

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

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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*.

APROVADA: 29 de julho de 2008

---

Prof<sup>o</sup>. Francisco Murilo Zerbini Júnior  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Catarina Megumi Kasuya

---

Prof<sup>o</sup>. Everaldo Gonçalves de Barros

---

Prof<sup>o</sup>. Maurício Dutra Costa

---

Prof<sup>a</sup>. Elza Fernandes de Araújo  
(Presidente da Banca)

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida e pela oportunidade de realizar meus sonhos...

A meus pais e meu irmão, pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao Maycon, pelo carinho.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade em realizar o curso de mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, professora Marisa Vieira de Queiroz, pelos ensinamentos e conselhos, pela dedicação e amizade, pela confiança em meu trabalho durante esse período de convivência e, principalmente, pela compreensão. Realmente, não existem palavras para expressar a minha gratidão. Será sempre um exemplo de aprimoramento profissional.

À professora Elza Fernandes de Araújo, exemplo de trabalho e competência, pelo apoio e conselhos.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pelos ensinamentos e pela co-orientação.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, pela preocupação e disposição e pela amizade.

Aos professores Maurício Dutra Costa, Everaldo Gonçalves de Barros e Maria Catarina Megumi Kasuya, pelos conselhos e pela participação na banca de defesa da dissertação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, que contribuíram imensamente para minha formação.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET), aos petianos, amigos que conquistei durante a estadia como bolsista, bem como ao professor Lucio Antonio de Oliveira Campos pela amizade, pelos ensinamentos e valiosos conselhos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial ao José Reinaldo, Evandro, Danilo, Toninho, Paulo, Pablo, Júlio, Virgínia, Laura, Nilcéa, e Rejane, pelo apoio e disposição.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável, como Marcos Soares, Gilvan, Daniel, João Batista, Ireninha, Patrícia, Jildete, Klédna, Rodrigo Barros, Tatiana, Ronney, Francis, Rafael, Guilherme, Darlene, Júnio, Leandro, Ximena, Vivi, Mariana, Jorge, Lara, Leonardo, Rodrigo Siqueira, Michelle, Ana Paula, Juline, Mateus, Leandro L., Fábio, Mariane, Marina, Mariana Fontenelle, Jaqueline, Carolina, Francisco, Felipe, Ana Karina, Juliana, Janaína, Ana

Angélica, Natália, Andréia, e André, meu “muito obrigado” pelo carinho, amizade, preocupação e pela ótima convivência durante esse período de seis anos.

Ao Maycon, pelo apoio, compreensão, dedicação, carinho e amor.

À Polyana e Talita, pela amizade incondicional.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Micorrizas, Microbiologia de Alimentos, Petróleo, Café e Microbiologia Industrial.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão, carinho e respeito.

## **BIOGRAFIA**

Swiany Silveira Lima, filha de Antônio Carlos Gomes Lima e Rita Silveira Lima, nasceu no dia 19 de julho de 1982, em Ubá - Minas Gerais

Em março de 2001, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em bacharelado e licenciatura em outubro de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O patógeno do feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.): <i>Pseudocercospora griseola</i> .....	1
1.2 Vírus em fungos .....	3
1.2.1. Taxonomia de micovírus .....	4
1.2.2. Diversidade de dsRNA .....	6
1.2.3. Infecções múltiplas, vírus satélites e RNA defectivos .....	8
1.2.4. Transmissão natural de dsRNA por meio de conídios e anastomose de hifas .....	9
1.2.5. Efeitos do dsRNA no fenótipo do hospedeiro e controle biológico ..	12
2. OBJETIVO GERAL .....	15
2.1. Objetivos específicos .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1. Microrganismos e condições de cultivo .....	16
3.2. Extração de ácidos nucléicos totais .....	18
3.3. Análise de dsRNA .....	18
3.4. Transmissão dos micovírus por meio dos conídios .....	19
3.5. Cura dos dsRNA .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1. Distribuição de dsRNA em <i>P. griseola</i> .....	20
4.2.1 Transmissão dos micovírus por meio dos conídios .....	23
4.3. Obtenção de linhagens isogênicas .....	27
4.3.1. Cura dos Micovírus .....	27
5. CONCLUSÕES .....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33



## 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.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O patógeno do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): *Pseudocercospora griseola*

A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta grande importância econômica e alimentar para o brasileiro (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2005). O Brasil é considerado o maior produtor mundial de feijão (FAO, 2008), sendo que a produção nacional, em 2007, somou 3,2 milhões de toneladas (IBGE, 2007).

No Brasil, o feijão é alimento indispensável para a população e considerado excelente para a alimentação humana, por ser fonte rica em nutrientes como carboidratos, fibras e sais minerais, além de proteínas com alto teor de lisina (LAJOLO et al., 1996). Também é de grande relevância para o agronegócio, pois, é cultivado em extensas áreas e utiliza grande quantidade de mão-de-obra (VIEIRA et al., 2006).

Apesar de ser uma cultura extremamente importante, sua produtividade tem sido baixa devido a certos fatores, como o ataque de pragas, problemas climáticos, predominância de cultivos associados a outras culturas, falta de nutrientes no solo e a incidência de doenças, entre outros. (VIEIRA et al., 2006).

A mancha-angular, cujo agente etiológico é o fungo *Pseudocercospora griseola* (HALL, 1994), é uma das principais doenças do feijoeiro e ocorre em áreas tropicais e subtropicais. Sua presença foi verificada em países da América Central e América do Sul, África, Ásia, México, Estados Unidos, Espanha, Áustria, Itália, Alemanha, Portugal, França, Grécia e outros, totalizando mais de 60 países no mundo (STENGLEIN et al., 2003).

O fitopatógeno em questão foi, primeiramente, descrito como *Isariopsis griseola*, por Saccardo, em 1878. Em 1909, Ferraris o descreveu como *Phaeoisariopsis griseola*. Classificado no grupo dos Deuteromycotina, este fungo pertence à classe Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Stilbaceae (STENGLEIN et al., 2003). Neste grupo, a reprodução sexual está ausente ou raramente ocorre, razão pela qual é considerado fungo imperfeito (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

Em 2006, Crous e colaboradores reavaliaram a taxonomia de *P. griseola*, ao verificarem que em análises filogenéticas, utilizando a seqüência rDNA 18S, este gênero e o gênero *Pseudocercospora* mantiveram sempre a mesma topologia dentre as 15 árvores mais parcimoniosas. Além disso, comparações das características morfológicas e culturais e análises de seqüências de DNA da região ITS e dos genes da calmodulina e actina confirmaram a proximidade desses dois gêneros. Por este motivo, esses pesquisadores o renomearam como *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun.

No Brasil, a mancha-angular foi a primeira doença do feijoeiro a ser estudada, sendo que, nos últimos anos, vem sendo relacionada a perdas na lavoura que variam de 7 a 70%, dependendo das condições climáticas, tais como temperaturas moderadas entre 16 °C e 28 °C, sendo a temperatura de 24° C considerada ótima para o desenvolvimento da doença; alternância entre curtos períodos de baixa umidade e longos de alta umidade relativa, além da ação dos ventos e chuvas que ajudam a disseminar o patógeno. A incidência de epidemias também depende de fatores, tais como o sistema agrícola utilizado, a suscetibilidade dos cultivares de feijão e a virulência do fungo (ARAUJO et al., 1996). Os sintomas mais comuns da doença são as lesões em formato angular de coloração acinzentada, que posteriormente se tornam castanhas, delimitadas por nervuras - a mancha-angular, que pode ser visualizada em todas as partes aéreas da planta, pois, acomete folhas, frutos, caules e ramos (ARAUJO et al., 1996).

A infecção por este patógeno se inicia com a deposição dos conídios na superfície foliar. Em três dias, há germinação e lançamento do tubo germinativo, que forma uma estrutura semelhante a um apressório. A penetração ocorre através do estômato e as hifas crescem, intercelularmente, nos espaços aéreos das células do mesófilo. No início da infecção, a membrana plasmática e a parede celular do hospedeiro permanecem intactas. Os danos à célula hospedeira (plasmólise celular, desintegração da membrana plasmática e desorganização do citoplasma) são observados entre três a sete dias após a inoculação do patógeno. As hifas não são capazes de penetrar intracelularmente, mas crescem no meio intercelular, destruindo as células da planta, provavelmente devido à produção de toxinas. Posteriormente, há formação de estroma do qual emergem os conidióforos (MONDA et al., 2001)

O fungo *P. griseola* é apontado como detentor de ampla variabilidade genética. NIETSCHE et al. (2001) avaliaram 31 isolados do Estado de Minas Gerais e os classificaram em 13 patótipos diferentes. Em 2002, Nietsche e colegas. caracterizaram 26 patótipos diferentes entre os 72 isolados analisados (em média, um patótipo para cada três isolados), cujos patótipos mais freqüentes foram 63.31, 63.23, 63.55, 63.39 e 63.47. Esses dados confirmam a alta variabilidade deste fitopatógeno.

A ocorrência de ampla variabilidade no patógeno tem dificultado o desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular. Por esta razão, a maioria dos cultivares com grãos do tipo carioca plantados em Minas Gerais são, em menor ou maior grau, susceptíveis à mancha-angular (ABREU & RAMALHO, 2005).

A mancha-angular pode ser controlada com boas práticas culturais, por meio do uso de sementes certificadas livres do patógeno, eliminação de restos culturais e rotação de culturas, emprego de fungicidas, sendo que a resistência genética da planta hospedeira é a estratégia mais importante no controle desta moléstia (STENGLER et al., 2003). O controle biológico poderia ser uma alternativa na tentativa de diminuir os danos causados pelo patógeno, mas até o momento não foi identificado algum organismo que possa ser usado no biocontrole de *P. griseola*.

## 1.2 Vírus em fungos

O primeiro relato de um vírus infectando fungo foi feito na década de 50, quando se observou que as culturas do cogumelo *Agaricus bisporus* apresentavam sintomas, como morfologia alterada, deterioração tecidual prematura e redução na produção. Essa doença ficou conhecida como “La France disease” (LEMKE & NASH, 1974). Múltiplas viroses estão relacionadas a este fenômeno, pois, em esporos, foram verificadas partículas esféricas de 19, 25, 29, 35, 50nm de diâmetro, além de partículas baciliformes de 19 até 50 nm (SRISKANTHA et al., 1986).

Os vírus de fungos, também chamados de micovírus ou partículas semelhantes a vírus (*Virus-Like Particles* -VLPs), são amplamente difundidos. Grande parte destes apresenta genoma de RNA dupla fita (dsRNA), que pode estar envolvido por capsídeo ou não (GHABRIAL, 1998).

### 1.2.1. Taxonomia de micovírus

De acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), a taxonomia viral se baseia em propriedades fenotípicas e genotípicas, como a morfologia da partícula viral, tipo e organização do genoma e estratégia de replicação viral.

A atual taxonomia distribui os micovírus em nove famílias (*Metaviridae*, *Pseudoviridae*, *Narnaviridae*, *Barnaviridae*, *Hypoviridae*, *Totiviridae*, *Chrysoviridae*, *Partitiviridae* e *Reoviridae*) e o gênero *Rhizidiovirus*, que não está incluso em nenhuma família (FAUQUET et al., 2005). As principais características de cada família são descritas a seguir (MERTENS, 2004; FAUQUET et al., 2005).

