma importante região citrícola do Estado de São Paulo (GOES; FEICHTENBERGER, 1993). A evolução e a distribuição geográfica da MPC ocorreram de forma muito rápida, e encontra-se, de forma endêmica, em mais de quarenta municípios produtores do Estado de São Paulo (BALDASSARI et al., 2001).

As medidas de controle incluem, basicamente, a erradicação de plantas e frutos afetados, a proteção de pomares sadios e a exclusão da doença. Quanto às medidas de erradicação, sugere-se a eliminação dos frutos afetados

antes do início da florada, suprimindo a principal fonte de inóculo representada pelos picnídios.

O controle químico com fungicidas, além de antieconômico, não exerce um controle adequado da doença. Porém, é necessário fazer uso de fungicidas quando a doença ataca de forma severa e quando a produção destina-se ao consumo da fruta fresca. O principal problema da utilização sucessiva destes produtos é a seleção de linhagens resistentes, conforme observado na África do Sul (HERBERT; GRECH, 1985).

As lesões causadas pela MPC restringem-se praticamente à casca dos frutos, prejudicando a aparência e inviabilizando a sua comercialização. Graves prejuízos também ocorrem em razão da queda prematura dos frutos, o que pode atingir 80% da produção. Devido à possibilidade de contaminação microbiológica, estes frutos caídos são rejeitados pela indústria, aumentando significativamente os prejuízos.

3.4 RNA DUPLA FITA

RNAs dupla fita (RNA_{df}) são comumente encontrados em fungos e podem estar associados a partículas virais (BUCK, 1986). A maioria desses micovírus existe como simples partícula contendo um único RNA_{df} em um capsídio protéico composto por polipeptídeos (CASTRO et al., 1999). Outros RNA_{df} não são encapsulados e parecem estar associados à membrana do fungo hospedeiro (MARTINS et al., 1999).

A organização desses elementos é complexa. Existem diferenças significativas em tamanho e forma de apresentação do genoma (íntegro ou fragmentado), o que torna necessário vários grupos para acomodá-los (NUSS; KOLTIN, 1990).

Em recente revisão, MERTENS (2004) relatou cinco famílias de vírus de RNA_{df} que vêm sendo identificadas infectando fungos. São elas:

- Hypoviridae: genoma de um segmento, com vesículas de 50 a 80 nm que não possuem capsídio protéico;
- Totiviridae: genoma de um segmento e com capsídio icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;

- Chrysoviridae: genoma com quatro segmentos, com capsídio protéico icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;
(estas três famílias são exclusivas de fungos)
- Partitiviridae: genoma com dois segmentos, com capsídio protéico icosaédrico com 30 a 40 nm de diâmetro (hospedeiros de vírus desta família podem ser fungos e plantas);
- Reoviridae: genoma com 10, 11 ou 12 segmentos, empacotados em capsídios protéicos icosaédricos de 70 a 90 nm de diâmetro. Esta é a família mais numerosa de vírus de RNA_{df}, sendo que os hospedeiros destes vírus podem pertencer a diferentes táxons, como: fungos, plantas, artrópodos, peixes, répteis, pássaros e mamíferos. Recentemente foi descrito o que deve ser o primeiro caso de um vírus desta família infectando um fungo. OSAKI et al. (2002) relataram a existência de um vírus com 12 bandas, encontrado em uma linhagem hipovirulenta do fungo fitopatogênico *Rosellinia necatrix*.

Os micovírus são regularmente transmitidos através do contato citoplasmático, pela fusão de hifas. Partículas virais também podem ser transmitidas para os esporos durante o desenvolvimento do fungo, mas, aparentemente não podem infectar através da parede celular intacta (TIAGO, 2001). Segundo BUCK (1986), os micovírus não têm habilidade de lisar as células do hospedeiro, sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático, refletindo em uma gama limitada de hospedeiros, já que fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Este sistema de incompatibilidade vegetativa, de acordo com McCABE, PFEIFFER e VAN ALFEN (1999), limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas.

A identificação dos RNA_{df} é relativamente simples. Deve ser utilizado um protocolo de extração de ácidos nucléicos e posterior visualização destes ácidos nucléicos em gel de agarose. A confirmação da natureza das bandas extras, quando encontradas, é feita por meio de tratamentos com DNase e RNase. Alguns fungos como o *Uncinula necator*, fitopatogênico e biotrófico obrigatório, exigem adaptações no protocolo convencional conforme descrito por DÉLYE e CORIO-COSTET (1998).

Pesquisas indicam que essas partículas virais estão presentes em, aproximadamente, 30% de todas as espécies de fungos (BUCK, 1986).

Geralmente RNAs dupla fita são latentes ou crípticos mas, em alguns casos, fenótipos particulares são observados em fungos que contém esses micovírus (CASTRO et al., 1999). A presença de certos elementos de RNA_{df} está fortemente correlacionada com alterações na patogenicidade, principalmente hipovirulência (BOLAND, 1992). Todavia, infecções por RNA_{df} podem, também, alterar a morfologia da colônia e reduzir a taxa de crescimento e esporulação de seus hospedeiros (ELLISTON, 1982).

Comparando linhagens de *Chalara elegans* que continham RNA_{df} quanto ao crescimento, patogenicidade e sobrevivência no solo, PUNJA (1994) verificou que a presença de múltiplos elementos de RNA_{df} no fungo estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia, redução no crescimento e na patogenicidade. Resultados semelhantes foram obtidos por HOWITT et al. (1995), em *Botrytis cinerea*. Estes autores compararam várias linhagens contendo RNA_{df} com linhagens livres destes elementos e encontraram uma diferença na taxa de crescimento e virulência, sendo menores para o grupo contendo RNA_{df}. CASTRO et al. (1999) observaram neste mesmo fungo que células infectadas com vírus apresentaram um importante grau de degeneração celular em seu citoplasma, inclusive com o desaparecimento de organelas.

DALZOTO et al. (2006) obtiveram resultados interessantes com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio contra o percevejo marrom da soja, *Euschistus heros*, uma linhagem de *B. bassiana* com RNA_{df} foi menos virulenta que a isogênica, o que evidencia o caráter de hipovirulência do RNA_{df} neste fungo. No entanto, em geral, para fungos entomopatogênicos, o RNA_{df} leva à hipervirulência.

CHU et al. (2002) observaram a presença de RNA_{df} em linhagens de *Fusarium graminearum* e analisaram com mais detalhes uma destas linhagens, verificando mudanças morfológicas como redução do crescimento, aumento da pigmentação, redução da virulência para trigo e decréscimo na produção de toxinas. Além disso, o RNA_{df} foi transmitido para uma linhagem livre deste elemento por fusão de hifas e a linhagem receptora adquiriu o fenótipo da linhagem doadora.

