



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado

Ingeniería agraria, alimentaria, forestal y de desarrollo rural sostenible

TESIS DOCTORAL

**Caracterización molecular, efecto sobre el huésped, y transmisión, del micovirus
Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1).**

Doctorando

Carlos German Lemus Minor

DIRECTORAS

Dra. Encarnación Pérez Artés

Dra. María Dolores García Pedrajas

Febrero, 2018

TITULO: *Caracterización molecular, efecto sobre el huésped, y transmisión, del micovirus Fusarium oxysporum f.sp. dianthi virus 1 (FodV1)*

AUTOR: *Carlos German Lemus Minor*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización molecular, efecto sobre el huésped, y transmisión, del micovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1).

DOCTORANDO/A: Carlos Germán Lemus Minor

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo titulado "Caracterización molecular, efecto sobre el huésped, y transmisión, del micovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1)", realizado por Carlos Germán Lemus Minor, se considera finalizado y apto para su exposición y defensa como Tesis Doctoral.

El trabajo se ha desarrollado en el Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) en Córdoba, y durante una estancia en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM) en Málaga, ambos pertenecientes a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El grado de consecución de los objetivos planteados y de formación del doctorando han sido satisfactorios. Los resultados obtenidos han sido presentados por el doctorando como comunicaciones orales y/o en póster en el Congreso Internacional 12th European Conference on Fungal Genetics (Sevilla 2014), y en los Congresos Nacionales XVII y XVIII de la Sociedad Española de Fitopatología (Lleida 2014 y Palencia 2016, respectivamente), obteniendo una de dichas comunicaciones la mención de finalista al premio SEF Panel en el XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (2016). El contenido de la presente Tesis ha dado lugar a la elaboración de tres manuscritos, uno de ellos publicado en *Archives of Virology* (Q3), otro aceptado en la revista *Phytopathology* (Q1), y un tercero que será sometido en breve a revisión en la revista *European Journal of Plant Pathology* (Q2).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 19 de Febrero de 2018

Firma del/de los director/es

Fdo.: E. Pérez Artés

Fdo.: M.ª Dolores García Pedrajas



TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización molecular, efecto sobre el huésped, y transmisión, del micovirus Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1 (FodV1)

DOCTORANDO/A: Carlos Germán Lemus Minor

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

Que el trabajo de investigación titulado “**Caracterización molecular, efecto sobre el huésped y transmisión del micovirus Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1 (FodV1)**”, realizado por el doctorando D. **Carlos Germán Lemus Minor** bajo la dirección de las Dras. **Encarnación Pérez Artés** y **María Dolores García Pedrajas**, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba y ratifico la consideración favorable emitida por las Directoras de la tesis doctoral a tal efecto.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 19 de Febrero de 2018

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Antonio Trapero Casas

Financiación

El trabajo de investigación mostrado en esta tesis ha sido financiado por los proyectos AGL2010-18279 (“Diversidad genética y factores de virulencia en poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en España. Nuevos criterios para la certificación de resistencia en variedades comerciales de clavel”) y AGL2013-48980-R (“Análisis de micovirus como potenciales agentes de control biológico en enfermedades fúngicas vasculares”), del Ministerio Español de Ciencia e Innovación, ambos cofinanciados por la Unión Europea (fondos FEDER).

El doctorando Carlos G. Lemus Minor ha disfrutado de una beca JAE-Pre del CSIC, cofinanciada por fondos FEDER, para realizar los estudios de Máster y de Doctorado durante los años 2011-2015.

The planet is a pretty amazing thing, it's big and horrible, and big and wonderful, and it does all kinds of things we don't know anything about.

– *Kary Mullis*

A.P.

Why do we fall sir?

So that we can learn to *pick ourselves up*.

B.W.

You still haven't given up on me.

A.P.

Never

Batman Begins (2005)

Agradecimientos

Esta tesis ha sido un viaje, uno muy intenso, en ocasiones me ha dejáu empanáu (más de lo normal), eclisáu, y agobiáu, al punto de tener una que otra alferesía, pero también me ha dado experiencias increíbles, horas de estudio enriquecedoras, y una jartá de buenagente muy importante para mí. Es por eso que les expongo, en este apartáu mi más sincera gratitud.

De forma muy especial agradezco a mis directoras de tesis Encarnita y Mariola, las cuales desde el principio me recibieron con los brazos abiertos en sus laboratorios, y fuera de estos. Todo el tiempo que trabajé con ustedes me sentí en un ambiente profesional y bien enfocado para lograr los objetivos presentados en la tesis. Nunca me hizo falta extrañar mi casa cuando estaba trabajando, porque hicieron de mi tiempo ahí muy agradable.

Mariola, te agradezco todo el tiempo que me dedicaste para poder guiarme en la parte experimental, así como las charlas casuales entre experimentos, y post-experimentos, en los chiringuitos de Algarrobo. Me enseñaste que existe una política para hacer ciencia, y que varía según nuestros intereses. También me enseñaste a tener perseverancia para seguir adelante con los experimentos, y que si la cosa no sale, es porque quizás sea algo inesperado (pero maravilloso, como nuestro micovirus). También por dejarme entrar en tu vida de una forma tan casual, tu calidez humana fortalece la entrega que das por tu trabajo, y engrandece la huella que vas dejando en las personas que te conocemos.

Encarnita yo creo que tendría que escribir otra tesis sólo para agradecer el trabajo post-beca de esta tesis. Definitivamente agradezco que nunca hayas dejado de creer en mí. Esta tesis se presenta por tu tenacidad para sacarme de mi cueva en Mexicali y traerme hasta acá, para hacerme ver que el trabajo ha tenido su recompensa. También te agradezco todo el empeño que has puesto desde el principio por corregir cada enunciado, frase, coma, y hasta punto, que no manifieste de forma clara, lo que quiero decir. Además, agradezco que me hayas enseñado que la ciencia, por mas cuadrada que queramos verla, tiene sus recovecos, sus descubrimientos inesperados, y son tanto interesantes, como maravillosos. También debo reconocer tu calidez humana, la cual ha hecho esta tesis muchísimo más ligera de lo que pudo haber sido.

A Carmen Cañizares, por ser mi codirectoria honoraria de tesis, además de ser compañera de laboratorio, y hasta de desayuno (como olvidar el pancito remojao en aceite de oliva y sal). Eres una persona extraordinaria, siempre me motivaste para seguir trabajando, con toda la energía que tienes. Depositaste tu confianza en mí, aunque tú no estuvieras muy segura de si eran buenas ideas.

A todos los que conocí en La Mayora: Jorge y Kike, por abrirme la puerta de su casa, me lo pasé muy bien con sus ocurrencias; a José Manuel Pulido por resolver mis dudas básicas del laboratorio, y José Manuel Aragón, por sus chistes y ocurrencias, hacían que el trabajo fuera muy agradable. A Antonio Córdón, por recibirme en La Mayora siempre que era

posible, y dar gestión adecuada del papeleo necesario. A Reme, Olaya, Anabel, Yazmín, Paco (mancornao), María, Nere, David, Rida, Camila, Leo, Anelise, Pedrinho Lemos, por su calidez y alegría, me hicieron pasar unos momentos inolvidables. Además, cada uno me dejó una huella imborrable (algunas sí que se borraron de tanto alcohol, jejeje), me quedo con todas las visitas a la playa, los chiringuitos, y las ferias de Málaga, ¡GRACIAS AMIGOS!

A la gente de EL-IAS Chicha, María Burguet, Manolo López, David McMolder, Margarita, Manolo, y todo el equipo que forma parte del depto. Agronomía, les agradezco haberme incluido en sus peroles y llevarme de fiestuki, son muy apañaos.

A David Gramaje, Emilio Palomares, y Juan Moral por ser un excelente ejemplo de investigadores jóvenes con mucho que ofrecer a la ciencia y a los pequeños novatos como yo.

A Antonio Trapero, por su disponibilidad, y ayuda para los trámites necesarios de tutela y depósito de esta tesis.

A los que conforman el grupo de Etiología y control de enfermedades de cultivos del IAS. Carmen Gómez-Lama, y Antonio Valverde por recibirme en el laboratorio al iniciar la tesis, y enseñarme los truquillos del laboratorio, aunque a veces me echaran la bronca, fue importante para que yo aprendiera a trabajar bien. Jesús Mercado, por las charlas de té, y por tener siempre las puertas abiertas de su laboratorio para poder avanzar con la tesis. A Pepe Melero, Carlos López, y Leire Molinero por tener siempre buena disposición para atender alguna duda que se me hubiera ocurrido, y mantener las puertas abiertas de sus laboratorios. Almudena, por enseñarme el valor de la paciencia, y por hacer el laboratorio tan divertido, de verdad que llevas arte en la sangre. David Ruano, por las mañanas de tesito, tus historias de gitano y por el cariño que desarrollaste hacia mí y Liz. Carlos Casanova, por tu actitud positiva en el laboratorio, y por dejarme entrar en tu casa, dejarnos a Liz y a mí, conocer a tu familia, y crear una bella amistad.