*Metaviridae* - retrovírus com genoma de RNA fita simples, polaridade positiva e tamanho variando entre 4 a 10 kb ou mais e apresentam VLPs. Membros desta família infectam vertebrados, invertebrados, plantas e fungos. Exemplo: *Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus*.

*Pseudoviridae* - também é uma família de retrovírus com genoma de RNA fita simples, polaridade positiva com tamanho entre 5 a 9 kb, que apresenta VLPs. São encontrados em fungos, plantas e invertebrados. Exemplo: *Saccharomyces cerevisiae Ty1 virus*.

*Narnaviridae* - o genoma é composto por uma molécula de RNA fita simples, polaridade positiva, com tamanho entre 2,3 a 2,9 kb, sendo o material genético não associado a um capsídeo. Membros desta família estão distribuídos em dois gêneros: *Narnavirus* que infectam *Saccharomyces cerevisiae* e *Mitovirus*, que são encontrados em mitocôndrias e comumente infectam *Cryphonectria parasitica* e *Ophiostoma novo-ulmi*. Exemplos: *Cryphonectria mitovirus 1* e *Saccharomyces narnavirus 20S RNA*.

*Barnaviridae* - esta família é representada por apenas um membro, o *Mushroom bacilliform vírus*, que infecta *Agaricus bisporus*. A partícula viral é baciliforme, contendo uma molécula de RNA fita simples, polaridade positiva, com tamanho de aproximadamente 4 kb.

*Hypoviridae* - apresenta genoma com apenas um fragmento linear de dsRNA com tamanho entre 9 e 13 kb. O dsRNA está associado a membranas, formando vesículas pleomórficas com o diâmetro variando entre 50 a 80 nm.



Alguns membros desta família causam hipovirulência no hospedeiro. Os vírus desta família infectam fungos. Exemplo: *Cryphonectria hypovirus 1* (MERTENS, 2004; FAUQUET et al., 2005)

*Totiviridae* - os vírus desta família infectam fungos e protozoários. O capsídeo apresenta simetria icosaédrica, com diâmetro variando entre 30 a 40 nm. Apresentam genoma com apenas um fragmento de dsRNA, sendo que o tamanho pode variar entre 4,6 a 7 kb. Há relatos de que dsRNAs satélites e defectivos podem estar presentes. Exemplos: *Helminthosporium victoriae virus 190S*, *Saccharomyces cerevisiae virus L-A* e *Ustilago maydis vírus*.

*Chrysoviridae* - apresenta genoma com quatro fragmentos lineares de dsRNA de 2,4 a 3,6 kb, que são montados separadamente. O capsídeo é icosaédrico com o diâmetro variando entre 35 a 40 nm. Membros desta família infectam apenas fungos. Exemplo: *Penicillium chrysogenum virus*.

*Partitiviridae* - fungos e plantas podem ser hospedeiros de vírus desta família, que possui genoma com dois fragmentos de dsRNA geralmente similares (1,4 a 3,0 kb), sendo que também podem estar presentes dsRNA satélites e defectivos. São vírus isométricos com o diâmetro variando entre 30 a 40 nm. Exemplo: *Fusarium poae virus*.

*Reoviridae* - o genoma pode apresentar 10, 11 ou 12 fragmentos de dsRNA, cujos tamanhos variam entre 732 pb e 4.127pb; o capsídeo possui simetria icosaédrica com o diâmetro variando entre 70 a 90 nm. Espécies desta família apresentam uma ampla distribuição nos seres vivos, podendo infectar fungos, plantas, artrópodes (insetos, aranhas e crustáceos), além de vertebrados (peixes, répteis, pássaros e mamíferos). O gênero *Mycoreovirus* foi descrito infectando fungos, como é o caso de *Mycoreovirus 1* e *Mycoreovirus 2*, que infectam *Cryphonectria parasitica* e o *Mycoreovirus 3* que infecta *Rosellinia necatrix*.

O gênero *Rhizidiovirus* engloba vírus de DNA dupla fita linear com 25,5 kb de tamanho, partículas virais isométricas de 60 nm de diâmetro. Este gênero infecta fungos, sendo que o *Rhizidiomyces virus* infecta somente o fungo *Rhizidiomyces*.

## 1.2.2. Diversidade de dsRNA

As partículas semelhantes a vírus estão presentes em cerca de 30 % de todas as espécies de fungos conhecidas (BUCK, 1986, citado por BOGO et al. 1996). Diversos fungos fitopatogênicos são acometidos por infecções virais. Alguns exemplos constam na Tabela 1.

**Tabela 1:** Fungos fitopatogênicos que apresentam micovírus

<b>FUNGO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<i>Botrytis cinerea</i>	CASTRO et al., 2003
<i>Chalara elegans</i>	PARK et al., 2006
<i>Cryphonectria parasitica</i>	NUSS, 1992
<i>Diaporthe ambigua</i>	PREISIG et al., 2000
<i>Discula destructiva</i>	RONG et al., 2001
<i>Flammulina velutipes</i>	MAGAE & HAYASHI, 1999
<i>Fusarium graminearum</i>	CHU et al., 2002
<i>Fusarium poae</i>	COMPEL et al., 1998
<i>Fusarium solani</i>	NOGAWA et al., 1996
<i>Gremmeniella abietina</i>	TUOMIVIRTA & HANTULA, 2003
<i>Helicobasidium mompa</i>	OSAKI et al., 2004
<i>Helminthosporium victoriae</i>	HUANG & GHABRIAL, 1996
<i>Magnaporthe grisea</i>	CHUN & LEE, 1997
<i>Monilinia fructicola</i>	TSAI et al., 2004
<i>Monosporascus cannonballus</i>	BATTEN et al., 2000
<i>Nectria radicola</i>	AHN & LEE, 2001
<i>Rosellinia necatrix</i>	ARAKAWA et al., 2002
<i>Rhizoctonia solani</i>	ROBINSON & DEACON, 2002
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	ZHOU & BOLAND, 1997, 1998; DENG & BOLAND, 2006
<i>Sclerotinia minor</i>	MELZER & BOLAND, 1996
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	XIE et al., 2006
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	STEENKAMP et al., 1998; PREISIG et al., 1998

A análise da presença dos vírus em fungos baseia-se, principalmente, na detecção do dsRNA a partir da extração de ácidos nucléicos totais, purificação do dsRNA e separação por meio de eletroforese em gel de agarose. No entanto, evidências sugerem que o dsRNA pode estar presente em quantidades abaixo do nível de detecção por estes métodos, o que pode

subestimar a população desses elementos (BOLAND, 2004). A microscopia eletrônica também é uma metodologia freqüentemente usada para a detecção de partículas semelhantes a vírus (PREISIG et al., 2000). Estes métodos são, geralmente, usados em consórcio.

A distribuição desses elementos dentro das populações fúngicas mostra-se extremamente variada. Em *Rhizoctonia solani*, todos os isolados analisados apresentaram dsRNA, enquanto, em *Rosellinia necatrix*, *Aspergillus* da população Black e *Fusarium graminearum*, os vírus estavam presentes em 21,8 %, 10 % e 4,5 % dos isolados, respectivamente (ARAKAWA et al., 2002; CHU et al., 2002; ROBINSON & DEACON, 2002; VAN DIEPENINGEN et al., 2006). Em *Discula destructiva*, dsRNAs foram encontrados em 67 dos 73 isolados avaliados, provenientes da Carolina do Sul e do Alabama nos Estados Unidos, cujo número de bandas variou de zero a sete e o tamanho de 0,3 a 12 kb. Variações tanto no número de bandas de dsRNA quanto no tamanho das moléculas (2 Kb a 10 Kb, ou mais) também foram encontradas em 23 isolados de *Helicobasidium mompa* (RONG et al., 2001; OSAKI et al., 2004).

A diversidade presente entre os vírus de dsRNA em fungos é geralmente determinada, comparando-se o tamanho molecular em gel de agarose, Northern blot e sequenciamento do genoma dos micovírus (DAWE & NUSS, 2001; CHU et al., 2002; PARK et al. 2006).

A relação genética entre os múltiplos fragmentos de dsRNA, que variam de 2 a 12 kb, em 21 isolados de *Chalara elegans*, foram averiguadas por hibridização, usando-se sondas de cDNA derivadas dos fragmentos de 5,3 kb das linhagens AK89-2, CKP e OR1, e de 5,3 e 12 kb da linhagem NC1527. Todos os clones de cDNA hibridizaram com o fragmento de dsRNA específico em cada linhagem analisada, indicando que os diferentes fragmentos presentes no mesmo isolado não apresentam similaridade entre si. Além disso, esses clones de cDNA somente hibridizaram com fragmentos de dsRNA das linhagens, que eram originadas de regiões geográficas similares, como é o caso do clone AK89-2C1 derivado da linhagem AK89-2 que hibridiza com fragmentos de tamanhos similares em todos os isolados do Arkansas, sugerindo a presença de seqüências similares. Neste caso, é evidente que a distribuição dos grupos de hibridização de dsRNA está, diretamente, relacionada à distribuição geográfica do fungo hospedeiro (PARK et al., 2006)

Outros trabalhos também demonstraram a diversidade de dsRNA presente em fungos, como *Helicobasidium mompa*, *Rosellinia necatrix* (IKEDA et al., 2004), *Cryphonectria parasitica* isolados da América do Norte, China e Japão (PEEVER et al., 1997; PEEVER et al., 1998), bem como em isolados dos fungos *Cryphonectria parasitica* e *Cryphonectria nitschkei* do Japão e China (LIU et al., 2007).

### 1.2.3. Infecções múltiplas, vírus satélites e RNA defectivos

Em muitos fungos, os vírus apresentam múltiplos fragmentos resultando um padrão de bandejamento de dsRNA complexo, que pode ocasionar confusão na interpretação da organização e natureza dos genomas virais (GHABRIAL, 1998). A maior parte dos micovírus é encontrada como múltiplos fragmentos de dsRNA, que podem ser o resultado da presença de RNA satélite, RNA defectivo ou, muitas vezes, de infecções mistas, onde dois ou mais vírus não relacionados infectam o mesmo isolado (NUSS & KOLTIN, 1990; GHABRIAL, 1998; PREISIG et al., 1998; DAWE & NUSS, 2001).

Múltiplas infecções virais podem acometer patógenos de plantas, como é o caso do fungo *Helicobasidium mompa* e *Sphaeropsis sapinea*, patógeno de *Pinus* spp. O primeiro apresenta uma coinfeção por dois partitivírus diferentes, relatada pela primeira vez. No segundo, ocorre a coinfeção com dois vírus distintos de RNA dupla fita, SsRV1 e SsRV2, pertencentes à família *Totiviridae*, pois, a identidade entre a proteína capsidial e a RNA polimerase dependente de RNA foi de apenas 38 % e 36 %, respectivamente (OSAKI et al., 2004; PREISIG et al., 1998).

A presença de vírus satélite e fragmentos defectivos já foi verificada no isolado GH2 de *Cryphonectria parasitica*, que apresenta quatro dsRNAs, sendo que o dsRNA1 constitui o genoma do *Cryphonectria parasitica hypovirus 3-Grand Haven 2* (CHV3-GH2), um membro da família *Hypoviridae*. A técnica de hibridização foi empregada, para analisar a relação entre estes fragmentos de dsRNA e constatou-se que todos os clones de cDNA do dsRNA1 hibridizaram com o dsRNA1 genômico e com o dsRNA2, mas não com o dsRNA 3 e 4. Além disso, o dsRNA2 possui uma deleção em relação ao dsRNA1 e, por este motivo, representa uma forma defectiva deste. Já os dsRNAs 3 e 4 são considerados vírus satélites (HILLMAN et al., 2000).