Através da fusão de protoplastos, PFEIFFER et al. (2001) transferiram RNAdf para uma linhagem de *Phaffia rhodozyma* não portadora, e os efeitos desses elementos no valor adaptativo do hospedeiro foram testados por seguidas reproduções sexuais e assexuais. Os resultados não mostraram efeito na taxa de crescimento durante a fase lag e log da reprodução vegetativa, mas o número máximo de células na fase estacionária foi significativamente diferente. No entanto, na reprodução sexual, os resultados foram inconclusivos.

Satélites de certos RNA dupla fita são responsáveis pelo “sistema matador”, que fazem com que seu hospedeiro secrete toxinas como ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* (WICKNER, 1992) e *Ustilago maydis* (SHELBOURN; DAY; BUCK, 1988). As “linhagens matadoras” contêm segmentos de RNAdf encapsulados que são responsáveis por informações requeridas para replicação e para a estrutura viral, e também por codificar polipeptídeos tóxicos e provavelmente, por um papel na imunidade do fungo para a toxina que o mesmo produz.

Com relação à organização do genoma desses RNAdf, **NOGAWA et al. (1996)** verificaram atividade RNA polimerase dependente de RNA (“RDRP – RNA-dependent RNA polymerase”) no micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*. **COMPEL et al. (1999)** purificaram o micovírus – FUPO-1 – da linhagem A-11 de *Fusarium poae* e identificaram dois segmentos, um codificando para uma provável RDRP e o outro codificando para uma provável proteína de capsídeo (“coat protein”). A organização do genoma e certas seqüências de FUPO-1 mostraram similaridade ao vírus 2H de *Atkinsonella hypoxylon* e ao micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*, membros da família Partitiviridae. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma correlação entre compatibilidade vegetativa e RNA dupla fita, estes autores observaram, por meio de hibridizações, que em linhagens de *Fusarium poae* com compatibilidade vegetativa, RNAs dupla fita de tamanhos similares sempre eram geneticamente relacionados (muito similares ou homólogos) porém em linhagens que apresentavam incompatibilidade vegetativa, os RNAs dupla fita de tamanhos similares eram homólogos ou não.

Resultados mais favoráveis com a utilização de vírus no controle biológico de fungos fitopatogênicos vêm sendo obtidos com os vírus de

hipovirulência de *Cryphonectria parasitica*, pelo cancro em castanheiras. Na Europa, esta doença vem sendo controlada pela disseminação de linhagens hipovirulentas (com vírus) e atualmente, lesões de cancro curadas estão sendo encontradas e investigadas. Em todas é confirmada a presença do RNA dupla fita do hipovírus (ROBIN; HEINIGER, 2001). Recentemente, HOEGGER et al. (2003) comprovaram a disseminação dos vírus presentes nas linhagens infectadas em cancos previamente tratados com o fungo infectado com o vírus e também em novas lesões da doença, que não tinham sido tratadas anteriormente.

SASAKI et al. (2002) utilizaram a técnica de biolística para transformação de fungos da ordem Diaporthales, sendo duas linhagens de *C. parasitica*, uma de *Valsa ceratosperma* e também uma linhagem de *Phomopsis* tipo G. Foi utilizado cDNA de CHV1-EP713, um vírus responsável pela hipovirulência em *Cryphonectria parasitica*. Tanto para os hospedeiros naturais deste vírus como para *V. ceratosperma* e *Phomopsis*, foram observadas uma alteração morfológica e, mais importante, uma redução na virulência destas linhagens.

Recentemente foi relatada a existência de RNAdf e partículas semelhantes à vírus (VLPs – “Virus-like particles”) em *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum* (KAVA-CORDEIRO et al., 2007), porém sem a obtenção de linhagens curadas, a possível influência destes elementos em seus hospedeiros ainda é incerta.

Embora haja um grande número de relatos sobre RNAs dupla fita em fungos, o significado biológico dessas micoviroses, incluindo sua influência na patogenicidade e/ou influência no fenótipo do hospedeiro, ainda é incerto para a maioria dos casos. Conseqüentemente, estas infecções têm gerado grande interesse e têm se tornado alvo de extensas pesquisas, especialmente em fitopatógenos em que há um grande potencial na utilização de RNAs dupla fita como agentes de controle biológico, utilizando a hipovirulência que estes vírus podem conferir a estes fungos.

3.5 CURA DO RNA DUPLA FITA EM FUNGOS

Várias técnicas vêm sendo utilizadas para obter a cura do RNA dupla fita em fungos patogênicos de plantas ou animais.

FULBRIGHT (1984) utilizou ciclohexamida para tentar curar o fungo *Endothia parasitica*, patogênico de castanheiras, e obteve a cura da linhagem GHU4, que determinou aumento na virulência e recuperação da morfologia típica da colônia. Segundo STRYER (1988), a ciclohexamida inibe a síntese de proteínas, pois inibe a atividade da peptidil-transferase da subunidade 60S do ribossomo e inibe a síntese de RNA, como foi visto na cura de outras espécies (BOTTACIN et al. 1994).

Já ROBINSON e DEACON (2001) não obtiveram sucesso na cura total do RNA_{df} do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (AG3) utilizando ciclohexamida com incubação prolongada de 8 semanas, nem com a técnica de subculturas de pontas de hifas.

BOLAND (1992) também não obteve a cura do RNA_{df} em *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando subculturas de pontas de hifas e tratamento das colônias com calor ou ciclohexamida. O autor associou a hipovirulência do fungo com a presença do RNA_{df}.

Em testes de cura com ciclohexamida ou emetina, AHN e LEE (2001) perceberam que apenas com a eliminação de segmento 6,0 kb de RNA_{df} em *Nectria radicularis*, a fisiologia do fungo foi alterada. Ocorreu uma diminuição da virulência, esporulação e pigmentação. Desta forma, o segmento 6,0 kb RNA_{df} é um regulador positivo na fisiologia deste fungo, diferentemente de outros trabalhos, em que a presença do RNA_{df} torna o fungo hipovirulento, como foi relatado por outros autores (FULBRIGHT 1984, BOLAND 1992).

Utilizando outra técnica na tentativa de eliminar o RNA_{df} de *Paecilomyces fumosoroseus*, fungo entomopatogênico, (AZEVEDO et al. 2000) obtiveram a cura em um dos isolados através do isolamento de colônias monospóricas. Este trabalho mostrou pela primeira vez que fragmentos de RNA_{df} não causaram efeitos de hipovirulência em *P. fumosoroseus*.

ELIAS e COTTY (1996) tiveram resultados variáveis para três técnicas de cura de RNA_{df} utilizadas em *Aspergillus sect. flavi*. Com ciclohexamida a cura ocorreu em 40% dos isolados com RNA_{df}. Usando a técnica de colônia monospórica seqüencial, a freqüência de cura variou de 11 a 100% e com a técnica de clorato para seleção de mutantes para o metabolismo de nitrogênio,

a frequência de cura variou de 0 a 100%. Os autores ainda verificaram que a presença e/ou ausência de RNAdf não está associada à produção de aflatoxina.