A Mercedes por sacarme del laboratorio y presentarme a la pandilla de doctorandos del IAS (de esa época), invitarme a convivir con ellos y por ser mi amiga. ¡Muchas gracias! A la pandilla de doctorandos del IAS. Estefi, Ángel, Rebeca, David, Javi, siempre dando buena cara a las adversidades de la tesis. A mis compañeros del despacho, Paco Mena, y Antonio Archidona, por levantarme el ánimo con sus charlas y buen sentido del humor. A Thaïs por enseñarme siempre a tomarme el tiempo para detenerme a respirar y seguir adelante. También por todas tus ocurrencias y por siempre regalarme su risa cuando parecía que no había razones para reír.

A Lola, Omar, Carmen Oz, e Inma muchas gracias por crear una convivencia estupenda en nuestro Horno de Porras. Sus ocurrencias, regaños, clases de gastronomía, y risas crearon un verdadero hogar que llevaremos Liz y yo, por siempre en el corazón. ¡MIL GRACIAS!

A mis padres por apoyarme en todos mis proyectos y locuras, aquí pueden cosechar un poco de lo que han sembrado. Muchas gracias por estar a mi lado siempre que han podido, y por seguir haciéndolo hoy en día.

A mis hermanos Richi, Cheli, y Ale, esto es tan mío como suyo, porque el éxito de uno, es éxito de todos. Estoy orgulloso, y agradecido de ustedes, por apoyarme y por estar al pendiente de mí.

A Liz por estar a mi lado, aguantarme en los días malos y festejar los días buenos. Por hacer el intento de entenderme y ayudarme a entenderme a mi mismo jejeje. Este trabajo también es tan tuyo como mío. Te amo.

A todos los que hicieron mi estancia en Córdoba mucho más agradable (aquí seguro se me olvida alguno). Andrea Weisholzer, por ayudarnos a crear el piso alexicano mas bonito y divertido del planeta. Anaïs y Francisco José sus risas fueron muy importantes para olvidar que estaba lejos de casa. Elisa Pascual, gracias por recibirnos en tu casa en Italia, fue un viaje rico en cultura y aprendizaje. Manou, siempre te recordamos por tus ocurrencias. Nick, you always had something funny to say. Oliver siempre filosofando sobre tonterías, que me hacían desconectar. Y todos aquellos que alguna vez me hicieron VIVIR Córdoba a través de la fiesta, sus calles estrechas, y sus monumentos. ¡¡¡UN MILLÓN DE GRACIAS!!!

ÍNDICE

Summary.....	i
Resúmen.....	iii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. El cultivo del clavel.....	2
1.2. La Fusariosis vascular del clavel.....	3
1.2.1. El agente patógeno: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	4
1.2.2. Sintomatología.....	5
1.2.3. Diversidad de las poblaciones del patógeno.....	5
1.2.4. Control de la enfermedad: estrategias de control integrado.....	7
1.3. Micovirus: virus que infectan hongos.....	8
1.3.1. Características generales de los micovirus.....	8
1.3.2. Clasificación.....	9
1.3.2.1. Clasificación de los micovirus de RNA de doble hebra.....	9
1.4. Micovirus de especies fitopatógenas: el fenómeno de la hipovirulencia....	11
1.5. Micovirus inductores de hipovirulencia como posibles agentes de control biológico.....	13
1.6. Micovirus identificados en especies del género <i>Fusarium</i>	14
1.6.1. Micovirus identificados en la especie <i>Fusarium oxysporum</i>	15
Objetivos de esta tesis.....	16
CAPÍTULO 2: Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>.....	17
CAPÍTULO 3: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> virus 1 accumulation is correlated with changes in virulence and other phenotypic traits of its fungal host.....	21
CAPÍTULO 4: Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> Virus 1.....	25
DISCUSIÓN GENERAL.....	27
CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS.....	37

Summary

Fungal viruses (micoviruses) are viruses that infect fungi. Micoviruses are widespread throughout the major taxonomic groups of fungi, including plant-pathogenic species. They lack extracellular routes of transmission and are transmitted intracellularly by hyphal anastomosis (horizontal transmission) and during sporogenesis (vertical transmission). Frequently, mycovirus infections are cryptic, i.e. no discernible phenotypic effects are observed in their hosts, but in some cases the viral infection has been associated with the alteration of particular phenotypic traits in its fungal host. The most interesting cases are those of mycoviruses that induce hypovirulence in phytopathogenic species, that is, that reduce the virulence of the fungus against its host plant, because the possibility of using them as biological control agents of the diseases caused by their fungal hosts. Mycoviruses that induce hypovirulence have all single-stranded (ss) or double-stranded (ds) RNA genomes, and include representatives of the families *Totiviridae*, *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae* and *Reoviridae*. In this study we describe the complete genomic structure, the effect on the fungal phenotype, and the transmission, of mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1), a new member of the family *Chrysoviridae* identified in isolate *Fod* 116 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. FodV1 consists of four dsRNA segments of 3,555 bp (dsRNA1), 2,809 bp (dsRNA2), 2,794 bp (dsRNA3), and 2,646 pb (dsRNA4), respectively. DsRNA1 and dsRNA3 encode a RNA-dependent RNA polymerase and a coat protein, respectively; dsRNA2 and dsRNA4 encode hypothetical proteins with unknown functions. Phylogenetic analysis using aminoacid sequences places FodV1 in the *Chrysoviridae* family, very close to the designated as “chryso-like” mycoviruses, all of them associated to the alteration of phenotypic traits in their hosts. The effect of FodV1 on the phenotype of the fungus has been analysed using two versions of isolate *Fod* 116: the original one infected with a very high titer of the virus (*Fod* 116V⁺), and another one with a very low titer obtained by single conidia selection (*Fod* 116V). Comparative analysis of both versions evidences a significative effect of FodV1 on all the phenotypic traits analyzed. Presence of a high titer of FodV1 in isolate *Fod* 116 alters the morphology and reduces the radial growth of the colony on solid medium, diminishes the conidiation in liquid medium, and reduces the virulence against carnation of its fungal host. All these results place FodV1 in the group of hypovirulent micoviruses, and open the possibility to its use as a biological control agent of *Fusarium* wilt of carnation. The successful application of mycoviruses to the control of phytopathogenic fungi depends both on their ability to stably accumulate in the fungal host and on their efficient transmission among isolates in the natural fungal populations. FodV1 reaches a very high level of accumulation in the originally infected isolate. Results obtained in this work show that this high level remains stable over time, after successive subculture or passage through plant. Moreover, it has also been shown that FodV1 can be transferred by hyphal anastomosis among vegetatively compatible isolates. To evidence this, we have used the strain originally infected (*Fod* 116V⁺, donor), and another vegetatively compatible virus-free strain that had been previously transformed with a hygromycin resistance gene (*Fod* 77Hyg^R, recipient). Results obtained show that FodV1 not only transfers to the recipient isolate, but also accumulates at a similar high level in it. Comparative analysis of isolates *Fod* 77Hyg^R (virus-free) and *Fod* 77Hyg^RV⁺ (virus-infected)

proves that FodV1 induces in its new host similar phenotypic alterations that those described in the original infected isolate *Fod 166V⁺*. Another factor that could contribute to the spread of the mycovirus in the fungal population is the efficiency in the vertical transmission through asexual spores. In this Thesis we have analyzed the efficiency in the vertical transmission of FodV1 in both virus-infected isolates, *Fod 116V⁺* and *Fod 77Hyg^RV⁺*. Results show that this efficiency varies depending on the isolate considered. FodV1 is the first mycovirus associated to hypovirulence identified in the species *F. oxysporum*.

Resumen

Los micovirus son virus que se encuentran infectando a hongos. Estas infecciones víricas afectan a la mayoría de los grupos taxonómicos de hongos, incluyendo los hongos patógenos de plantas. La característica más señalada de los micovirus es que carecen de una ruta extracelular de infección, y solo se transmiten intracelularmente mediante anastomosis hifal (transmisión horizontal) o durante la esporogénesis (transmisión vertical). Usualmente, las infecciones por micovirus son asintomáticas, pero en algunos casos la infección viral se ha asociado a la alteración de determinados caracteres fenotípicos en sus hongos hospedadores. Particularmente interesantes son los micovirus que inducen hipovirulencia en especies fitopatógenas, es decir, que reducen la virulencia del hongo frente a su planta huésped, debido a la posibilidad de ser utilizados como agentes de control biológico de las enfermedades causadas por sus hongos hospedadores. Todos los micovirus asociados a hipovirulencia tienen genomas de RNA de cadena sencilla (ssRNA) o de cadena doble (dsRNA), e incluyen representantes de las familias *Totiviridae*, *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae* y *Reoviridae*. En este trabajo se describe la estructura genómica completa, el efecto sobre el fenotipo del aislado hospedador, y la transmisión, del micovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1), un nuevo miembro de la familia *Chrysoviridae* identificado en el aislado *Fod* 116 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. FodV1 consta de 4 segmentos de dsRNA de 3.555pb (dsRNA1), 2.809 pb (dsRNA2), 2.794 pb (dsRNA3), y 2.646 pb (dsRNA4). DsRNA1 y dsRNA3 codifican una ARN polimerasa dependiente de ARN y una proteína de la cápsida, respectivamente; dsRNA2 y dsRNA4 codifican proteínas hipotéticas de función desconocida. El análisis filogenético basado en las secuencias aminoacídicas sitúa a FodV1 en la familia *Chrysoviridae*, dentro del grupo de los que han sido denominados como “chriso-like” micovirus, todos ellos asociados a la inducción de alteraciones fenotípicas en sus hongos hospedadores. El efecto de FodV1 sobre el fenotipo del hongo se ha determinado utilizando dos versiones del aislado portador *Fod* 116: una con título elevado del virus (la versión original, *Fod* 116V^{*}), y otra con niveles residuales de infección viral, obtenida mediante selección y análisis de conidias (*Fod* 116V[†]). El análisis comparado de ambas versiones ha puesto de manifiesto un efecto significativo del micovirus FodV1 sobre todos los caracteres fenotípicos analizados. La presencia de títulos altos de FodV1 en el aislado *Fod* 116 altera la morfología y reduce la velocidad de crecimiento radial en medio sólido, disminuye la tasa de conidiación en medio líquido, y reduce la virulencia sobre clavel del aislado fúngico. Todos estos resultados identifican a FodV1 como un nuevo micovirus inductor de hipovirulencia, con potencial para ser utilizado como agente de control biológico. El éxito en la utilización de micovirus para controlar poblaciones de hongos fitopatógenos depende de la capacidad del micovirus para acumularse de manera estable en su hospedador fúngico, así como de su eficiencia para transmitirse entre aislados y dispersarse en las poblaciones fúngicas naturales. FodV1 presenta un elevado nivel de acumulación en su aislado portador original. Nuestros resultados demuestran que este nivel de acumulación permanece estable a lo largo del tiempo, tras sucesivos subcultivos, o después del paso por planta. Por otra parte, también ha quedado demostrado que FodV1 puede transferirse mediante anastomosis hifal entre aislados vegetativamente compatibles. Para evidenciar dicha transferencia se ha utilizado el aislado originalmente