VAN DIEPENINGEN et al. (2006) sugeriram que os micovírus podem estar acompanhados por vírus satélites ou fragmentos defectivos devido ao padrão de dsRNA observado nas linhagens de *Aspergillus* da população Black, na qual fragmentos de 4,4 e 3,2 kb são encontrados sozinhos ou em associação com outros dsRNAs, bem como há um grande número de combinações tanto no tamanho (variando de 0,8 a 4,4 kb) quanto no número de fragmentos.

Também, em isolados hipovirulentos de *Sclerotinia homoeocarpa* foram identificados dois dsRNA geneticamente distintos, L-dsRNA e S-dsRNA. O último pode ser considerado um vírus satélite, pois, está presente somente em alguns isolados hipovirulentos e a análise de sua seqüência confirmou o resultado obtido pela hibridização, evidenciando que o S-dsRNA não é derivado do L-dsRNA, além de não possuir informação genética necessária para codificar uma RNA polimerase dependente de RNA (DENG & BOLAND, 2004).

Igualmente, nas leveduras *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces* e no fungo dimórfico *Ustilago*, a presença de RNA satélite já foi verificada (SCHMITT & BREINIG, 2002). Em *S. cerevisiae*, muitas linhagens contêm um vírus de dsRNA pertencente à família *Totiviridae* e chamado L-A, que pode estar acompanhado por um dsRNA satélite chamado M dsRNA, que codifica uma toxina (toxina Killer) com atividade antimicrobiana. Estes vírus satélites dependem da coexistência com o vírus auxiliar para replicar e manterem-se no interior da célula infectada (WICKNER, 1996).

#### **1.2.4. Transmissão natural de dsRNA por meio de conídios e anastomose de hifas**

Os micovírus são transmitidos por anastomose entre hifas, que apresentam compatibilidade vegetativa, sendo que neste processo há formação de uma ponte citoplasmática através da qual ocorre a transferência dos micovírus (McCABE et al., 1999). Esse reconhecimento vegetativo é controlado por um sistema de incompatibilidade vegetativa, que permite a viabilidade do heterocário formado, somente, quando as linhagens possuem alelos idênticos para todos os locos, pois, ao contrário, as células heterocarióticas formadas são rapidamente destruídas (SAUPE, 2000).

A transmissão horizontal por meio da anastomose de hifas já foi verificada em *Nectria radicola*, em que a linhagem curada de NcCy9201 foi transformada com o gene que confere resistência a higromicina e o transformante T-1 obtido foi utilizado como linhagem receptora em experimento de transmissão do L1dsRNA presente na linhagem doadora CY9201. A aquisição do RNA dupla fita por T-1 foi confirmada por *Northern blot* e a presença do gene que confere resistência à higromicina por *Southern blot*. O transformante T-1 contendo dsRNA restaurou as características comuns à linhagem doadora, tais como a habilidade de esporulação, a morfologia e cor intensa da colônia, a atividade intracelular e extracelular de lacase, além de a virulência deste fitopatógeno também ser restabelecida, o que demonstrou claramente que L1dsRNA é responsável pelo aumento da virulência de *Nectria radicola* (AHN & LEE, 2001).

Outros fungos também já tiveram a transmissão horizontal de micovírus analisada, como é o caso de *Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico, no qual foi induzida a formação do heterocário e a obtenção de linhagens recombinantes por meio do ciclo parassexual, em que bandas extras de dsRNA foram encontrados em alguns destes (DALZOTO et al., 2006). Também foi verificada a transmissão por anastomose entre hifas nos basidiomicetos *Heterobasidion annosum* (IHRMARK et al., 2002) e *Helicobasidium mompa* (SUZAKI et al., 2003).

Há poucos relatos sobre a habilidade de dispersão dos micovírus entre espécies de fungos diferentes. A transmissão de vírus entre espécies de populações naturais de fungos do gênero *Cryphonectria*, em que o *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1), comum em *Cryphonectria parasitica*, foi encontrado em dois isolados de *Cryphonectria* sp., cuja análise filogenética demonstrou que os vírus nas duas espécies são muito relacionados. Além disso, foi provado, experimentalmente, que CHV-1 pode ser transmitido por anastomose de hifas entre espécies diferentes. A transmissão em populações naturais se deve ao fato de serem espécies simpátricas, pois, há oportunidade de contato físico na natureza (LIU et al., 2003). Este fenômeno também foi verificado no gênero *Sclerotinia*, em que ocorreu a transmissão interespecífica de um RNA dupla fita associado ao fenótipo de hipovirulência do isolado Ss275 de *Sclerotinia sclerotiorum* para o isolado Sm10 de *Sclerotinia minor*. A transmissão foi confirmada por meio da redução da virulência do isolado

receptor, detecção do dsRNA de Ss275 por eletroforese em gel de agarose e por hibridização, além do genótipo de *Sclerotinia minor* ser confirmado por análise, usando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (MELZER et al., 2002).

Os micovírus também podem ser transmitidos durante a divisão celular e a esporogênese, mas não apresentam uma fase extracelular, sendo incapazes de penetrar e lisar as células hospedeiras devido à rigidez da parede celular do fungo. Até o momento, não é conhecido nenhum vetor natural que possa transmitir os micovírus (GHABRIAL, 1998).

Em muitos ascomicetos, a taxa de transmissão vertical de dsRNA para esporos assexuais é muito alta e, geralmente, próxima a 100 % (IHRMARK et al., 2002). Entretanto, a transmissão por meio dos ascósporos é reduzida, chegando mesmo a ser nula (IHRMARK, 2001).

Em *Epichloë festucae*, um ascomiceto, foi verificado 100 % de transferência de dsRNA para os conídios, pois, todos os 42 isolados monospóricos da linhagem P23 e os 22 da linhagem V5 continuaram infectados com o vírus Efv1 e apresentando dsRNA de 5 kb e 3 kb, respectivamente. A transmissão para ascósporos foi extremamente ineficiente, pois, o dsRNA não foi encontrado na progênie de 16 ascósporos deste fungo (ROMO et al., 2007). A transmissão de micovírus para o conídio foi muito eficiente em *Chalara elegans*, pois, todas as colônias monospóricas das linhagens BK18, CKP e NC1527 mantiveram o mesmo padrão de bandas de RNA dupla fita presentes nas linhagens originais (PARK et al., 2006). Em *Magnaporthe grisea*, entretanto, o dsRNA foi transmitido verticalmente para apenas 10 % da progênie de ascósporos (CHUN & LEE, 1997).

O primeiro relato da transmissão vertical de dsRNA por meio de conídios em basidiomicetos foi demonstrado em *Heterobasidion annosum*, em que apenas 3 % dos conídios do isolado 95163 e 55 % do isolado Si9 receberam o dsRNA (IHRMARK et al., 2002). No entanto, a taxa de transmissão para basidiósporos foi em média de 40 % devido a variações encontradas na presença de dsRNA entre os cinco corpos de frutificação testados (IHRMARK et al., 2004).

### 1.2.5. Efeitos do dsRNA no fenótipo do hospedeiro e controle biológico

Em geral, os dsRNA são crípticos (latentes) em relação aos efeitos provocados do fungo hospedeiro, mas há relatos de que eles podem influenciar a biologia de seu hospedeiro, provocando alterações morfológicas como redução da pigmentação e esporulação, sinais de degeneração, hiper ou hipovirulência e outros sintomas (McCABE et al., 1999).

Diferenças na taxa de crescimento do micélio, menor produção de micotoxina e uma redução dos sintomas da doença foram detectadas, quando o fungo *Fusarium graminearum* infectado era inoculado na planta (CHU et al. 2002). Ao inocularem a linhagem CKg54 de *Botrytis cinerea*, livre de vírus, com micovírus presente na linhagem CCg425, foi demonstrado pela primeira vez, que os micovírus estão associados à hipovirulência neste fitopatógeno, mas o mecanismo molecular que leva à redução de virulência ainda não foi identificado (CASTRO et al., 2003).

O fenômeno de hipovirulência mediado por micovírus tem sido descrito para patógenos de plantas infectados por membros das famílias *Reoviridae* (*Rosellinia necatrix* e *Cryphonectria parasitica*, ambos ascomicetos); *Totiviridae* e *Chrysoviridae* (*Helminthosporium victoriae*, um ascomiceto); *Hypoviridae* (*Cryphonectria parasitica*); *Nanarviridae* (*Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi*, todos ascomicetos). Os micovírus que infectam os fungos *Diaporthe perijuncta* (ascomiceto), *Rhizoctonia solani* (basidiomiceto) e *Fusarium graminearum* (ascomiceto) ainda não foram classificados em família (NUSS, 2005).

Por estarem associados ao fenômeno de hipovirulência, os micovírus apresentam uso potencial no biocontrole de fungos fitopatogênicos. Este fato reside na habilidade de transferência do vírus de um isolado hipovirulento para um isolado virulento de um patógeno visando à redução da virulência, além de ocasionar uma diminuição da esporulação e sobrevivência do organismo. Apesar de muitos trabalhos relatarem a hipovirulência associada a fungos fitopatogênicos, poucos a utilizam como uma estratégia de biocontrole (BOLAND, 2004).

Um exemplo da atenuação da virulência do fungo mediada por micovírus é a utilização de linhagens hipovirulentas do patógeno *Cryphonectria parasitica*, agente etiológico do cancro em castanheiras (*Castanea* sp.), no controle



biológico, com o objetivo de diminuir o impacto da doença no ambiente (NUSS, 1992; DAWE & NUSS, 2001; MILGROOM & CORTESI, 2004).

Essa doença foi descoberta em 1904, na cidade de Nova York, ao provocar desastres ecológicos em castanheiras americanas (*Castanea dentata*), pois, o agente etiológico foi introduzido acidentalmente na América a partir da Ásia. Similarmente, em 1938, essa doença foi identificada em *Castanea sativa* na Itália e rapidamente se espalhou por toda Itália e sul da Europa (MILGROOM & CORTESI, 2004).

Na Europa, populações de *C. parasitica* são caracterizadas por alta incidência de infecção e pouca diversidade de compatibilidade vegetativa, sendo fenômeno usado, com sucesso, para reduzir a severidade do cancro em castanheiras. Na América do Norte, ao contrário, repetidos esforços na tentativa de estabelecer o controle biológico mediado por hipovirulência, pela introdução artificial de linhagens hipovirulentas, não obtiveram sucesso. Este contraste presente no controle biológico mediado por hipovírus, na Europa e América do Norte, é atribuído a diferenças na suscetibilidade das castanheiras européias e norte-americanas, diferenças na estrutura populacional do patógeno em duas áreas geográficas distintas, além de diferenças nas propriedades das hipovirose (DAWE & NUSS, 2001).

O controle biológico com a utilização de micovírus foi demonstrado também em *Sclerotinia minor*, em que a severidade da doença foi suprimida em mais de 50 %, sendo que o número de esclerócios produzidos em tecidos tratados foram reduzidos em até 90 %. Em *Sclerotinia homoeocarpa*, a eficiência do biocontrole atingiu 90 % e 80 % em condições controladas e de campo, respectivamente, sendo esta eficiência comparável ao tratamento com fungicidas (BOLAND, 2004).