DIAPENINGEN, DEBETS e HOEKSTRA (2007) isolou uma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* com RNAdf que formou setores sem conídios e com taxa de crescimento reduzida. Observou-se que esse fenótipo anormal possui titulação de micovírus elevada quando comparada com o micélio adjacente da colônia, devido a intensidade das bandas de RNAdf. Esta foi a única linhagem que foi curada através de isolamento seqüencial de ponta de hifa de um total de 10 linhagens.

ROMO et al. (2006), identificou um vírus de RNAdf que infecta o endofítico *Epichlõe festucae* como pertencente à família Totiviridae. As tentativas feitas para curar linhagens infectadas por calor falharam, e o que se observou é que em temperaturas elevadas, a concentração do vírus aumenta nesta espécie. Segundo a autora, este fato sugere a destruição de mecanismos mantenedores da homeostase nas células.

3.6 MARCADORES MOLECULARES

Várias técnicas têm sido empregadas para análise da variabilidade genética em microrganismos. No início da década de 90, dois grupos independentes, WILLIAMS et al. (1990), e McCLELLAND e WELSH (1990) descreveram a técnica que ficou conhecida como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). É baseada na amplificação de segmentos não específicos do DNA genômico utilizando o princípio da PCR (SAIKI et al., 1985). A diferença entre a PCR e o RAPD está na reação de amplificação, que utiliza apenas um único *primer* com uma seqüência arbitrária de 10 a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este *primer* arbitrário for complementar a um sítio em uma das fitas de DNA, e complementar a um mesmo sítio (com orientação invertida) na outra fita. O resultado da amplificação é um *fingerprint* do genoma em estudo (McCLELLAND; WELSH, 1990).

A técnica de RAPD permite caracterizar e avaliar o grau de similaridade genética entre genótipos aos níveis inter e intraespecífico. A técnica é altamente sensível às diferenças de até um único nucleotídeo entre o *primer* e

o DNA molde. Outras vantagens desta técnica são a rapidez e o não envolvimento de hibridação ou radioatividade. A reação requer uma pequena quantidade de DNA que não precisa ser necessariamente de alta qualidade (MANULIS et al., 1993).

As principais aplicações do RAPD são o mapeamento e classificação de linhagens de uma espécie, caracterização molecular de populações e espécies, identificação de variedades patogênicas, identificação de marcadores ligados a genes de interesse, estudos de genética de populações e epidemiologia, e obtenção de novos marcadores para diagnóstico via PCR (**FUNGARO**; VIEIRA, 1998 e **FUNGARO, 2000**).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

As linhagens utilizadas foram dos fungos *Guignardia citricarpa* (PC3C, PCIAC 19/02, PC7LB6, PC7LD6, PC7LE10) e *Phyllosticta spinarum* (ECPR3, ECPR5, ECPR6, ECPR8 e ECPR10) apresentados na Tabela 1 e pertencentes à coleção de microrganismos do LabGeM (Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR).

TABELA 1 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS

ESPÉCIE	LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ANO	ISOLAMENTO
<i>G. citricarpa</i>	PC3C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul
<i>G. citricarpa</i>	PCIAC 19/02	<i>Citrus</i> sp (limão Eureka)	2002	Cordeirópolis/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LB6	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LD6	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LE10	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>P. spinarum</i>	ECPR3	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR
<i>P. spinarum</i>	ECPR5	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR
<i>P. spinarum</i>	ECPR6*	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR
<i>P. spinarum</i>	ECPR8	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR
<i>P. spinarum</i>	ECPR10	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR

Nota: ECPR6* única linhagem sem RNA_{df} investigada

Fonte: O Autor

As linhagens foram cultivadas e mantidas em meio de cultura completo (MC) (item 4.2.1), pH 5,8, à 28°C, condições estas ideais para o crescimento das mesmas.

4.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

4.2.1 Meio Completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
Água destilada	p/ 1.000 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L. Para MC sólido, foram acrescentados 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.2. Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
H ₂ O destilada esterilizada	p/ 100 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

4.2.3 Clorofane

Fenol equilibrado e clorofórmio p.a. na proporção de 1:1.

4.2.4 Clorofil

Clorofórmio	24 volumes
-------------	------------

Álcool Isoamílico

1 volume

4.2.5 Fenol

Os cristais de estoque de fenol são derretidos em banho-maria a 60°C até obtenção de uma fase líquida. Um volume é então transferido para um becker e a ele é adicionado 0,1% de 8-hidroxiquinolina que tornará a solução amarela e evitará a oxidação da mesma. Em seguida são realizados vários banhos com Tris-HCl pH 8,0, em que o volume utilizado deve ser o mesmo do Fenol. O primeiro banho é realizado com Tris-HCl 0,5 M e os outros com Tris-HCl 0,2 M. Ao final de cada lavagem deve se medir o pH do fenol com uma fita indicadora. Quando estiver superior a 7,6, é considerado equilibrado, e deve ser conservado a uma temperatura de 4°C por 48 horas antes do uso.

4.2.6 Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio foi dissolvido (1,0% p/v) em água destilada. No momento do uso, foram adicionados 5 µl em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida em temperatura ambiente.

4.2.7 Solução de Ciclohexamida (20 mg/mL)

Ciclohexamida	0,61g
Acetona	0,5mL
H ₂ O MilliQ	30mL

A solução foi esterilizada por filtração. No momento do uso, foi diluída convenientemente.

4.2.8 Solução Salina

NaCl 0,85% (p/v) em H₂O destilada.

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.2.9 Tampão de corrida (“gel loading buffer”)

Sacarose	38%
Azul de bromofenol	1%
EDTA	67 mM

4.2.10 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985)

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1%

A solução foi preparada e aquecida a 60°C no momento do uso.

4.2.11 Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

4.2.12 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com pastilhas de NaOH 10 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.2.13 Tampão TBE 5x (solução estoque)

Tris-base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
H ₂ O destilada	p/ 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente. No momento do uso, foi diluída convenientemente em água destilada.

4.2.14 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com HCl 5 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C. Ocasionalmente o pH foi ajustado para outros valores.

4.3 PROTOCOLOS

4.3.1 Esterilização

Meios de cultura, soluções e palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de uma atmosfera por 20 minutos.

Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180°C por 4 horas.

4.3.2 Extração de Ácidos Nucléicos

Para a extração de ácidos nucléicos totais das linhagens estudadas, foi utilizado o protocolo de RAEDER; BRODA (1985), modificado por GLIENKE (1995).

Foi feito repique de cada linhagem em 3 placas contendo Meio Completo, em 9 pontos diferentes da placa. Este material foi incubado em estufa a 28 °C por um período de 5 a 6 dias, dependendo do crescimento das colônias.

Após este período, os micélios foram raspados das placas utilizando espátulas esterilizadas, vedados com filme de parafina em recipientes de vidros e mantidos em freezer, a uma temperatura inferior a 4°C até serem liofilizados.