infectado (*Fod 116V⁺*, donante) y otro aislado compatible libre de virus y marcado con un gen de resistencia a higromicina (*Fod 77Hg^R*, receptor). Los resultados evidencian que el virus no solo se transfiere al aislado receptor, sino que además se acumula en éste a niveles inusualmente altos, similares a los detectados en el aislado donante. El análisis comparado de los aislados *Fod 77Hg^R* (libre de virus) y *Fod 77Hg^RV⁺* (infectado con el virus) ha puesto de manifiesto que FodV1 induce en el nuevo aislado hospedador las mismas alteraciones fenotípicas identificadas en el aislado originalmente infectado. La otra vía de diseminación de la infección viral es a través de las esporas asexuales, o transmisión vertical. En esta tesis se ha analizado la eficiencia en la transmisión vertical de los dos aislados infectados con FodV1, *Fod 166V⁺* y *Fod 77Hg^RV⁺*. Los resultados muestran que dicha eficiencia varía dependiendo del aislado considerado. FodV1 es el primer micovirus asociado a hipovirulencia identificado en la especie *F. oxysporum*.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. El cultivo del clavel

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Caryophyllaceae, originaria de la cuenca mediterránea. Como en el caso de otras flores, los claveles reciben su nombre en la antigua Grecia, cuando los sabios de la época empezaron a realizar los primeros compendios de botánica de la zona. Fue el griego Theophrastus quien catalogó la flor bajo el nombre "Dianthus". El nombre deriva de dos palabras griegas: "Dia", o Dios; y "anthos", que significa flor. En otras palabras, los claveles fueron reconocidos por su belleza como "las flores de Dios".

Los primeros claveles adaptados a la producción de flor cortada fueron seleccionados en Lyon alrededor del año 1845. A partir de 1942, William Sim obtuvo por hibridaciones y selecciones una serie de claveles que llevan su nombre "Clavel Sim o Clavel Americano", que han dado origen al espectacular desarrollo de la producción en invernadero y bajo túneles (Fig. 1a).

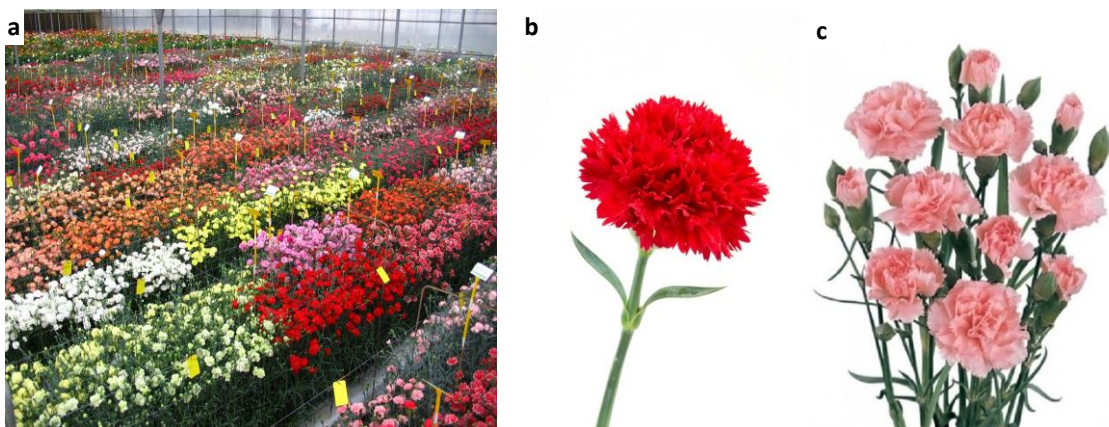


Fig. 1. El cultivo del clavel. **a** Cultivo en invernadero de distintas variedades de clavel. Foto cedida por la empresa Barberet & Blanc (Puerto Lumbreras, Murcia). **b** Clavel estándar. Fuente: <https://www.pinterest.com.mx/pin/668080925943709157/> **c** Mini clavel. Fuente: <http://chipionafior.com/tienda/mini-clavel/20-mini-clavel.html>

Los claveles estándar y miniatura son una de las más importantes flores de corte en el comercio mundial (Figs. 1b y 1c). Además, debido a su fácil y rápida multiplicación, el clavel es objeto de un importante comercio internacional de esquejes. Estados Unidos es el mayor mercado de clavel del mundo y en la actualidad Colombia, con más de 4.000 hectáreas dedicadas a este cultivo, es el principal proveedor y el principal productor mundial de clavel estándar. En España, aunque no se dispone de datos actualizados, se estima que la superficie dedicada al cultivo ronda las 2.000 hectáreas. Andalucía se sitúa a la cabeza con unas 1000 hectáreas de cultivo, y el 80% de la producción de clavel español. Las zonas de producción andaluzas se concentran fundamentalmente en las provincias de Cádiz (localidades de Chipiona, Sanlúcar de Barrameda, Jerez, Arcos y Rota) y, en menor medida, Sevilla (localidades de Los Palacios, Lebrija, El Cuervo, Las Cabezas de San Juan y Utrera).

1.2. La fusariosis vascular del clavel

La fusariosis o marchitez vascular del clavel, causada por el hongo de suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*), es la enfermedad más importante y severa de las que afectan al cultivo del clavel en prácticamente todo el mundo (Baayen, 1988; Garibaldi y Gullino, 1987).

Como ya hemos mencionado, la principal área de producción de clavel en España se localiza en la costa noroeste de Cádiz, y es allí donde los problemas de fusariosis comenzaron a aparecer sobre los años 1980-1982, es decir, apenas cinco años tras la introducción de las primeras plantaciones de clavel alrededor del año 1975 (García-Ruiz *et al.*, 2009). Prospecciones llevadas a cabo en esa zona entre marzo de 2004 y marzo de 2007, pusieron de manifiesto la presencia de *Fod* en un 74.30% de la superficie muestreada (García-Ruiz *et al.*, 2009). Prospecciones posteriores, realizadas entre los años 2008 y 2014, evidenciaron igualmente una elevada presencia del patógeno en los suelos muestreados (Gómez-Lama *et al.*, 2012). Esta amplia diseminación del patógeno, unida a las condiciones climatológicas de la zona, hace que el potencial de desarrollo de la enfermedad sea muy alto (Fig. 3).



Fig. 3. Invernadero de clavel afectado por fusariosis (*F. oxysporum* f. sp. *dianthi*).

1.2.1. El agente patógeno: *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* es un hongo necrotrofo, capaz de sobrevivir en el suelo durante años en ausencia de la planta huésped. Crece por medio de micelio, sobre el cual puede formar tres tipos de conidias:

- Microconidias: unicelulares, de pared delgada, de forma redonda o elipsoidal ($5\text{-}13\ \mu\text{m}$ x $1.6\text{-}5\ \mu\text{m}$) (Fig. 4a).
- Macroconidias: de 3-6 células, de pared también delgada, en forma de huso ($36\text{-}70\ \mu\text{m}$ x $3\text{-}6.3\ \mu\text{m}$). Las macroconidias pueden degradarse fragmentándose en células individuales cuyas paredes se engrosan formando estructuras de supervivencia (Fig. 4b).
- Clamidosporas: miden $8\text{-}12\ \mu\text{m}$ y tienen la pared engrosada; su función es particularmente aquella de la supervivencia en ausencia de planta huésped (Fig. 4c).