Outro aspecto que tem chamado a atenção para o fenótipo de hipovirulência, associada com dsRNA em fungos fitopatogênicos, é a possibilidade de propiciar um aumento no conhecimento dos mecanismos de ação, pelos quais os micovírus influenciam a fisiologia e vias regulatórias em seus hospedeiros (ZHOU & BOLAND, 1997).

As alterações fenotípicas provocadas pela presença do micovírus podem ser observadas e avaliadas, após a obtenção de linhagens isogênicas com a cura de micovírus, devido ao tratamento com cicloheximida, transferência do vírus de uma linhagem infectada para não-infectada por anastomose ou via

fusão de protoplastos no caso de linhagens incompatíveis (VAN DIEPENINGEN et al., 2006).

A fusão de protoplastos com intuito de transmissão de dsRNA intra e inter-especificamente foi realizada em populações de *Aspergillus* (PINGYAN & KAIYING, 1987; VAN DIEPENINGEN et al., 1998). Foi testada a fusão de protoplastos entre linhagens pertencentes à população de *Aspergillus* Black (doadores) e *Aspergillus nidulans* (receptores), sendo que dentre as 16 combinações, somente uma falhou. *A. nidulans* foi utilizado, com sucesso, como doador na transferência por fusão de protoplasto para *A. niger* e *A. tubingensis*, bem como entre os grupos de incompatibilidade vegetativa (VAN DIEPENINGEN et al., 1998).

Em *Sclerotinia homeocarpa*, isolados curados usando cicloheximida não continham concentrações de dsRNA detectáveis, além de desenvolverem a morfologia típica de isolados não infectados e terem a virulência resgatada (ZHOU & BOLAND, 1997). Em *Rizoctonia solani*, a cura foi restrita aos fragmentos de menor tamanho (1,0; 1,4 e 6.5 kb), mas os fragmentos maiores de 10 e 12 kb não foram afetados (ROBISON & DEACON, 2002).

Recentemente, foi detectado, pela primeira vez, micovírus em *P. griseola*. Foi verificada a presença de fragmentos de ácidos nucléicos, com tamanho variando entre 4800 pb a 800 pb, enquanto a confirmação da natureza de dsRNA foi obtida após tratamentos com DNase, RNase A e nuclease S1. Além disso, a presença de partículas virais com diâmetro em torno de 40nm foi comprovada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (LIMA, 2006).

Com este trabalho, pretende-se caracterizar os dsRNA presentes neste patógeno, para que num futuro próximo haja disponibilidade de uma nova ferramenta no combate à mancha-angular do feijoeiro comum, o controle biológico de *P. griseola* mediado por micovírus, que poderá reduzir as perdas econômicas causadas por este patógeno na lavoura.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar micovírus presentes em isolados do fungo *Pseudocercospora griseola*.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Determinar a distribuição de dsRNA em *P. griseola*;
- Investigar a transmissão vertical por meio de conídios; e
- Obter linhagens isogênicas pela cura de micovírus.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

#### **3.1. Microrganismos e condições de cultivo**

Neste trabalho, foram utilizados 49 isolados do fungo *P. griseola* (Tabela 2), gentilmente cedidos por Everaldo Gonçalves de Barros, professor no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, bem como por Aloísio Sartorato, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, localizada na cidade Santo Antônio de Goiás, Goiás. O fungo foi cultivado em meio de cultivo de polpa de tomate sólido (200 mL de polpa de tomate, 3g de carbonato de cálcio, 15g de ágar) a 24 °C.

**Tabela 2:** Isolados de *Pseudocercospora griseola*

Isolados	Número de fragmentos de dsRNA
29-3	1
A2 4	7
A6 9	5
A6 10	5
B1 46	9
B2 9	4
B3 16	9
B4 6	3
B4 8	0
B7 17	9
Canaã Marcela <sub>1</sub> 2	1
Canaã Marcela <sub>3</sub> 11	3
C1 17	10
Coimbra 1-7	5
Ig 397-1	6
Ig 410-5	1
Ig 419-3	0
Ig 419-6	0
Ig 478-2	0
Ig 848	8
Ig 1018	1
Ig 1024	2
Ig 1028	0
Ig 1033	0
Ig 1038	2
Ig 1043	0
Ig 1053	8
Ig 1111	0
Ig 1118	0
Ig 1125	0
Ig 1132	0
Ig 1139	0
Ig 1153	3
Ig 1175	0
Ig 1180	1
Ig 1194	5
Ig 1204	0
Ig 1205	3
Ig 1206	0
Ig 1207	0
Ig 1209	2
Ig 1213	0
Ig 1214	6
Ig 1218	2
Ig 1261	4
Ig 1269	7
Ig 1273	1
Ig 1279	6
Ig 1285	1
Ig 1291	0
Ig 1297	5

### **3.2. Extração de ácidos nucleicos totais**

Para extração de ácidos nucleicos totais, os esporos e fragmentos de micélio de cada isolado foram inoculados em meio GPYECH líquido (ANSARI et al., 2004) e mantidos à temperatura de 24 °C durante dez a doze dias. O micélio foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -20 °C. A extração de ácidos nucleicos totais dos isolados de *P. griseola* foi realizada, segundo protocolo estabelecido por SPECHT et al. (1982), com modificações.

O micélio foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó e, então, adicionado a 15 mL de tampão para extração (200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM NaCl; 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA e 2% SDS). A amostra foi incubada durante 20 minutos a 70 °C. Igual volume de clorofórmio-álcool-isoamílico foi acrescentado, homogeneizado e incubado no gelo durante 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000g durante 30 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionado igual volume de isopropanol, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 2000 g durante 5 minutos. Após secar à temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspensionado em 2,4 mL de água contendo dietilpirocarbonato (DEPC), sendo depois distribuído em três tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL. Meio volume de acetato de amônio 7,5M foi acrescentado, homogeneizado, incubado durante uma hora no gelo e centrifugado a 12000 g durante 30 minutos. Ao sobrenadante, igual volume de fenol-clorofórmio foi adicionado, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos; à fase superior coletada, foi adicionado igual volume de clorofórmio e, novamente, homogeneizado e centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante foi precipitado com a concentração final de 100 mM de NaCl e igual volume de isopropanol durante, no mínimo, duas horas. A amostra foi centrifugada a 12.000 g durante 5 minutos. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em água DEPC.

### **3.3. Análise de dsRNA**

Para verificar a presença e distribuição de dsRNA, os ácidos nucleicos totais dos isolados de *P. griseola* (Tabela 2) foram submetidos à eletroforese

em gel de agarose 0,8 % contendo brometo de etídeo na concentração de 0,2 µg/mL, examinados sob luz ultravioleta, sendo a imagem captada pelo sistema de captação de imagem Eagle Eye II (Stratagene) (VAN DIEPENINGEN et al., 2006). Os tamanhos dos fragmentos de dsRNA foram estimados, utilizando-se o marcador de tamanho 1kb DNA Ladder (Promega).

#### **3.4. Transmissão dos micovírus por meio dos conídios**

Para determinar a taxa de transmissão de dsRNA por meio dos conídios, aplicou-se o método descrito por CHU et al. (2002), com algumas modificações. Culturas dos isolados 29-3 e Ig848 crescidas a 24 °C, durante 10 dias, em meio de polpa de tomate, foram utilizadas a fim de obter uma suspensão de esporos, que foi diluída e plaqueada em meio GPYECH sólido (ANSARI et al., 2004). Os conídios germinados foram observados sob microscópio invertido (modelo OLYMPUS IX70) e aqueles que se encontravam isolados foram marcados. Após uma semana de incubação à temperatura de 24 °C, as colônias crescidas a partir de um único esporo foram transferidas para um novo meio de polpa de tomate. Cada colônia monospórica teve seu ácido nucléico total extraído, utilizando-se o método descrito no ítem 3.3 para análise do perfil de fragmentos de dsRNA.

#### **3.5. Cura dos dsRNA**

Na tentativa de obter a cura de micovírus dos isolados 29-3 e Ig848, as seguintes concentrações de cicloheximida foram testadas: 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL.

Em meio de polpa de tomate contendo 20 µg/mL de cicloheximida,  $1 \times 10^4$  conídios foram semeados e incubados por 15 dias a 24 °C. As colônias crescidas foram transferidas, por meio da excisão da extremidade das culturas, para novo meio contendo a mesma concentração de cicloheximida e crescidas durante 15 dias. Transferências consecutivas foram repetidas por quatro e sete gerações. A verificação da presença de dsRNA foi realizada, conforme descrito no item 3.3.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Distribuição de dsRNA em *P. griseola*

O padrão de bandejamento de 49 isolados de *P. griseola* é apresentado na Figura 1. Os fragmentos de dsRNA de vários tamanhos foram encontrados em 31 (63,3 %) dos isolados analisados, sendo que o número de bandas variou de 0 a 10 (Tabela 2). Os tamanhos das bandas foram estimados entre 0,8 e 4,8 kb.

A grande intensidade de algumas bandas indica que fragmentos com tamanhos semelhantes migraram juntos, não sendo visualizados separadamente no gel de agarose utilizado (CASTRO et al., 1999).

O perfil dos fragmentos de dsRNA mostrou-se bastante variável. O maior fragmento presente no isolado 29-3 também estava presente em 19 outros isolados: B146, B29, B717, Canaã Marcela 311, Ig1205, A69, A610, B316, B46, Ig1153, Ig1269, Ig397-1, Ig1214, C117, Ig1053, Ig1180, Ig1209, Ig1261 e Ig1285.

O fragmento de aproximadamente 4,2 kb foi observado em 18 isolados: B146, B29, B717, Coimbra 1-7, Ig1024, Ig1038, A24, A69, A610, B316, B46, Ig1153, Ig397-1, Ig1214, Ig1218, C117, Ig1053, Ig1205.

Os isolados 29-3 e Ig1285; Ig1218, Ig1024 e Ig1038; B46, Ig1153 e Ig1205; Ig397-1 e Ig1214; B146 e B316 apresentaram o mesmo perfil de ácidos nucléicos totais contendo um, dois, três, seis e nove fragmentos de dsRNA, respectivamente.

As três bandas com tamanhos de 2,2; 2,0 e 1,8 foram observadas, migrando juntas nos isolados Ig1279, B146, A24, B316, Ig1269, C117, Ig1053 e Ig1297.

Cerca de 30 % de todas as espécies de fungos apresentam infecção por micovírus, segundo BUCK (1986), citado por BOGO et al. (1996). Diversos fungos fitopatogênicos são acometidos por infecções virais, sendo que essa variação no perfil de ácidos nucléicos presentes nos isolados de *P. griseola* também é observada em outros patógenos de plantas.

