

SWIANY SILVEIRA LIMA

Incidência e transmissão de dsRNA em *Pseudocercospora griseola*, agente causal da mancha-angular do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2008

RESUMO

LIMA, Swiany Silveira. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Incidência e transmissão de dsRNA em *Pseudocercospora griseola*, agente causal da mancha-angular do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)**. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

O feijoeiro comum *Phaseolus vulgaris* apresenta grande importância alimentar e econômica para o brasileiro. No entanto, sua produtividade é baixa devido, em parte, à ocorrência de doenças. Entre essas doenças, destaca-se a mancha-angular, cujo agente causal é o fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun. Micovírus ou partículas semelhantes a vírus já foram descritas em diversos fungos fitopatogênicos. Esses vírus são incapazes de penetrar e lisar as células hospedeiras, sendo a transmissão intracitoplasmática por meio da anastomose entre hifas e da esporogênese. A maior parte dos micovírus é encontrada como múltiplos fragmentos de dsRNA. Em geral, os micovírus são crípticos (latentes) em relação aos efeitos provocados no fenótipo do fungo hospedeiro, mas podem influenciar a biologia de seu hospedeiro, provocando alterações morfológicas, hiper ou hipovirulência. Por estarem associados ao fenômeno de hipovirulência, os micovírus apresentam uso potencial no biocontrole de fungos fitopatogênicos. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar micovírus presentes em isolados de *P. griseola*, uma vez que recentemente estes foram detectados, pela primeira vez, nesta espécie de fungo. Para atingir este objetivo, foi realizada a caracterização de dsRNAs presentes em diferentes isolados, a análise da transmissão vertical e a obtenção de linhagens isogênicas por meio da cura de vírus. dsRNAs foram detectados em 31 dos 49 isolados de *P. griseola* analisados. Neste trabalho, a maioria dos isolados apresentou múltiplos fragmentos de dsRNA, que variaram de zero a 10, com tamanhos estimados entre 0,8 e 4,8 kb. O fragmento de dsRNA de 4,8 kb do isolado 29-3 foi eficientemente transmitido para os esporos assexuais. Entretanto, nem todos os fragmentos de dsRNA, entre um e seis, presentes no isolado Ig848 foram transmitidos para colônias monospóricas. Cicloheximida foi utilizada em concentração de 20 µg/mL a fim de obter a cura de micovírus. Para o isolado 29-3, este tratamento foi ineficaz, pois as três colônias repicadas em

cicloheximida durante quatro gerações apresentaram o mesmo perfil de ácidos nucléicos totais presente no isolado selvagem. No caso do isolado Ig848, este mesmo tratamento eliminou os fragmentos de 2,2; 2,0; 1,8; 1,2 e 1,0 kb das colônias Ch2 e Ch4, após sete repicagens sucessivas em meio contendo cicloheximida. Diversos fungos fitopatogênicos são acometidos por infecções virais, sendo que essa variação no perfil de ácidos nucléicos presente nos isolados de *P. griseola* também é observada em outros patógenos de plantas. A presença de múltiplos fragmentos, em um único isolado, pode ser devido à infecção por vírus com genoma segmentado, RNA satélite, RNA defectivo ou infecções mistas. A eficiência de transmissão por meio dos conídios é variável, dependendo da espécie de fungo considerada, mas geralmente é próxima a 100%, conforme ocorreu para o isolado 29-3 de *P. griseola*. Tanto a cura de alguns fragmentos de dsRNA quanto a perda espontânea durante a conidiogênese, observada para o isolado Ig848, indicam a infecção por replicons independentes. Estas linhagens isogênicas, com e sem alguns fragmentos de dsRNA, terão o efeito da infecção viral avaliados em aspectos como a taxa de esporulação, o crescimento e a patogenicidade. A caracterização destes vírus, presentes em *P. griseola*, permitirá estudos posteriores sobre o uso destes no controle biológico da mancha-angular, o que poderá reduzir as perdas econômicas causadas por essa doença na lavoura.

ABSTRACT

LIMA, Swiany Silveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Incidence and transmission of dsRNA in *Phaeoisariopsis griseola*, the agent causing the angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

The common bean *Phaseolus vulgaris* shows great importance under feeding and economical aspects for the Brazilian people. However, its productivity has been low due to the occurrence of diseases and other factors. The angular leaf spot is distinguished among those diseases. Its causal agent is the *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun. Some mycovirus or virus-like particles were already described in several phytopathogenic fungus. Those viruses are unable to penetrating and lysing the host cells, and the intracytoplasmic transmission is accomplished by anastomosis among hyphae and the sporogenesis. Most mycovirus are found as multiple dsRNA fragments. In general, the mycovirus are cryptic (latent) concerning to the effects caused into phenotype of the host fungus, but they can affect the biology of their host by provoking morphological changes, hyper or hypovirulence. Because they are associated to the hypovirulence phenomenon, the mycoviruses show a potential use in the biocontrol of the phytopathogenic fungus. The general objective of this work was to characterize the mycovirus in the isolates of *P. griseola*, since they were recently detected in this fungus species for the first time. To reach this objective, the following were performed: the characterization of the dsRNA in different isolates; the vertical transmission analysis; and the obtainment of isogenic lines by the virus cure. The dsRNAs were detected in 31 from those 49 isolates of *P. griseola* under analysis. In the present study, most isolates showed multiple dsRNA fragments varying from zero to 10, as being the sizes estimated between 0.8 and 4.8 kb. The dsRNA fragment of 4.8 kb from the isolate was efficiently transmitted to the asexual spores. However, not all dsRNA fragments (between 1 and 6) found in the isolate Ig848 were transmitted to monosporic colonies. The cycloheximide was used at concentration of 20 µg/mL in order to obtain the mycovirus cure. This treatment was ineffective for the isolate 29-3, since those three colonies transplanted to cycloheximide during four generations showed the same profile as the total nucleic acids found in the wild isolate. In the case of the isolate Ig848, this same chemical treatment

eliminated the fragments 2.2; 2.0; 1.8; 1.2 and 1.0 kb of the colonies Ch2 and Ch4 after seven successive transplantings in medium containing cycloheximide. Several phytopathogenic fungus are attacked by viral infections, and this variation in the profile of the nucleic acid found in the *P. griseola* isolates is also observed in other plant pathogens. The presence of multiple fragments in only one isolate may be due to the infection by virus with segmented genome, RNA satellite, defective RNA or mixed infections. The efficiency of the transmission by conidia is variable, as depending on the fungus species under consideration, but it is usually near 100% as occurred for the isolate 29-3 of *P. griseola*. Either cure of some dsRNA fragments and the spontaneous loss during conidiogenesis observed for the isolate Ig848 rather indicate the infection by independent replicons. In those isogenic lines with and without some dsRNA fragments, the effect of the viral infection will be evaluated under some aspects such as the sporulation rate, growth and pathogenicity. The characterization of those viruses found in *P. griseola* will allow for further studies concerning to their use in the biological control of the angular leaf spot, which will turn possible to reduce the economical losses caused by this disease in agriculture.