Fig. 4. Morfología de las conidias de *Fusarium oxysporum*. **a** Microconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **b** Macroconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en azul de lactofenol. **c** Clamidosporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Fotos **a** y **c** tomadas por: Toussoun, T.A., and Nelson, P.E., 1976 https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Fusarium/Fusarium_oxysporum.htm. Foto **b** tomada por: Casanova, C. en el laboratorio de Dr. José M. Melero Vara.

F. oxysporum f. sp. *dianthi* infecta al clavel desde el suelo. El patógeno se localiza a distintas profundidades en el suelo y puede infectar a la planta en cualquier época del año, aunque se detecta más frecuentemente desde principios de primavera a inicios del verano y al comienzo del otoño, cuando las condiciones climatológicas son más favorables para el desarrollo del hongo (Ben-Yephet *et al.*, 1996). La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en dormancia estimuladas por los exudados secretados por las raíces de las plantas de clavel. Las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan a la corteza y a la endodermis e invaden los vasos xilemáticos (Baayen, 1988; Baker *et al.*, 1978). Las hifas también pueden penetrar a través de las heridas, hechas en forma mecánica durante el manejo de los esquejes o bien por nematodos, insectos, o miriápodos (García-Ruiz *et al.*, 2009). Una vez dentro de la

planta, el hongo progresa hacia el tejido vascular intracelularmente, e invade los vasos del xilema (Nelson *et al.*, 1960). El patógeno coloniza por crecimiento de micelio o por transporte pasivo de microconidias en la corriente xilemática (Baayen, 1988).

1.2.2. Sintomatología

Los síntomas aparecen cuando el hongo empieza a colonizar, y por tanto a ocluir, los vasos xilemáticos. La falta de agua y nutrientes provoca el decaimiento de la planta y su muerte. Generalmente, la enfermedad progresa acrópetamente. Primero las hojas basales amarillean, y puede aparecer un enrollamiento hacia abajo de la parte superior de la planta. En los estadios avanzados, el amarilleamiento afecta también a las hojas superiores, y la planta se seca y muere. Internamente puede observarse una decoloración café en los tejidos vasculares (Fig. 5).



Fig. 5. Proliferación en tallo de la Fusariosis vascular del clavel. Tallo de clavel en el que se observa la invasión de los tejidos vasculares por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (<http://donsgarden.co.uk/pests>).

En lo que respecta al sistema radical, al principio las raíces permanecen intactas, pero más tarde se pudren, y al arrancar la planta ésta se rompe por el cuello, quedando parte de las raíces en la tierra.

1.2.3. Diversidad de las poblaciones del patógeno

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* (Fod), al igual que otras formas especiales de *F. oxysporum*, presenta una amplia diversidad genética y patogénica. Se han descrito once razas fisiológicas de *Fod* en base a diferencias en la reacción de cultivares de clavel diferenciadores. Inicialmente, Garibaldi (1977) describió la existencia de las razas 1 y 2 en Italia y en Francia. Con posterioridad, se describieron seis razas más (razas 3 a 8) (Aloi y Baayen, 1993; Garibaldi, 1983), aunque la raza 3 fue después redefinida como *F. redolens* f. sp. *dianthi* raza 3 (Baayen *et al.*, 1997). Finalmente, se identificaron tres nuevas razas infectando claveles en Australia (raza 9, Wright *et al.*, 1996) y Holanda (razas 10 y 11, Baayen *et al.*, 1997).

La raza 2 (R2), que probablemente se originó en Europa, se ha extendido a la mayoría de los países productores a través del material de propagación, y en la actualidad se encuentra distribuida por todo el mundo (Aloi y Baayen, 1993; Baayen *et al.*, 1997). Las razas 1 (R1) y 8 (R8) se originaron aparentemente en la Riviera Italiana, donde se asociaron específicamente a los ecotipos mediterráneos de clavel (Garibaldi *et al.*, 1986). La raza 4 (R4) está asociada con los cultivares de clavel americanos y ha sido descrita en EEUU (Aloi y Baayen, 1993; Baayen *et al.*, 1997), Italia (Garibaldi, 1983; Garibaldi *et al.*, 1986), Israel (Ben-Yephet *et al.*, 1992), España (Aloi y Baayen, 1993; Andrés Arés *et al.*, 2001; Baayen *et al.*, 1997) y Colombia (Cevallos *et al.*, 1990). Las razas 5 (R5), 6 (R6) y 7 (R7) han sido descritas en Gran Bretaña, Francia y Holanda (Garibaldi, 1983), pero en la actualidad se conservan pocos representantes de éstas. Por último, las razas 9, 10 y 11 parecen muy restringidas a las zonas geográficas donde se identificaron (Wright *et al.*, 1996; Baayen *et al.*, 1997).

Como ya hemos dicho, la raza 2 es la más ampliamente extendida, y ha sido localizada en todas las zonas productoras del mundo (Aloi y Baayen, 1993; Baayen *et al.*, 1997). En España, igualmente, la raza más ampliamente distribuida es la R2 (Andrés Arés *et al.*, 2001; Tello y Lacasa, 1990), aunque en zonas y momentos determinados también se ha referido la presencia de las razas R1, R4 ó R8 (Aloi y Baayen, 1993; Andrés Arés *et al.*, 2001; Baayen *et al.*, 1997). En las zonas productoras Andaluzas, los muestreos más recientes indican la presencia conjunta de las razas R1 y R2 (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2012). La diversidad patogénica descrita en *Fod* se corresponde con una diversidad genética que también ha sido objeto de estudio. El análisis de dicha diversidad llevó a final de los 90 al desarrollo de protocolos basados en PCR-específica que permitían identificar a aislados de R1 o R8, de una parte, y a aislados de R2, R5 o R6, de otra (Chiochetti *et al.*, 1999). Posteriormente, el análisis de una amplia colección de aislados de R1 y R2 obtenidos de las zonas productoras del Sur de España puso de manifiesto por primera vez la existencia de diversidad molecular dentro de estas razas, y llevó al diseño de nuevos iniciadores para PCR específica que permitían la identificación de los definidos como grupos moleculares dentro de cada raza (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2012). Más aún, la realización de pruebas de patogenicidad comparativa con representantes de los grupos moleculares definidos dentro de cada raza permitió asignar perfiles de virulencia diferentes a cada grupo, asignando un perfil de alta virulencia a los aislados del grupo I, y un perfil de baja virulencia a los aislados del grupo II (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2012).

Esta subdivisión de los aislados de raza 1 y raza 2 españoles en grupos moleculares, distinguibles entre sí por marcadores PCR-específicos y asociados a distintos grupos de virulencia, se ha visto reforzada por los resultados obtenidos en la determinación de Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCGs) en la población (Gómez-Lama Cabanás y Pérez-Artés, 2014). Todos los trabajos realizados con *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* hasta el momento asignaban a los aislados de R1 y R2 a VCGs distintos, i.e. los aislados de R1 al VCG 0022 y los aislados de R2 al VCG 0021 (Aloi y Baayen, 1993; Andrés Arés *et al.*, 2001; Baayen *et al.*, 1997; Garibaldi, 1981). Los resultados obtenidos por Gómez-Lama Cabanás y Pérez-Artés (2014) aportaron un dato novedoso, ya que demostraron que aislados de R1 y R2 pueden

compartir VCG siempre que pertenezcan al mismo grupo molecular (Gómez-Lama Cabanás y Pérez-Artés, 2014) (Fig. 6).

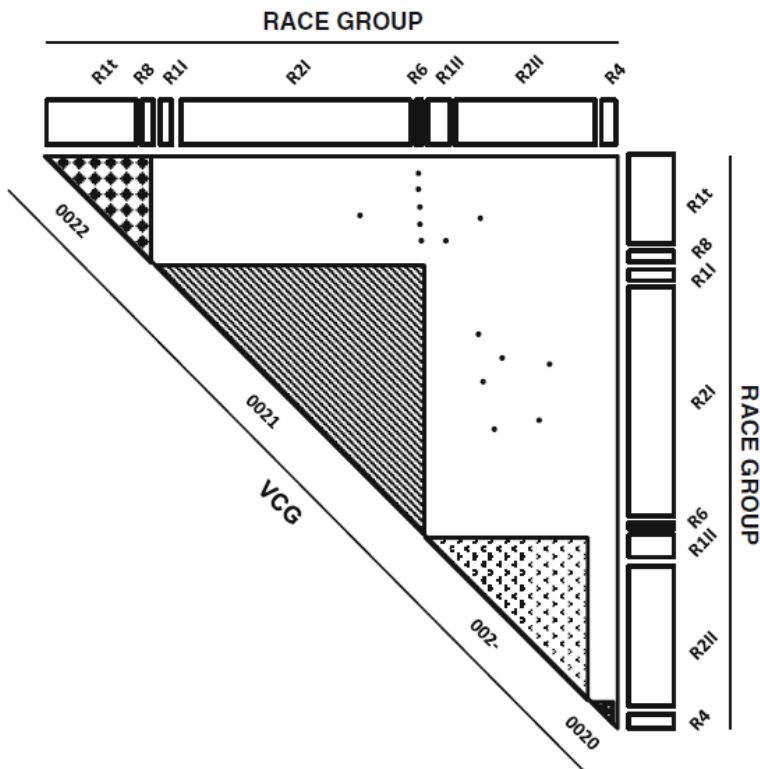







Fig. 6. Representación esquemática de la complementación entre mutantes *nit* de distintos aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Las marcas , , ,  y , corresponden a complementaciones positivas. R1I: raza 1 Grupo molecular I; R1II: raza 1 Grupo molecular II; R1t: raza 1 tipo; R2I: raza 2 Grupo molecular I; R2II: raza 2 Grupo molecular II; R4: raza 4; R6: raza 6; y R8: raza 8. Tomada de Gómez-Lama y Pérez-Artés (2014), Eur J Plant Pathol DOI 10.1007/s10658-014-0412-v