OSAKI et al. (2004) observaram variação tanto no número de bandas de dsRNA quanto no tamanho das moléculas (variando de 2 Kb a 10 Kb), ao

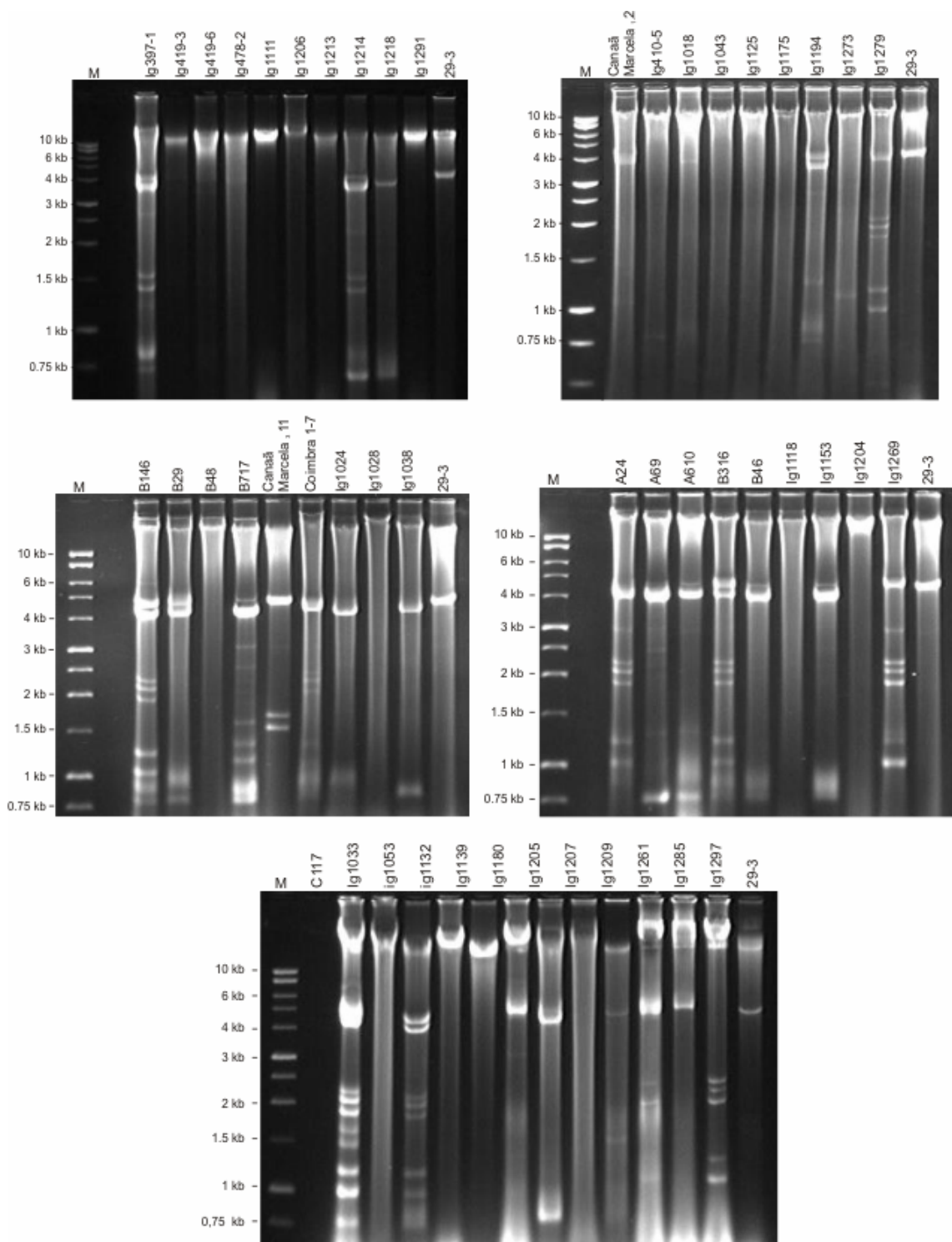


analisarem 23 isolados de *Helicobasidium mompa*. A mesma variação foi encontrada em *Discula destructiva*, em que dsRNAs foram encontrados em 67 dos 73 isolados avaliados, provenientes da Carolina do Sul e do Alabama, Estados Unidos. O número de bandas variou de zero a sete e o tamanho de 0,3 a 12 kb. Em *Monilinia fructicola*, dentre os 49 isolados analisados, 36 continham dsRNA, sendo que alguns isolados continham até 9 fragmentos (TSAI et al., 2004).

Esta distribuição tem sido extremamente variável em outros fungos, como *Rosellinia necatrix* (21,8%), *Aspergillus* da população Black (10%), *Fusarium graminearum* (4,5%) e *Rizoctonia solani*, em que todos os isolados analisados apresentaram dsRNA (ARAKAWA et al., 2002; VAN DIEPENINGEN et al., 2006; CHU et al. 2002; ROBINSON & DEACON, 2002).

Em fungos, muitos vírus estão presentes como múltiplos fragmentos de dsRNA dentro de um mesmo isolado, conforme demonstrado em *P. griseola*, o que resulta um complexo padrão de bandeamento de dsRNA, que pode ocasionar confusão na interpretação quanto à organização e natureza dos genomas virais (GHABRIAL, 1998). Esses múltiplos fragmentos podem ser o resultado da presença de RNA satélite, RNA defectivo ou muitas vezes de infecções mistas, em que dois ou mais vírus não relacionados co-habitam o mesmo isolado (NUSS & KOLTIN, 1990; GHABRIAL, 1998; PREISIG et al., 1998; DAWE & NUSS, 2001). A presença de genomas segmentados também não pode ser descartada (CHU et al., 2004). A relação genética entre estes múltiplos fragmentos dentro de uma mesma linhagem, somente, poderá ser elucidada mediante estudos posteriores sobre diversidade, aplicando-se a técnica de hibridização e seqüenciamento do genoma viral.

VAN DIEPENINGEN et al. (2006) sugeriram que os micovírus podem estar acompanhados por vírus satélites ou fragmentos defectivos devido ao padrão complexo de dsRNA, observado nas linhagens de *Aspergillus* da população Black, na qual fragmentos de 4,4 e 3,2 kb são encontrados isoladamente ou em associação com outros dsRNAs, sendo que ocorre um grande número de combinações tanto no tamanho (variando de 0,8 a 4,4 kb), quanto no número de fragmentos.



**Figura 1** – Ocorrência de RNA dupla fita em isolados de *P. griseola*. As figuras A, B, C, D e E ilustram o padrão de bandeamento dos ácidos nucléicos totais de 49 isolados de *Pseudocercospora griseola* (Tabela 2) e os tamanhos dos dsRNAs. A identificação dos isolados é mostrada acima das respectivas canaletas. M - marcador de tamanho molecular, 1kb DNA Ladder (Promega).

## 4.2. Transmissão intracitoplasmática de dsRNA

### 4.2.1 Transmissão dos micovírus por meio dos conídios

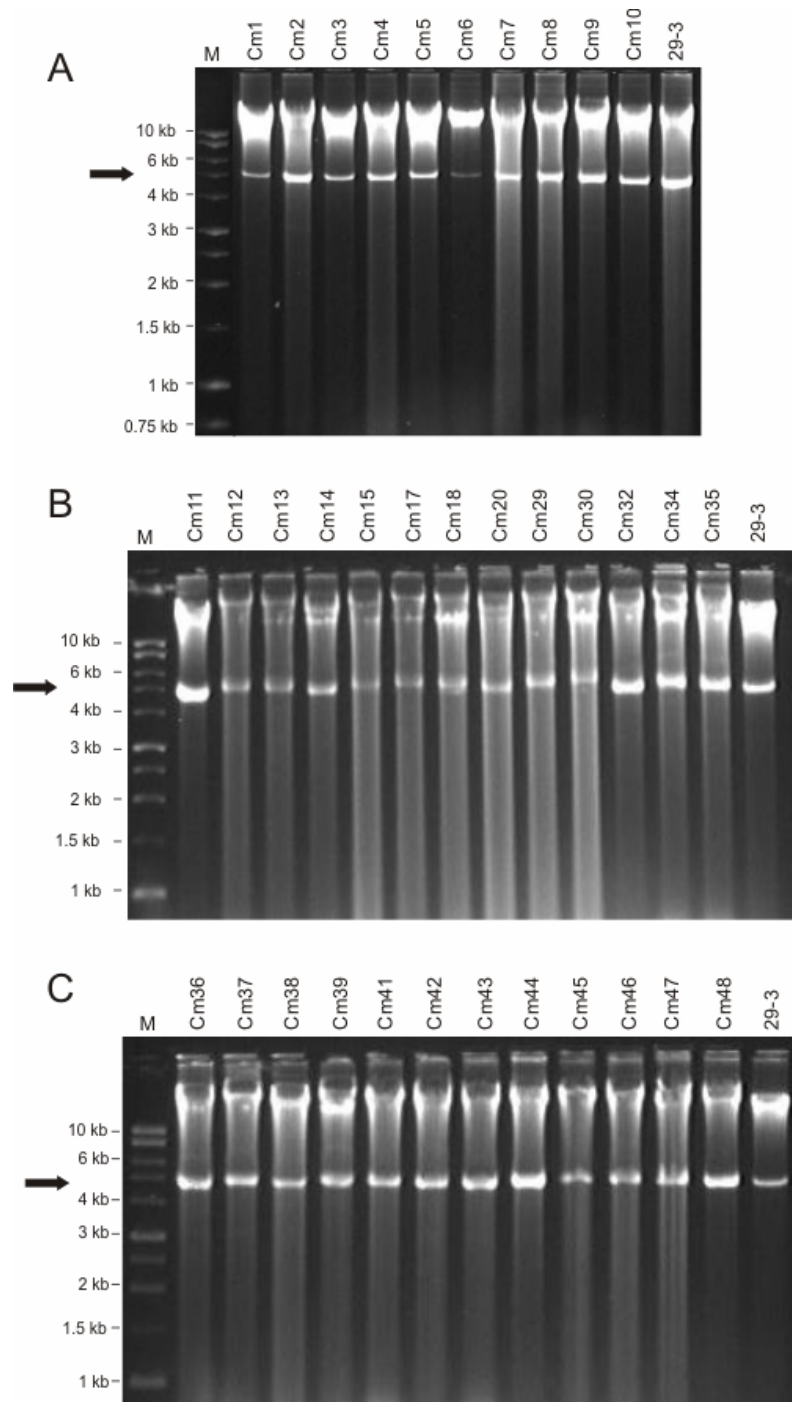
Todas as 35 colônias monospóricas (Cm), derivadas de um único conídio do isolado 29-3 infectado com o fragmento de dsRNA de 4,8 kb, apresentam dsRNA. Não houve mudança no padrão de bandejamento da progênie com relação ao isolado parental (Figura 2), demonstrando que o fragmento de dsRNA foi, eficientemente, transferido por meio de esporos mitóticos.

Em contraste, quando 22 colônias monospóricas do isolado Ig848 foram analisadas (Figura 3), em 14 colônias não foi observada alguma perda de fragmento de dsRNA, enquanto a perda variou de um a seis fragmentos nas colônias restantes. Nas colônias Cm2, Cm6 e Cm16 não ocorreu a transmissão dos fragmentos de 2,2; 2,0; 1,8; 1,2 e 1,0 kb. As colônias Cm15 e Cm19 não apresentaram a banda menor (0,8 kb), enquanto a colônia Cm21 perdeu as bandas de aproximadamente 4,2; 2,2; 2,0; 1,8; 1,2 kb. Na colônia Cm24, não houve a transmissão do fragmento de dsRNA de 4,8 kb.