Posteriormente a esta etapa, o material foi armazenado novamente em freezer até sua utilização.

O início da extração de ácidos nucléicos totais se dá pela adição de nitrogênio líquido aos micélios, que são triturados em gral com um pistilo até se formar um pó fino. Este pó é então transferido para 4 tubos eppendorf (40 – 60 mg/tubo) e então é adicionado um volume de tampão de extração (4.2.10), preparado no momento do uso e aquecido a 60°C.

Os tubos eppendorf são homogeneizados em vortex até a obtenção de uma solução homogênea e mantidos em banho-maria a 60°C, sem submersão por 20 – 30 minutos. Após esse período os passos seguintes do protocolo devem ser realizados em capela devido à toxicidade dos reagentes.

Adiciona-se um volume de fenol equilibrado pH 8,0 a cada um dos tubos, que devem ser centrifugados por 15 minutos a 5000 rpm. Em seguida, a fase sobrenadante é coletada e transferida para outros tubos, aos quais adiciona-se clorofane. Eles então são centrifugados nas mesmas condições. Repete-se o procedimento com adição de clorofil e centrifugação também por 15 minutos a 5000 rpm. A fase sobrenadante é transferida para tubos novos e se adiciona um volume de 60% de isopropanol a ela.

Estes tubos são mantidos a -20 °C por no mínimo 1 hora, para haver precipitação dos ácidos nucléicos. Os tubos são centrifugados novamente por 20 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante é descartado. O precipitado é lavado com etanol 70% (1 mL por tubo) e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm.

O etanol é então descartado e os tubos são deixados abertos a 37°C por 1 hora ou durante a noite em temperatura ambiente, para secagem. Os ácidos nucléicos são ressuspensos em TE ou água Milli-Q esterilizada, dependendo do uso.

4.3.3 Eletroforese

A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 1% ou 1,5%, dependendo da finalidade da corrida, banhado por tampão TBE 1x (4.2.13) a 4 V/cm. O DNA de fago λ clivado com a enzima *HindIII* foi utilizado como marcador padrão de peso molecular.

4.3.4 Cura do RNAdf

Eventualmente ao MC foi adicionada ciclohexamida, um inibidor da síntese protéica (RNA). Após a fusão do meio, quando este estava com uma temperatura entre 45 e 50°C, adicionou-se ciclohexamida em concentrações variadas (100, 50, 15, 10, 5, 1 e <1 $\mu\text{g/mL}$). Logo depois, o MC foi homogeneizado para depois ser vertido em placas de Petri que foram

inoculadas com linhagens de *P. spinarum* e *G. citricarpa* com RNAdf e incubadas em estufa a 28°C e 37°C.

Para a cura do RNAdf, também foi utilizada a técnica de incubação em temperatura moderadamente alta para este fungo (37°C) por algumas gerações. De início, para cada linhagem foi realizado um repique em MC. As placas de Petri ficaram em estufa à 37°C por 20 dias, e a partir das colônias que se desenvolveram, foi realizado mais um repique para obter a 2ª geração à 37°C. Após 20 dias, foi realizado o 3º repique, porém, neste, as placas ficaram em estufa à 28°C para obter material para a extração de DNA. Todos os repiques foram feitos com auxílio de lupa para a secção das pontas das hifas crescidas nos meios de cultura (repiques de pontas de hifas). **(REFERÊNCIA)**

4.3.4 RAPD

1µL do DNA extraído (item 4.3.2) foi diluído na proporção de 1:100 µL de H₂O Milli-Q. As reações de RAPD foram preparadas em tubos novos esterilizados de 0,2 mL. Para cada *primer* utilizado foi feito um “mix” contendo 3 mM de MgCl₂, tampão PCR 1x, 0,2mM de cada dNTP, 1,5 U de *Taq* polimerase (0,3µL) em um volume final de 25µL.

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler gradient) de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1,5 minuto a 37°C, 2 minutos a 72°C e extensão final de 3 minutos a 72°C.

Os oligonucleotídeos utilizados foram da Operon Technologies:

OPX11 5' GGAGCCTCAG 3'

OPX14 5' ACAGGTGCTG 3'

4.3.5 DENDOGRAMA

A partir do padrão de bandas obtido foi criada uma matriz de similaridade usando o coeficiente de similaridade de Nei (1972) e agrupando as unidades através do método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average”) para construção do dendrograma (Figura 7) com o

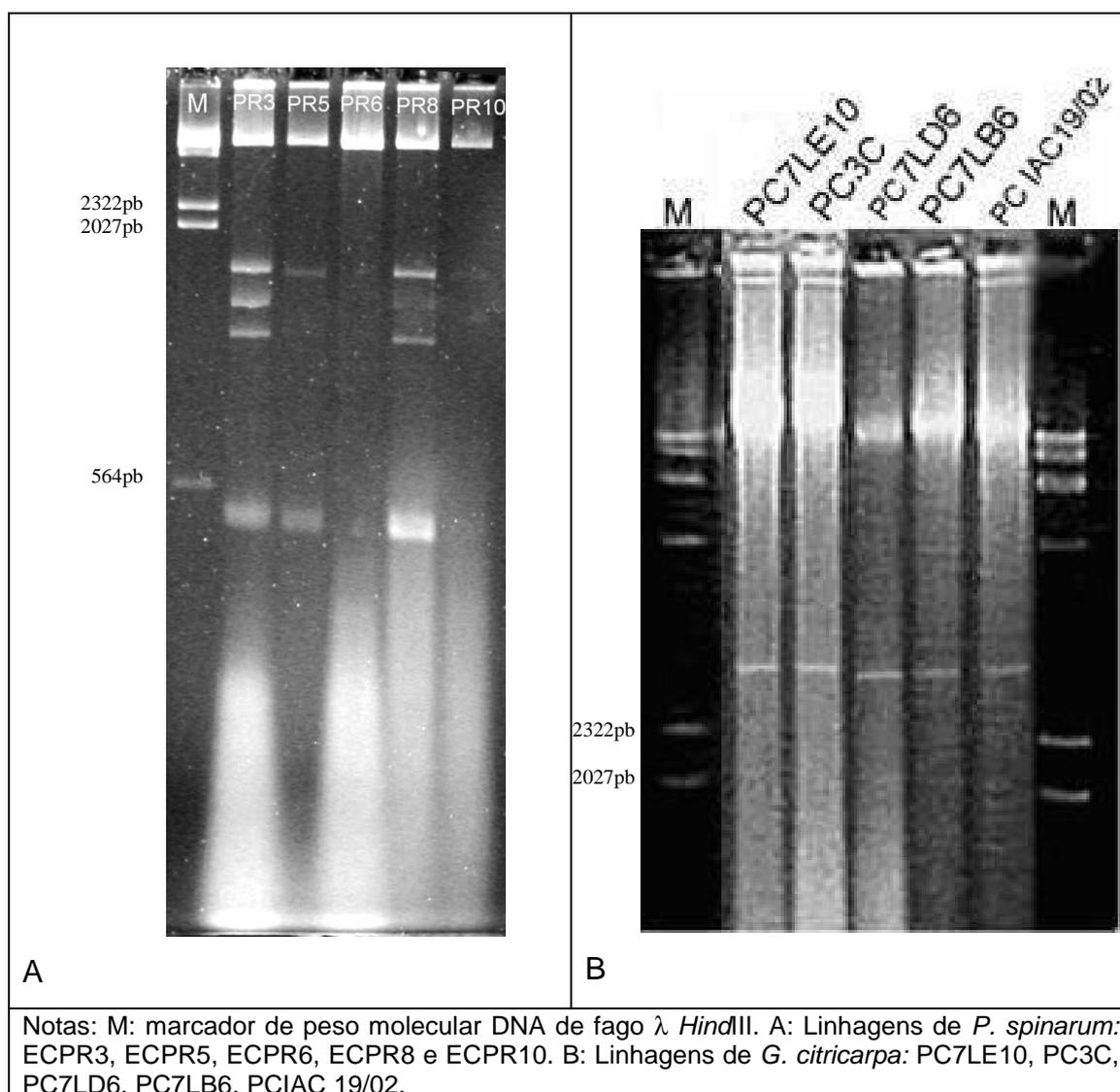
auxílio do programa TFPGA (“Tools for Population Genetic Analyses”) obtido a partir do sítio <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do RNAdf