1.2.4. Control de la enfermedad: estrategias de control integrado

Como en otras muchas fusariosis, el control de la fusariosis vascular del clavel (FVC) requiere del uso conjunto de medidas que tiendan a, de una parte, utilizar suelos libres del patógeno o con bajas densidades de él y, de otra, utilizar variedades de clavel resistentes o tolerantes a las razas de *Fod* presentes en la zona. La aplicación exitosa de ambas medidas resulta complicada debido, de una parte, a la dificultad para eliminar los propágulos fúngicos en el suelo y, de otra, a la existencia de más de una raza del patógeno en una misma zona de cultivo. Hasta hace poco, para su desinfección, los suelos se venían tratando con fumigantes, principalmente el Bromuro de metilo (BM), antes de la plantación. Sin embargo, el efecto nocivo del BM sobre la capa de ozono de la atmósfera llevó a la UE a prohibir su uso en el Protocolo de Montreal. La aplicación de esta disposición estimuló a la comunidad científica a investigar sobre otras vías de control de las poblaciones del patógeno en el suelo, fundamentalmente la adición de enmiendas orgánicas. En este sentido, los trabajos realizados por el grupo de los Drs. Melero-Vara y Prados-Ligero demostraron que la adición de gallinaza o compost de pimiento, seguida de la solarización del suelo, ejerce un control

efectivo, aunque no definitivo, sobre los propágulos de *Fod* presentes en él (Melero-Vara *et al.*, 2011; Navas Becerra *et al.*, 2002).

En relación al uso de cultivares de clavel resistentes/tolerantes a la enfermedad, aunque existen variedades comercializadas como resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, dicha resistencia no es completa, puesto que depende de las condiciones ambientales y de la raza o razas del patógeno presentes. Los cultivares con resistencia/tolerancia específica muestran generalmente resistencia/tolerancia completa a una raza concreta del patógeno en la mayoría de las condiciones ambientales, mientras que en aquéllos que presentan resistencia/tolerancia a más de una raza ésta es menos estable, variando las reacciones a la enfermedad (Ben-Yephet *et al.*, 1997).

1.3. Micovirus: virus que infectan hongos

Los virus que infectan especies fúngicas se denominan micovirus. En el pasado, los micovirus se consideraban virus crípticos con genomas de RNA de doble hebra (dsRNA). Sin embargo esta visión ha cambiado en los últimos años, descubriéndose que los micovirus pueden poseer genomas de características distintas, que presentan un alto grado de diversidad, y que existen micovirus que afectan de manera notable el fenotipo de su hongo hospedador (Ghabrial *et al.*, 2015). El primer micovirus del que se tiene evidencia en la literatura es *Agaricus bisporus virus 1* (AbV-1) (Hollings, 1962), causante de una enfermedad de gran relevancia económica en el hongo cultivado *Agaricus bisporus*. Esta enfermedad fue identificada por primera vez en 1948, en la casa productora de hongos propiedad de los hermanos La France en Pennsylvania (Sinden y Hauser, 1950), de ahí que se denominara “enfermedad de La France”. En 1962, Hollings observó y aisló al menos 3 partículas virales provenientes del basidiocarpo de hongos enfermos, y demostró la transmisión de la enfermedad a hongos asintomáticos utilizando estas partículas aisladas. Estos eventos marcaron el inicio de la micovirología moderna.

1.3.1. Características generales de los micovirus

Al igual que los virus de plantas y animales, los micovirus necesitan de células vivas de otros organismos para poder replicarse. Sin embargo, aunque los micovirus comparten algunas características con los virus de plantas y animales, también tienen características únicas (Son *et al.*, 2015):

- (a) Salvo en casos excepcionales, no se han identificado rutas extracelulares de infección en los micovirus.
- (b) Los micovirus se transmiten de manera eficiente por vías intracelulares, como anastomosis hifal (transmisión horizontal) y división celular y esporulación (transmisión vertical).
- (c) Aparentemente, los micovirus carecen de una proteína de movimiento que es esencial para el ciclo de vida de los virus de plantas y animales.

Aunque el descubrimiento de los micovirus es reciente, se piensa que sus orígenes son ancestrales. De hecho, se ha propuesto que los micovirus han coevolucionado en estrecha asociación con sus hospedadores (Lemke, 1979), dando como resultado una asociación beneficiosa para ambas partes. El hecho de que la gran mayoría de infecciones por micovirus sean latentes y persistentes estaría en concordancia con esta idea. La latencia beneficiaría al hospedador permitiendo su supervivencia, en tanto que la persistencia beneficiaría al micovirus, que es un virus que carece de un modo de transmisión extracelular.

1.3.2. Clasificación

El genoma de los micovirus presenta una gran diversidad, existiendo virus con genomas de RNA de doble hebra (dsRNA), de RNA de cadena sencilla (ssRNA) tanto de polaridad positiva como negativa, y de DNA circular de cadena sencilla (ssDNA). Cada una de estas clases de micovirus se divide en distintas familias de acuerdo con la estructura de su genoma y diversas características del mismo. Los micovirus que poseen genomas de dsRNA se clasifican en 7 familias: *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadriviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae*, y *Totiviridae*. Los micovirus con genomas de ssRNA de polaridad positiva pueden pertenecer a 5 familias distintas: *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae*, y *Narnaviridae*. Finalmente, los micovirus que poseen genomas de ssRNA de polaridad negativa y los de ssDNA están aún sin clasificar (Ghabrial *et al.*, 2015; Son *et al.*, 2015).

1.3.2.1. Clasificación de los micovirus de RNA de doble hebra

La gran mayoría de los virus de hongos que se han identificado hasta el momento poseen genomas de dsRNA y, como se ha indicado anteriormente, los micovirus de este tipo pueden pertenecer a 7 familias distintas.

Familia *Totiviridae*

El genoma de los micovirus de esta familia es monosegmentado, con un tamaño que oscila entre 4.6 y 7.0 kilobases (kb). Usualmente, este único segmento de dsRNA contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs) que se solapan parcialmente en el mismo sentido de la cadena de RNA. El primer ORF (más cercano al extremo 5') codifica una proteína de la cápsida/envoltura del virus (CP), mientras que el segundo ORF (más cercano al extremo 3') codifica una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp).

Los géneros *Totivirus* y *Victorivirus* son los únicos de ésta familia que se han encontrado infectando hongos. Los miembros del género *Totivirus* se han identificado en una amplia variedad de organismos hospedadores, desde levaduras hasta basidiomicetos. La especie tipo de este género es *Saccharomyces cerevisiae* virus L-A (Icho y Wickner, 1989). Por el

contrario, los miembros del género *Victorivirus* se ha encontrado solamente infectando hongos filamentosos, y la especie tipo de este género es *Helminthosporium victoriae virus* 190S (Huang y Ghabrial, 1996) (revisado por Ghabrial *et al.*, 2015).

Familia *Partitiviridae*

El genoma de los micovirus de esta familia es bisegmentado, con tamaños que oscilan entre 1.4 y 2.4 kb. Cada segmento está encapsidado por separado y contiene un ORF que codifica una proteína específica. Generalmente, el segmento de mayor tamaño (dsRNA1) codifica una RdRp, y el segmento de tamaño más pequeño (dsRNA2) codifica una CP. Esta familia se compone de 5 géneros, con un rango muy variado de especies hospedadoras (plantas, hongos, y protozoarios). Los géneros *Alpha-*, *Beta-*, y *Gammapartivirus* son los únicos de esta familia que se han encontrado infectando hongos. Los virus del género *Alphapartivirus* se han identificado en hongos y plantas, y su especie tipo es *White clover cryptic virus 1* (Boccardo *et al.*, 1985). Los virus del género *Betapartivirus* también se han encontrado infectando hongos y plantas, y su especie tipo es *Atkinosella hypoxylon virus* (Oh y Hillman, 1995). Por último, el género *Gammapartivirus* parece exclusivo de hongos, y su especie tipo es *Penicillium stoloniferum virus S* (Kim *et al.*, 2003).

Familia *Megabirnaviridae*

El genoma de estos virus se compone de dos segmentos encapsidados por separado en partículas isométricas de ≈50 nm de diámetro. Hasta el momento, el único género en esta familia es el género *Megabirnavirus*, y su especie tipo es *Rosellinia necatrix megabirnavirus 1*, identificado en el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* (Chiba *et al.*, 2009). El tamaño de los segmentos de este micovirus es de 8.9 kb y 7.2 kb, respectivamente. El segmento mayor (dsRNA1) contiene dos ORFs que se solapan parcialmente en el mismo sentido de una cadena de RNA; el ORF1 codifica una CP y el ORF2 una RdRp. El segundo segmento (dsRNA2) contiene dos ORFs que no se solapan, el ORF3 que aparentemente codifica un producto que es procesado en pequeñas proteínas por el micelio infectado, y el ORF4 que codifica una proteína de función desconocida (Kanematsu *et al.*, 2014).