A única forma de transmissão de micovírus, conhecida até o momento, é a intracitoplasmática, que pode ocorrer pela transmissão vertical por meio dos conídios e, ou transmissão horizontal por anastomose de hifa (GHABRIAL, 1998; McCABE et al., 1999). Esta ainda não foi avaliada para *P. griseola*, sendo dificultada devido a falta de estudos prévios sobre a compatibilidade vegetativa entre os isolados deste fungo.

A eficiência de transmissão é variável, dependendo da espécie de fungo sob consideração, podendo ser de 0 a 100%. Em *Fusarium graminearum*, 28 das 55 colônias derivadas de um único conídio da linhagem DK2 não possuíam o fragmento de 7,5 kb (CHU et al., 2002). A taxa de transmissão também foi muito baixa no basidiomiceto *Heterobasidium annosum*, em que apenas 3% dos conídios germinados do isolado 95163 e 55% do isolado Si 9 contêm dsRNA (IHRMARK et al., 2002).

Em muitos ascomicetos, a taxa de transmissão vertical de dsRNA para esporos assexuais é muito alta e, geralmente, é próxima a 100% (IHRMARK et al., 2002), como ocorre em *E. festucae*, no qual todos os 42 isolados obtidos a



**Figura 2** - Transferência vertical do genoma viral do isolado 29-3. Ácidos nucleicos derivados de colônias, obtidas a partir de um único conídio do isolado 29-3. Toda a progênie, composta por 35 colônias monospóricas, apresentou o mesmo padrão de bandeamento do isolado parental (29-3), indicando que o fragmento de dsRNA com tamanho de 4,8 kb foi transmitido para todos os conídios analisados. M - marcador de tamanho molecular, 1kb DNA Ladder (Promega). A seta indica o fragmento de dsRNA de 4,8 kb.

partir da germinação de um único conídio da linhagem P23 e os 22 da linhagem V5 continuaram infectados com o vírus Efv1 e apresentaram os dsRNA de 5 kb e 3kb, respectivamente (ROMO et al., 2007). VAN DIEPENINGEN et al. (2006) também testaram a taxa de transmissão em diferentes isolados infectados da população de *Aspergillus* Black; entretanto, nenhuma colônia derivada de um único conidiósporo se apresentou livre de vírus. A transmissão de micovírus para o conídio foi altamente eficiente em *Chalara elegans*, pois, todas as colônias monospóricas das linhagens BK18, CKP e NC1527 mantiveram o mesmo padrão de bandas de RNA dupla fita presentes nas linhagens originais (PARK et al., 2006).

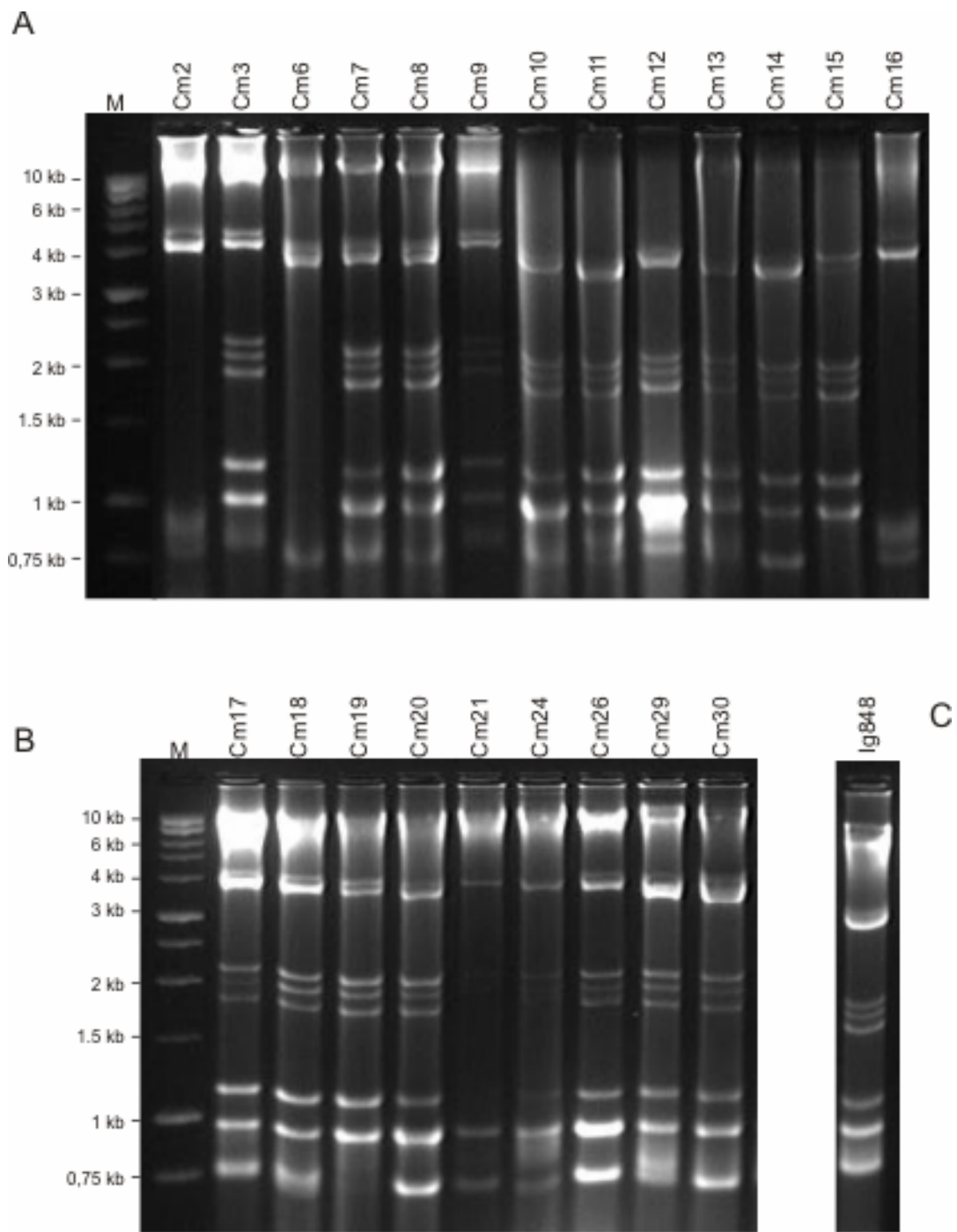
A presença de múltiplos fragmentos de dsRNA em um único isolado pode indicar que alguns fragmentos representam deleções não funcionais de um fragmento de dsRNA maior (fragmentos defectivos), enquanto outros podem demonstrar a presença de genomas distintos de vírus diferentes (vírus satélite e múltiplas infecções). Variações no padrão de herança de fragmentos de dsRNA, em colônias originadas de um único conídio, permitem discriminar a influência de fragmentos distintos de dsRNA no fenótipo dos fungos (BOLAND, 2004).

A taxa de transferência de fragmentos de dsRNA presentes no isolado Ig848 por meio dos conídios ocorreu em alta frequência. Entretanto, algumas colônias derivadas de um único conídio evidenciaram a perda de combinações de fragmentos de dsRNA.

De modo similar, em *Ophiostoma novo-ulmi*, o isolado LD apresentou 12 fragmentos de dsRNA com tamanhos variando entre 0,33 e 3,49 kb. O isolado sci7 não apresentou os fragmentos RNA-4, RNA-7 e RNA-10; o isolado sci10, além de perder os descritos acima, também não apresentou o fragmento 1a; no isolado sci31, foi observado apenas o RNA-6.

Este resultado indica que replicons independentes, que provavelmente codificam sua própria RdRp, estão presentes no isolado Ig848 (COLE et al., 1998).

Como *P. griseola* é considerado um fungo mitospórico, por não ter a reprodução sexuada comprovada, a taxa de transmissão para esporos sexuais não pode ser determinada.



**Figura 3.** Padrão eletroforético dos ácidos nucléicos totais de colônias monospóricas do isolado Ig848. Ácidos nucléicos derivados de 22 colônias monospóricas, obtidas a partir de um único conídio do isolado Ig848. Em C, a amostra Ig848 é o ácido nucléico total do isolado original Ig848. M - marcador de tamanho molecular, 1kb DNA Ladder (Promega).

### 4.3. Obtenção de linhagens isogênicas

#### 4.3.1. Cura dos Micovírus

Quando os conídios dos isolados 29-3 e Ig848 de *P. griseola* foram cultivados em meio de polpa de tomate acrescido de concentrações crescentes de cicloheximida, as colônias mostraram um significativo retardo no crescimento em comparação com o controle, à medida que as concentrações aumentaram (Figura 4), mas à concentração de 50 µg/mL não foi observado crescimento micelial. Nas concentrações de 30 e 40 µg/mL, houve aparecimento de poucas colônias. Em 10 µg/mL, a inibição do crescimento foi menor do que a observada na concentração de 20 µg/mL.

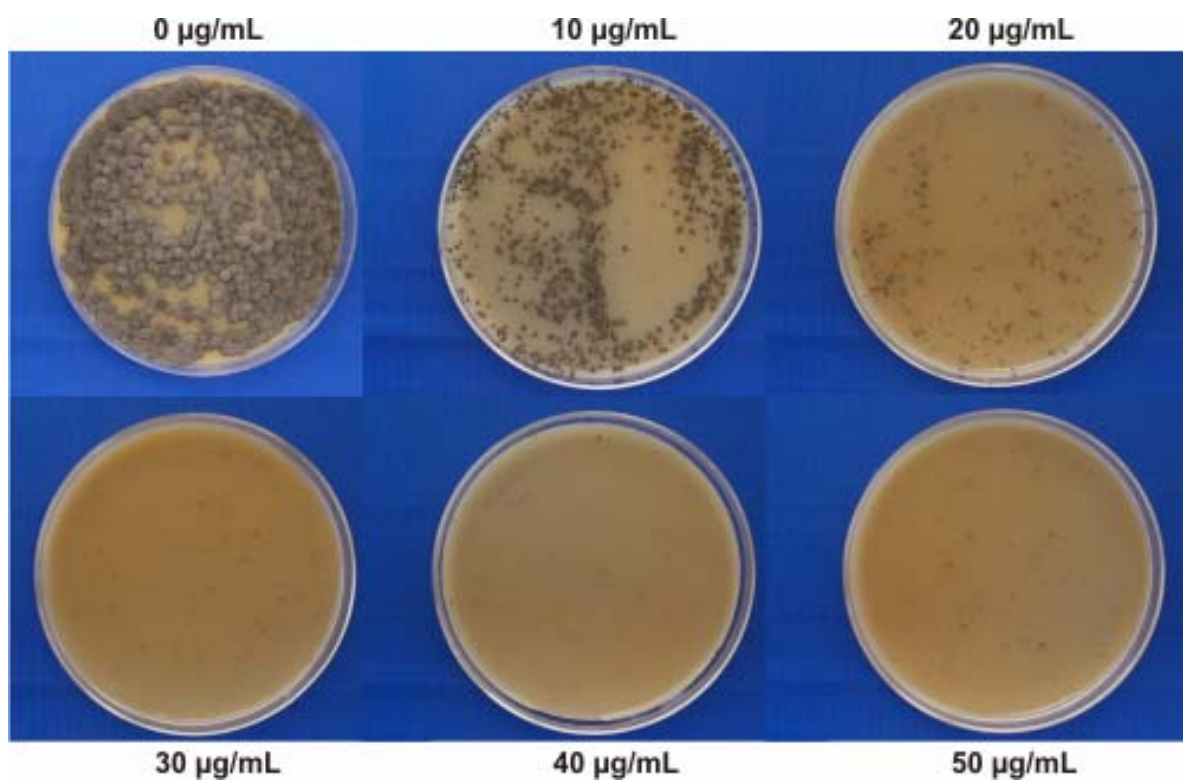
Para obter a cura dos fragmentos de dsRNA, a concentração de 20 µg/mL foi escolhida, devido à inibição parcial do crescimento micelial.