Foram investigadas cinco linhagens de *P. spinarum* e cinco linhagens de *G. citricarpa* quanto à presença de RNAdf. Confirmando resultados obtidos anteriormente (KAVA-CORDEIRO et al., 2007), ficou evidenciado que apenas uma linhagem de *P. spinarum* (ECPR6) não apresentou bandas de RNAdf e o número de bandas presentes nas outras linhagens variou de 2 a 4 (Figura 1A). Também foi confirmada a presença de apenas uma banda de RNAdf nas linhagens de *G. citricarpa* investigadas (Figura 1B).

FIGURA 1 – ACIDOS NUCLEICOS TOTAIS DE LINHAGENS DE *P. spinarum* (A) E *G. citricarpa* (B)



5.2 Cura do RNAdf por ciclohexamida

Após o tratamento com ciclohexamida, adicionada ao meio de cultura, inicialmente em concentração de 100 µg/mL, não foi evidenciado crescimento de micélio nas placas de Petri. Usou-se esta concentração por ter apresentado resultados favoráveis em trabalhos utilizando outros fungos. Em trabalho desenvolvido no mesmo laboratório, DALZOTO et al. (2006), usaram com sucesso a concentração de 20 µg/mL para a cura de *B. bassiana*. Então a concentração de ciclohexamida no meio de cultura foi reduzida gradativamente para 50, 15, 10, 5, 1 e 0,5 µg/mL, mas nenhum dos pontos de repique com micélio se desenvolveu e formou uma nova colônia, tanto em crescimento à 28°C quanto em 37°C. A temperatura de 37°C está acima da temperatura ótima de crescimento dos fungos, e foi utilizada para tentar obter a cura do RNAdf com a ação conjunta da ciclohexamida. Este fato evidenciou a sensibilidade destas espécies a este tratamento com ciclohexamida, independente da temperatura.

DIAPENINGEN, DEBETS e HOEKSTRA, (2007), utilizaram concentrações de ciclohexamida que variaram de 0,01 mM a 0,1 mM. HAMMAR, FULBRIGHT e ADAMS (1989), utilizaram concentrações de 0,25 µg/mL a 50 µg/mL. MELZER e BIDOCHKA (1998), utilizaram concentração de ciclohexamida de 0,2 g/L, enquanto que IKEDA et al., 2004, utilizaram de 0,1 ppm a 10 ppm. Isto sugere que protocolos de cura por ciclohexamida em *Guignardia* e *Phyllosticta* devem ser revistos, usando concentrações ainda menores deste produto.

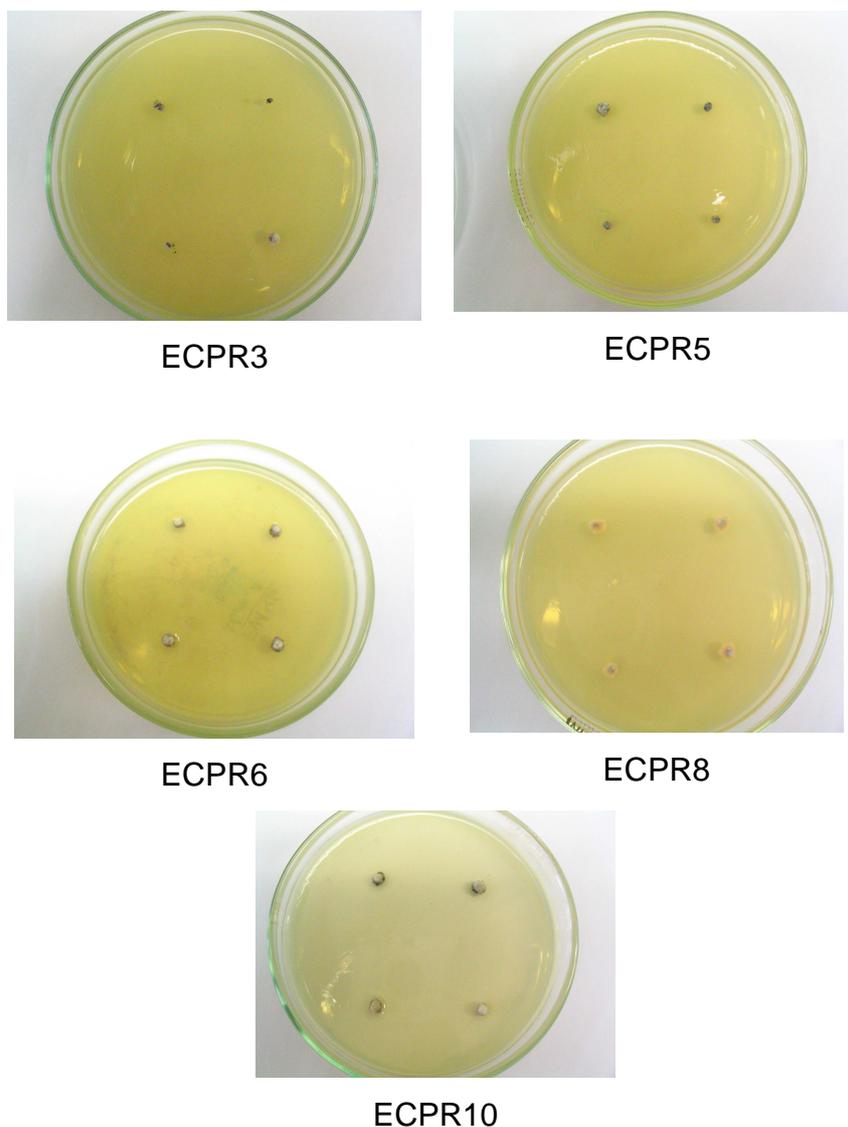
Com o auxílio de uma lupa, após 60 dias de incubação, nas placas de todas as linhagens, foram observados alguns pontos com um mínimo crescimento de micélio, que foi repicado para placas contendo MC e incubados à 28°C. Entretanto, não houve crescimento micelial, provavelmente devido à ação da ciclohexamida.