Familia *Chrysoviridae*

El genoma de los miembros de esta familia contiene 4 segmentos de dsRNA encapsidados por separado, con tamaños que oscilan entre 2.4 y 3.6 kb. Cada segmento contiene un único ORF; El ORF1 (dsRNA1) codifica una RdRp, el ORF2 (dsRNA2) codifica una CP, y los ORFs 3 y 4 (dsRNAs 3 y 4) codifican proteínas de función desconocida. El género *Chrysovirus* es el único género de esta familia, y su especie tipo es *Penicillium chrysogenum virus* (Ghabrial y Castón, 2012). Además, dentro de esta familia se han descrito al menos dos clados divergentes de virus, denominados “chryso-like” virus, con entre 3 y 5 segmentos, que no han sido aún asignados a otra categoría taxonómica por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV en inglés) (Li *et al.*, 2013; Urayama *et al.*, 2010, 2012; Wang *et al.*,

2014). A diferencia de los chrysovirus tipo, algunos de estos chryso-like virus tienen la capacidad de alterar la morfología de la colonia y reducir la virulencia de su huésped fúngico (Darissa *et al.*, 2012; Urayama *et al.*, 2012, 2014).

Familia *Quadriviridae*

El genoma de estos micovirus contiene 4 segmentos de dsRNA con tamaños de entre 3.7 y 4.9 kb, encapsidados por separado. Dentro de esta familia sólo se ha descrito un género, el género *Quadrivirus*, con una única especie, *Rosellinia necatrix quadrivirus 1* (Lin *et al.*, 2012, 2013). Cada segmento del genoma de *Rosellinia necatrix quadrivirus 1* contiene un único ORF: el ORF1, que codifica una proteína de función desconocida; los ORFs 2 y 4, que codifican CPs; y el ORF3, que codifica una RdRp.

Familia *Reoviridae*

El genoma de los miembros de esta familia se compone de múltiples segmentos (11-12) de dsRNA, con tamaños comprendidos entre 0.7 y 4.11 kb. Existen 3 mycovirus descritos dentro de esta familia, pertenecientes al género *Mycoreovirus*, que se han denominado *Mycoreovirus 1 a 3*. Los dos primeros se aislaron de *Cryphonectria parasitica*, en tanto que el *Mycoreovirus 3* se aisló de *Rosellinia necatrix* (Hillman y Suzuki, 2004; Wei *et al.*, 2004). A diferencia de lo que ocurre con los virus anteriormente descritos, en los que cada segmento de dsRNA se encapsida de forma independiente, en los reovirus cada partícula vírica contiene todos los segmentos del genoma. Todos los micoreovirus descritos hasta el momento inducen hipovirulencia en sus hospedadores naturales.

Familia *Endornaviridae*

Aunque inicialmente todos los micovirus asignados a esta familia se clasificaban junto a los micovirus de dsRNA, en la actualidad se consideran más próximos a los virus de ssRNA de tipo alfa (Ghabrial y Suzuki, 2009; Hacker *et al.*, 2005). Los endornavirus son los únicos micovirus no encapsidados; los replicones lineales de dsRNA, de entre 14 y 17 kb, no forman verdaderos viriones y se localizan en vesículas citoplásmicas. Cada genoma codifica un único polipéptido que incluye secuencias aminoacídicas típicas de helicasas, UDP glucosiltransferasas y RdRp víricas.

1.4. Micovirus de especies fitopatógenas: el fenómeno de la hipovirulencia

Los micovirus parecen ser organismos ampliamente extendidos, habiéndose identificado en la mayoría de los grupos taxonómicos de hongos, incluidos los hongos patógenos de plantas (revisado en Ghabrial y Suzuki, 2009, y Ghabrial *et al.*, 2015). Como ya se ha dicho, usualmente las infecciones por micovirus son asintomáticas. Sin embargo, este no es siempre el caso, ya que la presencia de un número de micovirus se ha asociado a la alteración de determinados caracteres fenotípicos en sus hongos hospedadores.

Particularmente interesante fue el descubrimiento de micovirus que inducían hipovirulencia en especies fitopatógenas, es decir, que reducían la virulencia del hongo frente a su planta huésped. El fenómeno de la hipovirulencia inducida por micovirus se identificó por primera vez en poblaciones de *Cryphonectria parasitica*, el agente causal del chancro del castaño. La introducción de este hongo procedente de Asia en Norteamérica y Europa provocó la destrucción de millones de árboles maduros en ambas zonas durante la primera mitad del siglo XX. Sin embargo, en los aislados de *C. parasitica* en Europa se observó una reducción en virulencia que se había extendido de forma natural en las poblaciones. Posteriormente se determinó que esta hipovirulencia estaba asociada a elementos citoplasmáticos transmisibles por anastomosis hifal que se identificaron como micovirus (Day *et al.*, 1977; Choi & Nuss, 1992). Éstos poseían genomas monopartitos de ssRNA de polaridad positiva, y constituían una nueva familia a la que se denominó *Hypoviridae* y cuyos miembros se conocen con el nombre genérico de hipovirus (Milgroom y Cortesi, 2004). El descubrimiento de los hipovirus ha tenido un papel determinante en potenciar el interés en la investigación con micovirus.

Además de reducir la virulencia, las infecciones por hipovirus producen una serie de cambios fenotípicos en el hongo hospedador. Por ejemplo, en el caso de hongos con ciclo sexual se ha observado que los hipovirus inducen siempre la pérdida de fertilidad femenina. La presencia de hipovirus induce también habitualmente cambios en la morfología de la colonia y una reducción de la tasa de esporulación. Finalmente, en algunas ocasiones la infección altera la producción de pigmentos y disminuye la acumulación de metabolitos tales como el ácido oxálico (Anagnostakis, 1984; Anagnostakis y Day, 1979; Elliston, 1985).

Con posterioridad se ha visto que el fenómeno de la hipovirulencia no está asociado únicamente a la familia *Hypoviridae*. En estos momentos existen ejemplos bien caracterizados de hipovirulencia inducida por micovirus de una variedad de familias en hongos fitopatógenos que afectan distintos tipos de plantas, desde plantas herbáceas hasta árboles. Los patógenos fúngicos en los que se han identificado micovirus que reducen la virulencia son principalmente miembros de los *Ascomycota*. Sin embargo, un caso bien caracterizado de este tipo de micovirus se ha identificado también en un miembro de los *Basidiomycota* (Lakshman *et al.*, 1998). Las clases taxonómicas de micovirus que causan hipovirulencia varían ampliamente en relación a aquéllas de sus hongos hospedadores. Todos los micovirus asociados a hipovirulencia tienen genomas de ARN de cadena sencilla (ssRNA) o de cadena doble (dsRNA) y, además de la ya mencionada familia *Hypoviridae*, incluyen representantes de las familias *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, y *Reoviridae*. En algunos casos, el fenómeno de la hipovirulencia se ha asociado a la presencia de más de una clase vírica. Así, se han encontrado cepas hipovirulentas del patógeno de avena *Haeminthosporium victoriae* que contienen dos micovirus de familias distintas, un totivirus y un chrysovirus (Ghabrial *et al.*, 2002).

1.5. Micovirus inductores de hipovirulencia como posibles agentes de control biológico

En la actualidad numerosos trabajos están dedicados al análisis de estrategias de control de las enfermedades fúngicas basadas en el uso de agentes de control biológico, ya que éstas pueden contribuir a una agricultura sostenible. En años recientes ha despertado particular interés la hipovirulencia mediada por micovirus como herramienta de control biológico de enfermedades fúngicas en plantas (Nuss, 2005). Los micovirus se consideran actualmente organismos de gran interés en fitopatología, llegándose a plantear la posibilidad de utilizar micovirus que interfieren con la virulencia fúngica como herramientas para explorar e incluso manipular la interacción entre el patógeno fúngico y la planta hospedadora.

La inducción de hipovirulencia en *C. parasitica* por virus de la familia *Hypoviridae*, y la utilización de aislados hipovirulentos para el control del chancro del castaño, sigue siendo el caso más claro y mejor estudiado de este fenómeno (Dawe y Nuss, 2001; Eusebio-Cope *et al.*, 2015; Milgroom y Cortesi, 2004). La hipovirulencia inducida por micovirus, que se extendió primero de forma natural en Europa, se sigue utilizando en la actualidad para controlar el chancro del castaño en los viveros de castaños europeos, y a ella se atribuye la reducción de la gravedad y extensión de la epidemia (revisado en Heiniger y Rigling, 1994). Sin embargo, aunque se han identificado micovirus inductores de hipovirulencia en una variedad de hongos patógenos, el chancro del castaño es hasta el momento la única enfermedad que se ha controlado de manera efectiva con micovirus. Lo que es más, los esfuerzos para controlar el chancro del castaño en Norteamérica mediante la introducción artificial de cepas hipovirulentas de *C. parasitica* infectadas con hipovirus han resultado infructuosos (Griffin y Elkins, 1986; MacDonald y Fulbright, 1991; Milgroom y Cortesi, 2004).