O padrão de bandeamento das três colônias do isolado 29-3, após quatro repicagens sucessivas em meio contendo cicloheximida, foi idêntico ao do selvagem (Figura 5A), demonstrando que esse tratamento não foi capaz de eliminar o fragmento de 4,8 kb do isolado 29-3 de *P. griseola*.

Entretanto, este mesmo tratamento foi capaz de eliminar os fragmentos 2,2; 2,0; 1,8; 1,2 e 1,0 kb das colônias Ch2 e Ch4 do isolado Ig848, após sete repicagens sucessivas em meio contendo o inibidor de síntese protéica (Figura 5B).

Cicloheximida é um inibidor da síntese protéica em eucariotos, entretanto, efeito secundário é provocar a inibição da síntese do RNA viral, mas o mecanismo de cura ainda não é conhecido (ROBISON & DEACON, 2002). O uso deste inibidor propiciou a obtenção de colônias livres de vírus na linhagem CG25 *B. bassiana* (DALZOTO et al., 2006) e em *Nectria radicolola* (AHN & LEE, 2001).

A ineficácia da eliminação de micovírus pela repicagem sucessiva indica que a replicação do dsRNA é sincronizada com o crescimento da hifa no fungo hospedeiro (IKEDA et al., 2004), além de sugerir o alto grau de estabilidade do RNA viral.



**Figura 4** - Teste de inibição do crescimento do isolado 29-3 em diferentes concentrações do inibidor de síntese protéica cicloheximida. Foram testadas as concentrações 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Resultado similar foi, também, obtido para o isolado Ig848 (dados não apresentados).



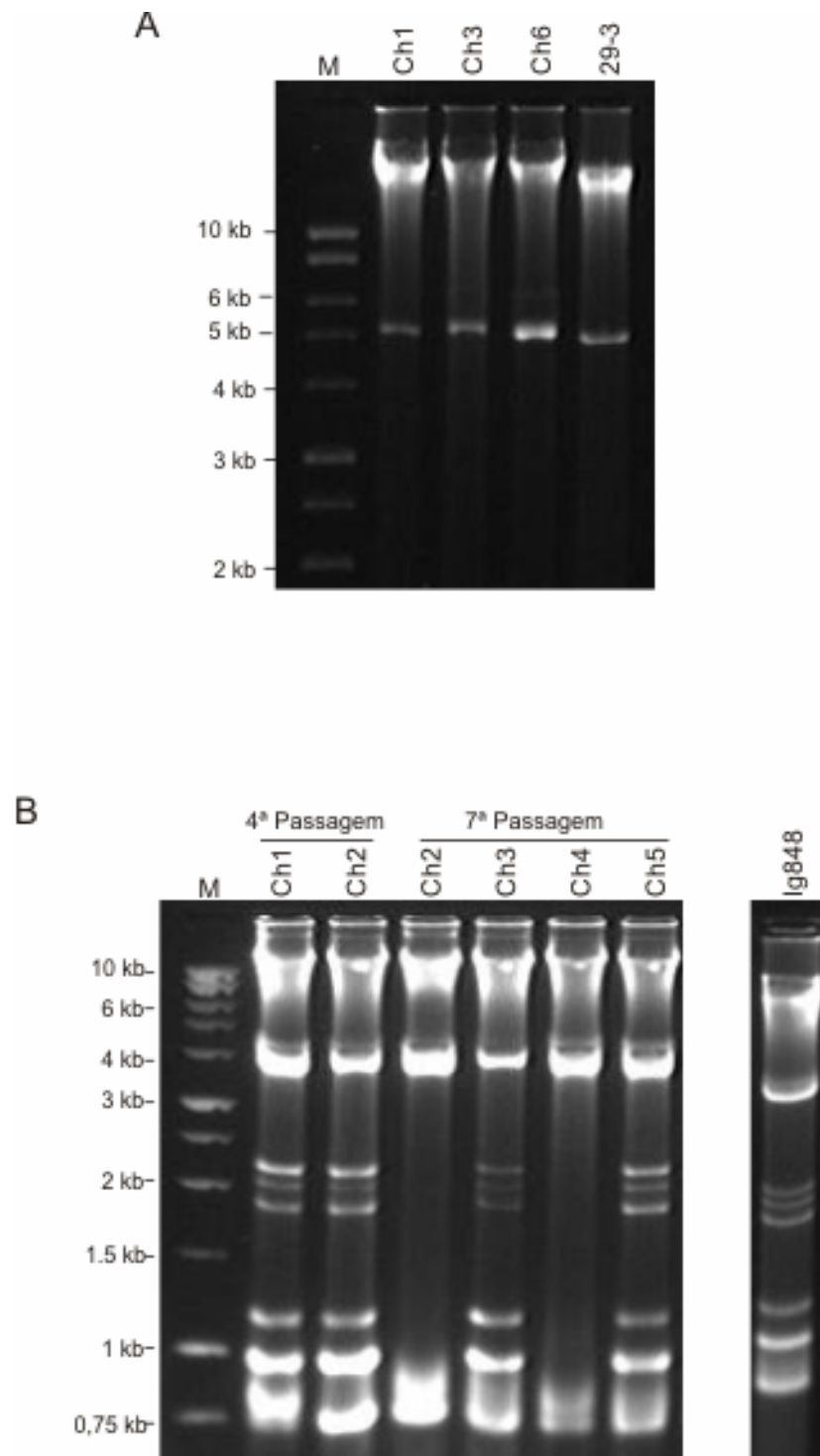
Em diversos fungos, tem-se utilizado cicloheximida na tentativa de eliminar dsRNA. No entanto, nem sempre este tratamento é eficiente, conforme ocorrido com o isolado 29-3 de *P. griseola*. Este também foi o caso de *Helicobasidium mompa* e *Rosellinia necatrix*, *Metarhizium flavoviridae*, *Chalara elegans* e de linhagens de *Aspergillus* da população Black (IKEDA et al., 2004; MARTINS et al., 1999; PARK et al., 2006; VAN DIEPENINGEN et al., 2006).

Assim como ocorreu para o isolado Ig848 de *P. griseola*, em *Rizoctonia solani*, o tratamento com cicloheximida teve sucesso parcial, levando à perda de alguns fragmentos de dsRNA. Neste caso, a cura foi restrita aos fragmentos menores com tamanhos de 1,0; 1,4; 1,6 e 6,5 kb; quanto aos fragmentos maiores de 10 e 12 kb, não foram afetados (ROBINSON & DEACON, 2002).

Outros tratamentos são descritos para obtenção de culturas livres de vírus, como a incubação em temperatura elevada, transferência da borda da hifa, culturas obtidas a partir de um único conídio, tratamento com antibiótico e irradiação com luz ultravioleta (ROMO et al., 2007; VAN DIEPENINGEN et al., 2006; DALZOTO et al., 2006).

Para quantificar e qualificar o efeito da infecção viral, é necessária a obtenção de linhagens isogênicas com e sem dsRNA, pois, somente assim é possível visualizar os efeitos no *fitness* nas linhagens hospedeiras, em decorrência da infecção por micovírus (VAN DIEPENINGEN et al., 2006; BOLAND, 2004). O efeito da infecção viral foi observado em isolados de *S. homeocarpa* curados usando ciclohexamida, pois, as linhagens curadas não continham quantidades de dsRNA detectáveis, além de desenvolverem a morfologia típica de isolados não infectados e terem a virulência resgatada (ZHOU & BOLAND, 1997).

A relação entre um determinado fenótipo e a presença de um fragmento de dsRNA específico freqüentemente pode ser confundida, quando múltiplos fragmentos de dsRNA estão presentes em um único isolado, pois, alguns fragmentos podem representar deleções não funcionais de um fragmento de dsRNA maior e outros, genomas distintos de diferentes vírus (BOLAND, 2004).



**Figura 5.** Cura de fragmentos de dsRNA presentes em *P. griseola*. **A.** Ácidos nucléicos das colônias do isolado 29-3 crescidas em cicloheximida. **B.** Ácidos nucléicos das colônias do isolado Ig848 crescidas em cicloheximida. M – marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder (Promega).

Assim, a possibilidade de eliminação de dsRNA por tratamento com inibidor de síntese protéica, como a cicloheximida, pode ser muito importante em estudos futuros sobre a patogenicidade de um determinado isolado e seu uso no controle biológico (BOLAND, 2004).

O interesse crescente na utilização de micovírus, que causam hipovirulência, no controle biológico é devido ao fato de estes serem restritos à espécie-alvo, além de poderem se estabelecer e manterem-se replicando sem a dependência de novas aplicações (IHRMARK, 2001). A hipovirulência pode ser, experimentalmente, demonstrada de duas formas: o aumento da virulência após a eliminação do dsRNA e a redução na virulência, quando este é reintroduzido (IKEDA et al., 2003).

Neste contexto, as linhagens isogênicas derivadas do isolado Ig848, com e sem determinados fragmentos de dsRNA, obtidas tanto pela cura de alguns fragmentos de dsRNA quanto pela perda espontânea durante a conidiogênese, terão o efeito da infecção viral avaliado 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 esta doença na lavoura.

## 5. CONCLUSÕES

Dos 49 isolados analisados, 31 isolados apresentam fragmentos de RNA dupla fita, sendo que o número e o tamanho dos fragmentos de dsRNA variaram entre os diferentes isolados. Essa variação pode indicar a presença de múltiplas infecções, vírus ou RNA satélites, fragmentos defectivos ou presença de vírus com genoma segmentado. A relação entre estes fragmentos poderá ser determinada por hibridização e seqüenciamento.

A transmissão intracitoplasmática por meio de conídios foi eficiente para o isolado 29-3. Quanto ao isolado Ig848, a perda de segmentos dsRNA em sete colônias monospóricas indicou que, neste isolado, há replicons independentes.

Para o isolado Ig848, o tratamento com cicloheximida resultou alteração no padrão de bandas, ocorrendo perda de cinco fragmentos de dsRNA.

Para o isolado 29-3, o tratamento com cicloheximida não resultou na eliminação do fragmento de dsRNA de 4,8 kb, sugerindo que o mesmo é estável neste isolado.