5.3 Cura do RNAdf por temperatura moderadamente elevada

Devido ao resultado anterior, foi utilizada a técnica de crescimento em temperatura moderadamente elevada na qual as colônias cresceram à 37°C.

Houve crescimento micelial de *P. spinarum* apresentando alterações morfológicas (Figuras 2). Após 20 dias de cultura, as colônias atingiram diâmetro reduzido.

FIGURA 2 – MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE *P. spinarum*, APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO A 37°C



Fonte: o autor

Após duas gerações de crescimento a 37°C por 20 dias, na 3ª geração as placas foram novamente incubadas à 28°C e apenas houve crescimento das linhagens ECPR3 e ECPR8. A linhagem ECPR8 apresentou-se bastante instável produzindo três morfologias distintas, sendo classificadas como

ECPR8a, ECPR8b e ECPR8c (Figura 3). A linhagem ECPR3 também se apresentou instável, produzindo setores (Figura 4).

FIGURA 3 – MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR8 DE *P. spinarum* APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA ELEVADA

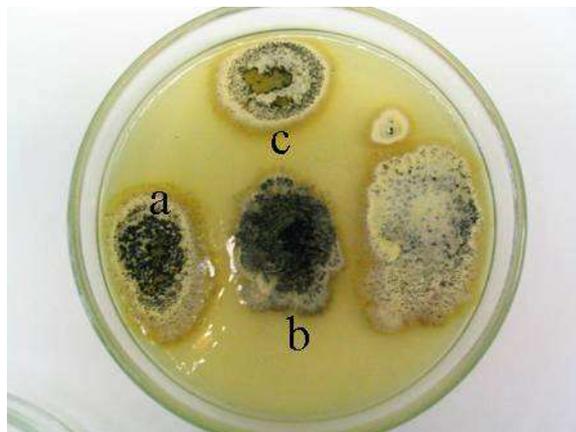
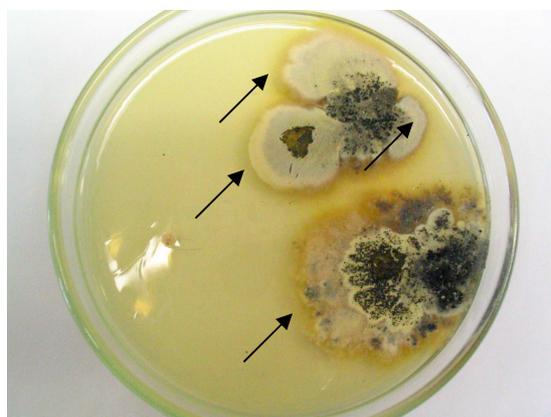


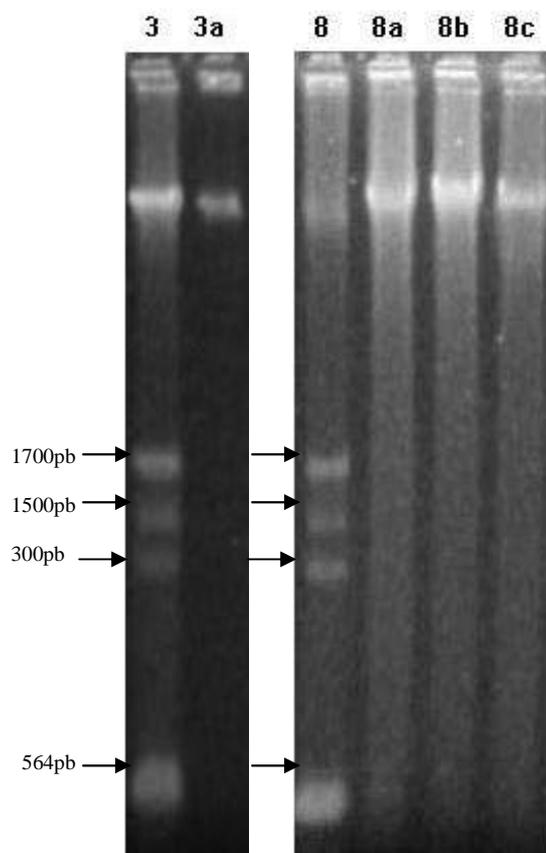
FIGURA 4 – MORFOLOGIA DA LINHAGEM ECPR3 DE *P. spinarum* APÓS TRATAMENTO COM TEMPERATURA ELEVADA



Nota: setas indicam os setores formados.

Os setores foram repicados e preparados para extração de ácidos nucléicos totais. Na figura 5 comprovou-se a cura destas linhagens pois as bandas correspondentes ao RNAdf das linhagens originais não são visualizadas nas colônias descendentes dos setores isolados (ECPR3a e ECPR8a, ECPR8b, ECPR8c).

FIGURA 5 – ÁCIDOS NUCLÉICOS DA LINHAGEM ECPR3 COM SETOR “a” E ECPR8 COM SETORES “a”, “b” e “c”



Fonte: o autor

Notas: linhagens de *P. spinarum*: ECPR3, setor “a”, ECPR8, setores “a”, “b” e “c”. Setas indicam bandas de RNAdf.

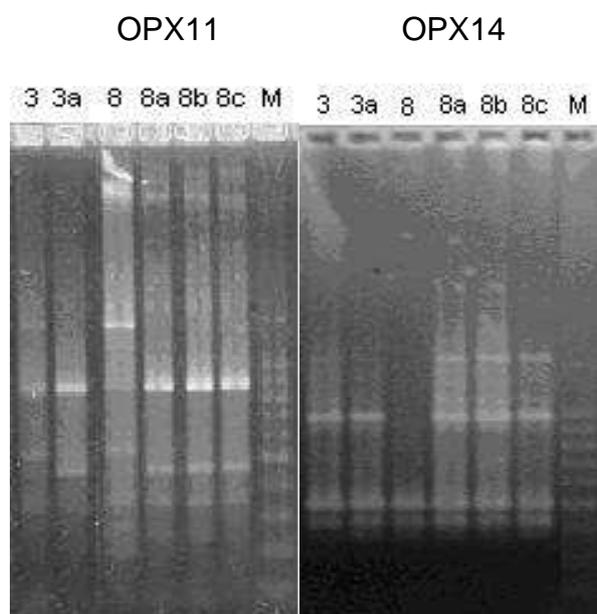
Devido aos resultados promissores obtidos com as linhagens com RNAdf de *P. spinarum*, os experimentos de cura com temperatura moderadamente elevada com as linhagens de *G. citricarpa* já estão em andamento.