La utilización con éxito de micovirus como agentes de biocontrol parece por lo tanto algo complejo. Ésta no depende solo de la identificación de micovirus que induzcan hipovirulencia, sino que es necesario también que dichos micovirus se mantengan de forma estable en las células del hongo y se transmitan de forma eficiente en las poblaciones naturales del patógeno. Como se ha mencionado anteriormente, los micovirus carecen de una fase infectiva extracelular, y solo se transmiten a través de mecanismos intracelulares como la anastomosis hifal, y a través de las esporas. La anastomosis hifal viable entre dos aislados fúngicos requiere que ambos sean compatibles vegetativamente, es decir, que pertenezcan al mismo Grupo de Compatibilidad Vegetativa (VCG). La interacción entre cepas incompatibles vegetativamente da lugar a muerte celular programada, impidiendo el intercambio de material celular (Leslie y Zeller, 1996). Desde hace tiempo se piensa que este sistema evolucionó como un mecanismo de defensa para limitar la transmisión de virus, transposones y plásmidos que confieren senescencia. Por lo tanto, cabe esperar que una alta diversidad de VCGs en una población fúngica suponga un obstáculo que ralentice, e incluso impida, que un hipovirus se extienda. Las poblaciones de *C. parasitica* de Europa y Norteamérica presentan importantes diferencias en su estructura de VCGs. Las poblaciones de Europa muestran una baja diversidad y, consecuentemente, un bajo número de VCGs (Anagnostakis y Kranz, 1987; Bissegger *et al.*, 1997; Liu y Milgroom, 1996), en tanto que las

poblaciones presentes en los bosques americanos contienen una alta diversidad en VCG (Liu y Milgroom, 1996; Cortesi *et al.*, 2001). Ésta se ha propuesto, por lo tanto, como una de las causas de las diferencias en la eficiencia del tratamiento de biocontrol con cepas hipovirulentas en ambas zonas del mundo.

La dispersión de los hipovirus también viene determinada por la eficiencia en la transmisión dentro de los distintos individuos de la población, que se produce fundamentalmente a través de las conidias. Dicha eficiencia puede variar entre un 1% y un 99%, dependiendo del virus y el aislado fúngico implicados (Chen *et al.*, 1996; Enebak *et al.*, 1994; Shain y Miller, 1992). Por ello, el éxito en el tratamiento de biocontrol con hipovirus también dependerá de la elección adecuada del aislado(s) portador(es).

1.6. Micovirus identificados en especies del género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende una variedad de especies fitopatógenas que en su conjunto afectan numerosos cultivos de interés agronómico. Se han identificado micovirus en varias especies de este género, concretamente en *Fusarium graminearum* (Aminiam *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2002, 2004; Darissa *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2009, 2011; Wang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015, 2016), *Fusarium solani* (Nogawa *et al.*, 1993), *Fusarium proliferatum* (Heaton y Leslie, 2004), *Fusarium poae* (Fekete *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2016), *Fusarium virguliforme* (Marvelli *et al.*, 2014), y *Fusarium oxysporum* (Kilic y Griffin, 1998; Sharzei *et al.*, 2007). Sin embargo, solo tres de los micovirus aislados de especies de *Fusarium* se han podido asociar a una inducción de hipovirulencia en su hongo hospedador. Estos tres micovirus se han identificado todos en el complejo de especies de *Fusarium graminearum* (Darissa *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014).

Fusarium graminearum virus China 9 (FgV-ch9) es el primer virus de *Fusarium* que se ha asociado a hipovirulencia (Darissa *et al.*, 2012). Para determinar el efecto de FgV-ch9 en el hospedador, se analizaron tres versiones del aislado China 9 de *F. graminearum* que presentaban distintas cargas virales (baja, media, y alta). Este análisis comprendía desde la visualización de conidias por microscopía electrónica de barrido, hasta la inoculación y evaluación de síntomas en espigas de trigo y mazorcas de maíz. Se determinó que la presencia de títulos altos del micovirus FgV-ch9 daba lugar a la aparición de un gran número de vacuolas en el citoplasma de las conidias, proliferación de vacuolas que no se observaba en las conidias producidas por el aislado con títulos bajos de FgV-ch9. También se observó que la presencia de títulos medios y altos del micovirus FgV-ch9 disminuía de forma significativa el crecimiento en placa del hongo, y alteraba la morfología de la colonia. Por último, los ensayos sobre trigo y maíz demostraron la asociación de los títulos altos y medios del micovirus FgV-ch9 con una reducción significativa del desarrollo de síntomas de enfermedad (Darissa *et al.*, 2012).

Posteriormente se han identificado otros dos virus asociados a hipovirulencia en *F. graminearum*, *Fusarium graminearum* virus 1 y 2 (FgV1 y FgV2) (Lee *et al.*, 2014). En este

caso, para determinar los posibles efectos fenotípicos de la infección vírica, FgV1 y FgV2 fueron transferidos mediante fusión de protoplastos a la cepa de *F. graminearum* libre de virus PH1. Las cepas infectadas construidas de esta manera se denominaron PH1/FgV1 y PH1/FgV2. El análisis comparado de las versiones con y sin virus de la cepa PH1 puso de manifiesto que la presencia de ambos micovirus reducía significativamente el diámetro de las colonias fúngicas en placas de PDA. Se observó además que la presencia de FgV1 reducía de forma significativa la producción de conidias, mientras que la presencia de FgV2 alteraba de forma significativa la morfología de las conidias, reduciendo su longitud y aumentando su anchura. Por otra parte, ambos virus produjeron un incremento en la pigmentación de las colonias fúngicas. Finalmente, y aún más importante, ensayos de inoculación con espigas de trigo pusieron de manifiesto que tanto FgV1 como FgV2 inducían una disminución en la virulencia del aislado PH1 (Lee *et al.*, 2014).

1.6.1. Micovirus identificados en la especie *Fusarium oxysporum*

El número de micovirus descritos en la especie *Fusarium oxysporum* es aún limitado. Lo que es más, ninguno de los micovirus identificados hasta el momento en esta especie se ha asociado a la inducción de hipovirulencia en sus aislados portadores.

En el año 1998 se describieron por primera vez partículas virales infectando un total de 6 aislados de *F. oxysporum* (Kilic y Griffin, 1998). Se trataba de virus de dsRNA cuyo genoma estaba conformado por 4 segmentos con tamaños estimados de 4, 3.1, 2.7 y 2.2 kb. Sin embargo, no se encontró una asociación entre la presencia o no de estos dsRNAs y la virulencia del aislado fúngico evaluada en ensayos realizados con semillas de soja. El patrón de segmentos de dsRNA que mostraban los micovirus identificados los situaba como miembros de la familia *Chrysoviridae*. Sin embargo, la falta de información relacionada con su secuencia genómica limita su adecuada clasificación filogenética.

En la forma especialis *melonis* de *F. oxysporum* se ha identificado otro micovirus cuyo patrón de segmentos de dsRNA también corresponde a un miembro de la familia *Chrysoviridae* (Sharzei *et al.*, 2007). Se trata del micovirus *Fusarium oxysporum* *Chrysovirus* 1 (FoCV1), cuyo genoma se compone de 4 segmentos de dsRNA de aproximadamente 3, 2.5, 2.3, y 0.7 kb. Sólo se ha secuenciado de forma parcial su segmento de mayor tamaño (dsRNA I), que codifica una proteína que exhibe una gran similitud con RdRps de chrysovirus. Se ha mostrado que la presencia de FoCV1 no tiene ningún efecto en el crecimiento, la morfología, o la virulencia de su hongo hospedador (Sharzei *et al.*, 2007)

En el presente trabajo se describe la estructura molecular completa, el efecto sobre el huésped, y la capacidad de transmisión, de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* micovirus 1 (FodV1), el primer micovirus inductor de hipovirulencia identificado en la especie *F. oxysporum*.

Objetivos de esta tesis

Los objetivos concretos de esta Tesis doctoral han sido:

1. Determinar la secuencia y estructura genómica completa del micovirus FodV1, y analizar las relaciones filogenéticas con otros micovirus previamente descritos **(Capítulo 2)**
2. Determinar el efecto de FodV1 sobre el fenotipo del aislado fúngico en relación a: a) la morfología de la colonia y la velocidad de crecimiento en medio sólido, b) la tasa de conidiación en medio líquido, y c) la virulencia sobre una gama de cultivares de clavel **(Capítulo 3)**
3. Comprobar la capacidad de transmisión de FodV1 entre aislados compatibles vegetativamente, y a través de las esporas, y determinar el efecto de su presencia sobre el fenotipo del nuevo aislado portador **(Capítulo 4)**

Cada uno de los referidos Capítulos constituye el contenido de sendos artículos, publicados o en revisión en las revistas:

Capítulo 1: “Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*”, publicado en *Archives of Virology* (2015) 160: 2375-2379. DOI 10.1007/s00705-015-2509-9.

Capítulo 2: “*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 affects the virulence and other phenotypic traits of its fungal host”, publicado en *Phytopathology* (2018). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0200-R>

Capítulo 3: “Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Virus 1”, en revisión en *European Journal of Plant Pathology*.

CAPÍTULO 2

Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Publicado como/Published as:

Lemus-Minor, C. G., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artés, E. (2015). Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Archives of Virology* 160:2375-2379. DOI:10.1007/s00705-015-2509-9.