Futuramente, as colônias derivadas do isolado Ig848, que perderam fragmentos de dsRNA, poderão ser avaliadas quanto às alterações fenotípicas decorridas da interação entre o vírus e o fungo e se o fenótipo de hipovirulência for constatado, este isolado poderá ser usado no controle biológico da mancha-angular e, assim, reduzir as perdas econômicas causadas por esta doença na lavoura.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F.B.A.; RAMALHO, M.A.P. Cultivo do Feijão Irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais. EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2005. Disponível em: <>(http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/doencas.htm)>. Acessado em 27 de agosto de 2008.
- AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 14: 496-507, 2001.
- ANSARI, K.I.; PALACIOS, N.; ARAYA, C.; LANGIN, T.; EGAN, D.; DOOHAN, F.M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathology*, 53: 635–642, 2004.
- ARAKAWA, M.; NAKAMURA, H.; UETAKE, Y.; MATSUMOTO, N. Presence and distribution of double-stranded RNA elements in the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*. *Mycoscience*, 43: 21-26, 2002.
- ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. Cultura do feijoeiro comum no Brasil, Piracicaba: PATAFOS, 786p. 1996.
- BATTEN, J.S.; SCHOLTHOF, K.G.; MILLER, M.E.; MARTYN, R.D. cDNA probes for detection of specific dsRNAs from the fungal pathogen, *Monosporascus cannonballus*. *Journal of Virological Methods*, 84: 209-215, 2000.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 919p. 1995.
- 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*. *Mycological Research*, 100: 1468-1472, 1996.
- BOLAND, J.G. Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26: 6–18, 2004.
- CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENEVENTE, J.; CASTILLO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 95-99, 1999.
- CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; CASTILLO, A. A. Double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*, 228: 87-91, 2003.
- COLE, T.E.; MCLLER, B.M.; HONG, Y.; BRASIER, C.M.; BUCK, K.W. Complexity of virus-like double-stranded RNA elements in a diseased isolate of the dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. *Journal of Phytopathology*, 146: 593-598, 1998.
- COMPEL, P.; PAPP, I.; BIBÓ, M.; FEKETE, C.; HORNOK, L. Genetic interrelationships and genome organization of a Double-stranded RNA element of *Fusarium poae*. *Virus Genes*, 18: 49-56, 1998.
- CHU, Y.; JEON, J.; YEA, S.; KIM, Y.; YUN, S.; LEE, Y.; KIM, K. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2529-2534, 2002.
- CHU, Y.M.; LIM, W.S.; YEA, S.J.; CHO, J.D.; LEE, Y.W.; KIM, K.H. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes*, 28: 135-143, 2004.
- CHUN, S.J.; LEE, Y.H. Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters*, 148: 159-162, 1997.

- CROUS, P.W.; LIEBENBERG, M.M.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z. Re-evaluating the taxonomic status of *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. *Studies in Mycology*, 55: 163–173, 2006.
- 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*, 110: 1475-1481, 2006.
- DAWE, A.L.; NUSS, D.L. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics*, 35: 1-29, 2001.
- DENG, F.; BOLAND, G.J. A satellite RNA of *Ophiostoma novo-ulmi* mitovirus 3a in hypovirulent isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. *Phytopathology*, 94: 917-923, 2004.
- DENG, F.; BOLAND, G.J. Attenuation of virulence in *Sclerotinia homoeocarpa* during storage is associated with latent infection by *Ophiostoma* mitovirus 3a. *European Journal of Plant Pathology*, 114:127–137, 2006.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2005. Disponível em:<>(http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivadoFeijoeiro). Acessado em 27 de agosto de 2008.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <> (http://apps.fao.org) >. Acessado em maio de 2008
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses in 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Seattle, WA, U.S.A. Oxford: Elsevier/Academic Press, 1259p., 2005.
- GHABRIAL, S.A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 18: 119-131, 1998.

- HALL, R. Compendium of bean diseases. Minnesota:APS Press,1994
- HILLMAN, B.I.; FOGLIA, R.; YUAN, W. Satellite and defective RNAs of *Cryphonectria hypovirus 3-Grand Haven 2*, a virus species in the family *Hypoviridae* with a single open reading frame. *Virology*, 276: 181-189, 2000.
- HUANG, S.; GHABRIAL, S. A. Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae 190S virus*, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 12541-12546, 1996.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <> (<http://www.ibge.gov.br>) >. Acessado em julho de 2008.
- IHRMARK, K. Double-stranded RNA Elements in the Root Rot Fungus *Heterobasidion annosum*. Doctoral thesis – Department of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 35p. 2001.
- IHRMARK, K.; JOHANNESSON, H.; STENSTROM, E.; STENLID, J. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology*, 36: 147-154, 2002.
- IHRMARK, K.; STENSTROM, E.; STENLID, J. Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*, 108: 149-153, 2004.
- 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*, 108: 626-34, 2004.



- IKEDA, K.; NAKAMURA, H.; MATSUMOTO, N. Hypovirulent strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *Journal of General Plant Pathology*, 69: 385–390, 2003.
- LAJOLO, F.; GENOVESE, M.I.; MENEZES, E.W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. *Cultura do feijoeiro no Brasil*. Piracicaba: POTAFOS, 23-56p. 1996.
- LEMKE, P.A.; NASH, C. H. Fungal Viruses. *Bacteriological Reviews*, 38: 29-56, 1974.
- LIMA, S.S. Caracterização de micovírus em *Phaeoisariopsis griseola*, agente etiológico da mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação (monografia), Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, 29p. 2006.
- LIU, Y.C.; LINDER-BASSO, D.; HILLMAN, B.I.; KANEKO, S.; MILGROOM, M.G. Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus *Cryphonectria*. *Molecular Ecology*, 12: 1619-1628, 2003.
- LIU Y.C., DYNEK J.N., HILLMAN B.I., MILGROOM M.G. Diversity of viruses in *Cryphonectria parasitica* and *C. nitschkei* in Japan and China, and partial characterization of a new chrysovirus species. *Mycological Research*, 111: 433-442, 2007.
- MAGAE, Y.; HAYASHI, N. Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake). *FEMS Microbiology Letters*, 180: 331-335, 1999.
- McCABE, P.M.; PFEIFFER, P.; ALFEN, N.K.V. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends in Microbiology*, 7: 377-381, 1999.

- MARTINS, M.K.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium favoviride*. *Current Genetics*, 36: 94–97, 1999.
- MELZER, M.S.; BOLAND, G.J. Transmissible hypovirulence in *Sclerotinia minor*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18: 19-28, 1996.
- MELZER, M.S.; IKEDA, S.S.; BOLAND, G.J. Interspecific transmission of double-stranded RNA and hypovirulence from *Sclerotinia sclerotiorum* to *S. minor*. *Phytopathology*, 92: 780-784, 2002.
- MERTENS, P. The dsRNA viruses. *Virus Research*, 101: 3-13, 2004.
- MILGROOM, M.G.; CORTESI, P. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 311-338, 2004.
- MONDA, E.O.; SANDERS, F.E.; HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. *Plant Pathology*, 50: 103-110, 2001.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM A.; CARVALHO, G.A; PAULA JÚNIOR, T.J; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais. *Euphytica*, 117: 77–84, 2001.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM A.; MARIN, A.L.A.; COSTA, M; ROCHA, R.C.; CAIXETA, E.T.; BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. *Summa Phytopathologica*, 24: 331-335, 2002.
- NOGAWA, M.; NAKATANI, A.; GONDA, K.; SHIMOSAKA, M.; OKASAKI, M. Replication of double-stranded RNA in mycovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. *FEMS Microbiology Letters*, 137: 45-49, 1996.

- NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 37–58, 1990.
- NUSS, D.L. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 56: 561-576, 1992.
- NUSS, D.L. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 632-642, 2005.
- OSAKI, H.; NOMURA, K.; MATSUMOTO, N.; OHTSU, Y. Characterization of double-stranded RNA elements in the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *Mycological Research*, 108: 635–640, 2004.
- PARK, Y.; CHEN, X.; PUNJA, Z.K. Diversity, complexity and transmission of double-stranded RNA elements in *Chalara elegans* (synonym. *Thielaviopsis basicola*). *Mycological Research*, 96: 468-479, 2006.
- PEEVER, T.L.; LIU, Y.-C; MILGROOM, M.G. Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology*, 87:1026-1033, 1997.
- PEEVER, T. L., LIU, Y.-C., WANG, K., HILLMAN, B. I., FOGLIA, R., MILGROOM, M. G. Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. *Phytopathology*, 88: 811-817, 1998.
- PINGYAN, L.; KAIYING, C. Virus transmission through interspecies protoplast fusion in *Aspergillus*. *Transactions of the British Mycology Society*, 89:73-81, 1987.
- PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. *Virology*, 252: 399–406, 1998.

- PREISIG, O.; MOLELEKI, N.; SMIT, W.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. *Journal of General Virology*, 81: 3107-3114, 2000.
- ROBINSON, H.L.; DEACON, J.W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG 3. *Mycological Research*, 106: 12- 22, 2002.
- ROMO, M.; LEUCHTMANN, A.; GARCIA, B.; AND ZABAGOGEAZCOA, I. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichloe festucae*. *Virus Research*, 124: 38-43, 2007.
- RONG, R.; RAO, S.; SCOTT, S.W.; TAINTER, F.H. Common multiple dsRNAs are present in populations of the fungus *Discula destructiva* originating from widely separated geographic locations. *Current Microbiology*, 42: 144-148, 2001.
- SAUPE, S. Molecular Genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 489-502, 2000.
- SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiological Review*, 26: 257–276, 2002.
- SPECHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P.; ULLRICH, R.C. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic-acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, 119: 158-163, 1982.
- SRISKANTHA, A.; WACH, M.P.; SCHLAGNHAUFER, B.; ROMAINE, C.P. Synthesis of double-stranded RNA in a virus-enriched fraction from *Agaricus bisporus*. *Journal of Virology*, 57: 1004-1009, 1986.
- STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; SWART, W. J.; AND WINGFIELD, M. J. Double-stranded RNA and associated virulence in South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. *Canadian Journal of Botany*, 76: 1412-1417, 1998.

- STENGLEIN, S.; PLOPER, L.D.; VIZGARRA, O.; BALATTI, P. Angular leaf spot: a disease caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. *Advances in Applied Microbiology*, 52: 209-243, 2003.
- SUZAKI, K.; SASAKI, A.; KANEMATSU, S.; MATSUMOTO, N.; YOSHIDA, K. Transmissibility of viral double-stranded RNA between strains of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* and the potential for viral dsRNA infection to this fungus using monokaryotic strains. *Mycoscience*, 44: 139–147, 2003.
- TSAI, P.F.; PEARSON, M.N.; BEEVER, R.E. Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. *Mycological Research*, 108: 907-912, 2004.
- TUOMIVIRTA, T.T.; HANTULA, J. Two unrelated double-stranded RNA molecule patterns in *Gremmeniella abietina* type A code for putative viruses of the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. *Archives of Virology*, 148: 2293-305, 2003.
- VAN DIEPENINGEN, A.D.; ALFONS DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Intra- and interspecies virus transfer in *Aspergilli* via protoplast fusion. *Fungal Genetics and Biology*, 25: 171–180, 1998.
- VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETS, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* population. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 446-452, 2006.
- VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, Feijão. Viçosa: Editora UFV, 600p, 2006.
- WICKNER, R.B. Double-Stranded RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Review*, 60: 250–265.1996.
- XIE, J.; WEI, D.M.; JIANG, D.H.; FU, Y.P.; LI, G.Q.; GHABRIAL, S.; PENG, Y.L. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-

pathogen fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of General Virology, 87: 241-249, 2006.

ZHOU, T.; BOLAND, G.J. Hypovirulence and double stranded RNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. Phytopathology, 87: 147–153, 1997.

ZHOU, T.; BOLAND G.J. Suppression of dollar spot by hypovirulent isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. Phytopathology, 88: 788–794, 1998.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)