5.4 RAPD DAS LINHAGENS ORIGINAIS E CURADAS

Realizou-se uma reação de RAPD para comprovar que as linhagens que foram curadas são derivadas das linhagens originais ECPR3 e ECPR8, ou seja, isogênicas.

Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores OPX11 e OPX14 (Figura 6).

FIGURA 6 – RAPD DAS LINHAGENS DE *P. spinarum*

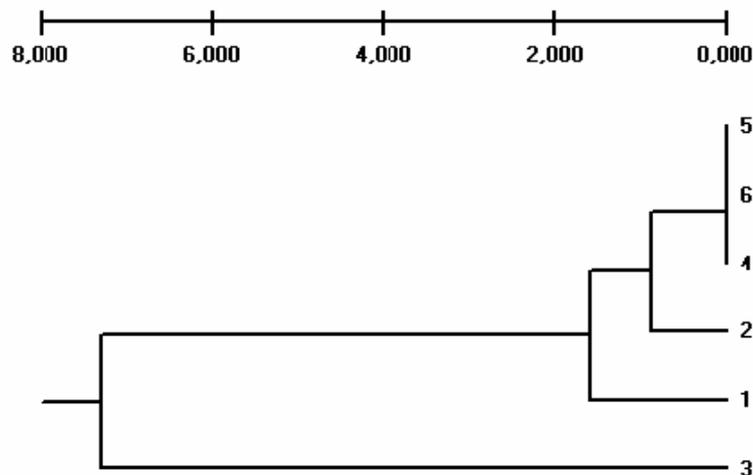


Fonte: o autor

Notas: ECPR3 (3), ECPR3a (3a) E ECPR8 (8), ECPR8a (8a), ECPR8b (8b) e ECPR8c (8c)

Com base no padrão de bandas obtido, criou-se uma matriz de similaridade para a construção do dendrograma.

FIGURA 7 – DENDROGRAMA DAS LINHAGENS DE *P. spinarum* CURADAS E COM RNAdf



Fonte: o autor

Notas: 1: ECPR3. 2: ECPR3 "a". 3: ECPR8. 4: ECPR8 "a". 5: ECPR8 "b". 6: ECPR8 "c".

Diferente do esperado, as linhagens curadas não apresentaram 100% de similaridade no padrão de bandas obtido com os oligonucleotídeos iniciadores OPX11 e OPX14. DALZOTO et al. (2006) obtiveram padrões idênticos de RAPD em uma linhagem infectada e sua isogênica (curada) do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Neste trabalho observou-se que os padrões de bandas da linhagem ECPR3 e do setor "a" são bem semelhantes, porém não idênticos. No entanto, a linhagem ECPR8 apresentou um padrão de bandas muito diferente dos seus setores "a", "b" e "c" sendo que estes, por sua vez, apresentaram 100% de similaridade genética.

Uma hipótese levantada sobre esta diferença é que, durante o processo de cura, os setores formados tenham perdido "mini-cromossomos" que não são necessários para a sobrevivência do organismo. Estes "mini-cromossomos" podem ter genes envolvidos na patogenicidade do fungo, como já foi observado por MASEL et al (1990) e podem ter sido responsáveis pela alteração do padrão de bandas obtido.

Outra explicação plausível é a má amplificação do DNA de ECPR8, uma vez que observa-se ausência de algumas bandas para esta linhagem (Figura 6).

Novas extrações de ácidos nucléicos totais de todas as linhagens utilizadas estão sendo feitas para elucidar a real identidade destas linhagens e um maior número de oligonucleotídeos iniciadores serão utilizados.

A partir do momento que se comprove a isogenia destas linhagens (*P. spinarum*) e de possíveis linhagens curadas de *G. citricarpa*, possíveis alterações morfológicas decorrentes da presença/ausência de RNAdf poderão ser evidenciadas bem como alterações na patogenicidade de *G. citricarpa*.

6. CONCLUSÕES

- Foi confirmada a presença de RNAdf nas linhagens de *G. citricarpa* e *P. spinarum* estudadas.
- Tanto o fungo *Guignardia citricarpa* quanto *Phyllosticta spinarum* foram sensíveis à ação da ciclohexamida nas concentrações utilizadas, inviabilizando a obtenção de linhagens curadas por este método.
- O cultivo de colônias a partir de ponta de hifa em temperatura moderadamente elevada (37°C) parece ser eficiente na eliminação do RNAdf em *P. spinarum*
- Por meio da análise de marcadores moleculares (RAPD) não foi possível confirmar a isogenia das linhagens curadas obtidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 496-507, april, 2001.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.

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 (homóptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 61-63, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, p. 223-233, 2003.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo : EDUSP, 1973. 288 p.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H.A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n. 5, p. 464-477, 2002.

BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The occurrence of latent infections in developing fruits. **Annals of Botany**, London, v.2, p. 919-931, 1938.

BALDASSARI, R. B.; GOES, A.; SANTOS, J. M.; TIMOSSI, A. J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 88-92, 2001.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p. 411-451, 1986.

BLANCO, C.G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 196p. Tese (doutorado).

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.

BOLAND, G.J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 14, p. 10-17, 1992.

BOTTACIN, A. M., Levesque, C. A. & Punja, Z. K. (1994) Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. *Phytopathology* 84: 303-312. In Robinson, Deacon 2001.

BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 329-342, 1990.

BUCK, K.W. Fungal virology – An overview. In: **Fungal virology**. Ed. K.W. Buck, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 1-84, 1986.

CALHOUN, L.A.; FINDLAY, J.A.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 4, p. 281-286, 1992.

CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 5, p. 3034-3043, 1978.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILLO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, p. 95-99, 1999.

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

CLARK, C.L.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, Cambridge, v. 93, p. 508-512, 1989.

COMPEL, P.; PAPP, I.; BIBO, M.; FEKETE, C.; HORNOR, L. Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. **Virus Genes**, Dordrecht, v. 18, p. 49-56, 1999.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, p. 582-584, 1993.

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

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

DÉLYE, C.; CORIO-COSTET, M. F. Rapid isolation of both double-stranded RNA and PCR-suitable DNA from the obligate biotrophic phytopathogenic fungus *Uncinula necator* using a commercially available reagent. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.74, p. 149-153, 1998.

DIAPENINGEN, A. D. V., DEBETS, A. J. M., HOEKSTRA, R. F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black Aspergillus populations. **Fungal Genetics and Biology**, United Kingdom, v. 43, p. 446-452, 2007.

ELLISTON, J.E. Hypovirulence. **Advances in Plant Pathology**, Academic Press, Toronto, Canada, v.1, p.1-33, 1982.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta ou pinta preta dos citros. **Laranja & Cia**, Matão, n. 43, p. 10-11, 1996.

FULBRIGHT, D.W. Effect of elimination dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p. 722-724, 1984.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticita citricarpa* (McAlp.) VAN DER AA (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 138, 1993.

HAMMAR, S., FULBRIGHT., D, W, ADAMS, G. C. Association of Double-Stranded RNA with Low Virulence in an Isolate of *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology**, St. Paul, v 79, p. 568-572. 1989.

HERBERT, J.A.; GRECH, N.M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 1007, 1985.

HOEGGER, P.J.; HEINIGER, U.; HOLDENRIEDER, O.; RIGLING, D. Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.7, p.3767-3771, 2003.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in apressorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, p. 403-418, 1989.

HOWITT, R.L.J.; BEEVER, R.E.; PEARSON, M.N.; FORSTER, R.L.S. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 1472-1478, 1995.

IBRAHIM, G.; BAYCA, B. Fungal, bacterial and nematological problems of citrus, grape and stone fruits in Arab countries. **Arab Journal of Plant Protection**, Beirut, v.7, n.2, p.190-197, 1989.

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

JOHNSTON, P.R.; FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. Nov., cause of a citrus leal spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v.16, p.159-163, 1988.

KAVA-CORDEIRO, V. **Guignardia citricarpa, G. mangiferae e Phyllosticta spinarum: caracterização morfológica, SCARs e RNA dupla fita**. Curitiba, 2004. 131p. Tese (doutorado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L.; LANZONI, C.; POSSIEDE, Y.M.; DALZOTO, P.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L. Mycoviruses in *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* and *Phyllosticta spinarum*. **Mycological Research**. United Kingdom, submitted, 2007.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n. 4, p. 287-294, 1992.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* from carnation. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p 98-101, 1993.

MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B.A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 4, p. 491-496, 1998.

MARTINS, M.K.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, Berlin, v. 36, p. 94-7, 1999.

MASEL, A., BRAITHWAITE, K., IRWIN, J., MANNERS, J. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Curr. Genet.**, Heidelberg, v. 18, p. 81-86, 1990.

McCABE, P.M.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N.K. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, Limerick, v. 7, p. 377-381, 1999.

McCLELLAND, M.; WELSH, J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n.24, p. 7213-7218, 1990.

McMILLAN JR., R.T. *Guignardia citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. **Journal of Phytopathology (Berlin)**, Berlin, v.117, p. 260-264, 1986.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.40-43, 1964a.

McONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.64-67, 1964b.

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**, New York, v.90, p. 586-594. 1998.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, Shannon, v. 101, p. 3-13, 2004.

MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.233, p.1-9, 1992.

NOGAWA, M.; NAKATANI, A.; GONDA, K.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M.; Replication of double-stranded RNA in micovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 137, p. 45-49, 1996.

NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 37-58, 1990.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. Inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p.101

OSAKI, H.; WEI, C.Z.; ARAKAWA, M.; IWANAMI, T.; NOMURA, K.; MATSUMOTO, N.; OHTSU, Y. Nucleotide sequences of double-strand RNA segments from a hypovirulent strain of the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: Possibility of the first member of the *Reoviridae* from fungus. **Virus Genes**, Dordrecht, v. 25, n.1, p.101-107, 2002.

PANDEY, A.K.; REDDY, M.S.; SURYANARAYANAN, T.S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PATEL, B.N.; PATEL, R.C.; TILVA, D.G. *Phyllosticta* leaf spot: a new disease in Bidi tobacco nursery. **Tobacco Research**, Rajahmundry, v.14, p. 1176-1178, 1988.

PENNA, E.B.S. **Microrganismos endofíticos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp por RAPD**. Curitiba, 2000, 12p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**, Springer Verlag, 1991, p. 179-197.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge, U.K. Cambridge University Press, 1986, p. 175-187.

PFEIFFER, I.; LITTER, J.; PÉNZES, Z.S.; KUCSERA, J. Effects of double-stranded RNA viruses on the reproduction of *Phaffia rhodozyma*. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 52, p. 299-306, 2001.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia Venezolana**, Maracay, v.3, p.34-43, 1990.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MaC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141

PUNJA, Z.K. Influence of double-stranded RNA on growth, sporulation, pathogenicity, and survival of *Chalara elegans*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1001-1009, 1994.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 75-86, 1990.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes `a produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico – CTAA-EMBRAPA**, n. 19, p. 1-5, 1995.

ROBBS, C. F.; PIMENTEL, J. P.; RIBEIRO, R. L.D . A mancha preta causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 455, 1980.

ROBIN, C.; HEINIGER, U. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**, v. 76, n. 3, p. 361-367, 2001.

ROBINSON, H.L.; DEACON, J.W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG3. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 12-22, 2001.

ROMO, M, LEUCHTMANN, A., GARCÍA, B., ZABALGOGEAZCOA, I. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichlōe festucae*. **Virus Research**, United Kingdom, v 124, p. 38-43, 2007.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOELFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. *Primer* directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science (Washington DC)**, v. 239, p. 487-491, 1985.

SALOMÃO, Alexa. Os Concorrentes Viraram Suco. **Exame**, edição 893, 23 de maio de 2007.

SASAKI, A.; ONOUE, M.; KANEMATSU, S.; SUZAKI, K.; MIYANISHI, M.; SUZUKI, N.; NUSS, D.L.; YOSHIDA, K. Extending chestnut blight hypovirus host range within Diaporthales by biolistic delivery of viral cDNA. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 8, p. 780-789, 2002.

SHAW, B.D.; KUO, K.; HOCH, H.C. Germination and aplerium development of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. **Mycologia**, Lawrence, v.90, n.2, p. 258-268, 1998.

SHELBOURN, S.L.; DAY, P.R.; BUCK, K.W. Relationships and functions of virus double-stranded RNA in a P4 Killer Strain of *Ustilago maydis*. **Journal of General Virology**, Reading, v. 69, p. 975-982, 1988.

SOLOMON, P.S.; TAN, K.; OLIVER, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 203-210, 2003.

STONE, J.K. Fine structure of latent infection by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observation on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, p. 45-54, 1988.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guignardia* spp por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Curitiba, 2004, 101p. Dissertação (Mestrado). Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke de Blanco. Universidade Federal do Paraná.

STRYER, L. (1988) **Biochemistry**. 3rd edn. W. H. Freeman, New York. In Robinson, Deacon, 2001.

SUGHA, S.K.; SINGH, B.M.; SHARMA, B.M. Studies on *Phyllosticta glumarum* causing glume blight of rice (*Oryza sativa* L.) **Himachal Journal of Agricultural Research**, Palampur, v.12, n.1, p. 11-14, 1986.

TIAGO, P.V. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas**

por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus*. Londrina, 2001. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

VAN DER AA, H.A. **Studies in *Phyllosticta* I. Studies in Mycology**, n.5, 1973.

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lawrence, v.77, p. 323-327, 1985.

WICKNER, R.B. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 347-75, 1992.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WOLOSHUK, C.P.; SISLER, H.D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 7, p. 161-166, 1982.