Fungal viruses (mycoviruses) are widespread throughout the major taxonomic groups of fungi, including plant pathogenic species. Mycoviruses with RNA genomes are classified in 13 families, of which 6 accommodate mycoviruses with single stranded RNA genomes, and the remaining 7 include those with double stranded RNA (dsRNA) genomes. Mycoviruses with dsRNA genomes are classified into seven major families depending on the number and size of dsRNA segments: *Totiviridae* (monopartite, 4.6-7 kbp), *Endornaviridae* (monopartite, 14-17 kbp), *Partitiviridae* (2 segments, 1.4-2.3 kbp), *Megabirnaviridae* (2 segments, 7-9 kbp), *Chrysoviridae* (4 segments, 2.4-3.6 kbp), *Quadriviridae* (4 segments, 3.7-4.9 kbp), and *Reoviridae* (11/12 segments, 0.7-5 kbp) (Ghabrial and Suzuki, 2009; Ghabrial *et al.*, 2015). In recent years, the potential use of mycoviruses as biocontrol agents for their pathogenic host has increased the research interest in this topic (Nuss, 2005; Pearson *et al.*, 2009).

Fusarium oxysporum is the causal agent of vascular wilt in many different plant species, including crops of agronomic interest (Agrios, 2005; Di Pietro *et al.*, 2003). Although only one mycovirus has been identified in *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum chrysovirus* 1, FoCV1), its genome characterization hasn't been completed (Sharzei *et al.*, 2007). Four dsRNA segments were found in one isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod 116), the causal agent of the vascular wilt of carnation (Baayen, 1988; Garibaldi y Gullino, 1987). This chapter describes the complete sequence of the four segments, purified from isolate Fod 116. The phylogenetic analysis of the deduced amino acid (aa) sequences showed that these dsRNAs constitute the genome of a new *Chrysoviridae* family member, which has been designated *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* mycovirus 1 (FodV1).

The isolate Fod 116 was obtained from a diseased carnation plant located in the Cádiz province of Spain, in 2008 (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2012). The mycovirus dsRNA was purified from mycelium using cellulose column chromatography (Valverde *et al.*, 1990). Single Primer Amplification Technique (SPAT) (Darissa *et al.*, 2010) and production and analysis of cDNA libraries (Valverde and Gutierrez, 2007) generated partial sequence data for each segment. Analysis of these partial sequences with the BLASTX algorithm in the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) allowed arranging them in segments. To fill in the gaps, specific primers were designed. Softwares Lasergene SeqMan™ Version 7.0.0 (DNASTAR®Inc., Madison, USA), CLUSTALX Version 2.1 (Conway Institute UCD Dublin, Ireland), and MEGA 6.06 program (Tamura *et al.*, 2013) were used to assemble full sequences, to compare conserved motifs, and to do the phylogenetic analyses; evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987), and the evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method (Jones *et al.*, 1992).

dsRNA 1 is 3555-bp long (accession number: KP876629) and encodes for a putative RNA dependent RNA polymerase (RdRp) of 1139aa; dsRNA 2 is 2809-bp long (accession number: KP876630), and encodes for a putative protein (P2) of 878aa; dsRNA 3 segment is 2794-bp long (accession number: KP876631), and encodes for a putative capsid protein (CP) of

852aa; and dsRNA 4 is 2646-bp long (accession number: KP876632) and encodes a putative protein (P4) of 830aa.

The deduced aa sequence of the potentially encoded RdRp (dsRNA 1) contained the conserved motifs characteristic of the RNA-dependent RNA polymerases (RdRps) of mycoviruses, particularly of RdRps of viruses in the family *Chrysoviridae* (Ghabrial and Castón, 2012). Specifically, the most closely related RdRps were those of *Fusarium graminearum* dsRNA mycovirus-2 (FgV2) (Yu *et al.*, 2011) and *Fusarium graminearum* mycovirus-China 9 (FgV-ch9) (Darissa *et al.*, 2011), showing 63% and 62% aa sequence identity, respectively. In contrast, the sequence identity with the RdRp of the other chrysovirus reported in the same fungal species, *Fusarium oxysporum* chrysovirus 1 (FoCV1) (Sharzei *et al.*, 2007), was only 26%. The deduced aa sequence of the hypothetical proteins (named P2 and P4) encoded by dsRNA 2 and dsRNA 4 showed similarity to hypothetical proteins found only in known and tentative members of the family *Chrysoviridae*. All these hypothetical proteins have unknown functions. The putative protein encoded by dsRNA 3 ORF indicated that it probably corresponded to a coat protein (CP), having similarities to other coat proteins found in other mycoviruses in the *Chrysoviridae* family.

The phylogenetic analysis, using RdRp and CP aa sequences of FodV1 and other mycoviruses of the *Partitiviridae*, *Totiviridae*, and *Chrysoviridae* families, showed that RdRp and CP of FodV1 grouped in the *Chrysoviridae* family branch, very close to the RdRps and CPs proteins of FgV-ch9 and FgV2. These mycoviruses have been recently designated as chryso-like viruses, which group in a divergent clade corresponding to tentative members of the *Chrysoviridae* family not yet recognized as distinct taxa.

In summary, the complete genomic sequence and organization, and the phylogenetic analyses, support the classification of FodV1 as a novel member of the *Chrysoviridae* family, closely related to other chryso-like viruses previously reported. This is the first report of the complete genomic characterization of a mycovirus identified in the plant pathogenic species *Fusarium oxysporum*.

Acknowledgements

This research was supported by Grants AGL2010-18279 and AGL2013-48980-R from the Spanish Ministry of Science and Innovation, co-funded by the European Union (FEDER funds). C.G. Lemus-Minor was recipient of a JAE-Pre fellowship from CSIC also co-funded with FEDER funds.

CAPÍTULO 3

Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1 accumulation is correlated with changes in virulence and other phenotypic traits of its fungal host

Publicado como:/Published as:

Lemus-Minor, C. G., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artés, E. (2018). *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1 accumulation is correlated with changes in virulence and other phenotypic traits of its fungal host*. *Phytopathology*. Online publication. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0200-R>

Fungal viruses are often associated with latent infections of their hosts, but in some cases alterations in growth, sporulation, pigmentation, and colony morphology, have been described as a consequence of virus infection. More interestingly, a number of mycoviruses have been reported to attenuate fungal virulence (hypovirulence). Hence, interest in mycoviruses has increased because their potential contribution to sustainable agriculture as biological control agents of their fungal hosts (reviewed in: Ghabrial and Suzuki, 2009; Ghabrial *et al.*, 2015; Pearson *et al.*, 2009; Xie and Jiang, 2014).

We have described a new dsRNA mycovirus found in the isolate *Fod* 116 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. This new mycovirus has been designated as *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (*FodV1*) (Lemus-Minor *et al.*, 2015). Phylogenetic analysis applied to the RdRp and CP aa sequences showed that *FodV1* is more similar to *FgV*-ch9 and *FgV2*, two of the *F. graminearum*-infecting mycoviruses that have been associated with the induction of phenotypic changes in their fungal hosts, including hypovirulence (Darissa *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014). In this chapter the hypothesis that the presence of mycovirus *FodV1* could induce phenotypic changes associated with hypovirulence in *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* has been tested. To do so, a comparison of fungal mycelium growth rate, conidiation rate, and virulence on carnation, using two isolates of *Fod* 116, one with a high titer and another with a low titer of the mycovirus, was assessed. Results confirm the correlation between the high accumulation level of *FodV1* and significant changes in fungal mycelium growth rate, conidiation rate, and virulence on carnation plants.

Origin and characteristic of strain *Fod* 116 and dsRNA purification methods are well described above (*see* Capítulo 2). This originally infected isolate with high titer of mycovirus was designated *Fod* 116 V^+ . Another isolate with low titer of mycovirus was selected by single conidia analyses (Lemus-Minor *et al.*, 2018), and designated *Fod* 116 V^- . These isolates were used for all the phenotypic traits evaluated. Full details of all material and methods used are described in (Lemus-Minor *et al.*, 2018).

A relative quantification between the viral RNA and the fungal host RNA was performed doing electrophoresis gel analysis of the total RNA extract of isolate *Fod* 116 V^+ . Results showed that the viral RNA constituted 34% of the total RNA extracted.

To determine the difference in viral titer among isolates *Fod* 116 V^+ and *Fod* 116 V^- , a relative quantification was performed, using the retrotranscription (RT) and real time PCR (qPCR) techniques. To do so, specific primers were designed that amplified the *FodV1* RdRp segment; amplification of two fungal housekeeping genes (actin beta/gamma 1 and β -tubulin) (Lopez-Fernandez *et al.*, 2013) was used to determine the relative amount of *FodV1* dsRNA. Total RNA extractions from both isolates were used as templates. Comparison using the mean of both housekeeping genes showed that the *FodV1* dsRNA contained in isolate *Fod* 116 V^- was extremely low (approximately 2.86×10^5 times lower) compared to that in isolate *Fod* 116 V^+ .

To estimate differences in growth on solid medium, including colony appearance and growth rate, 100 conidia of each *Fod* 116 V^+ and *Fod* 116 V^- were inoculated in the center of PDA plates (9 cm diameter). The radial growth of the four cardinal points was measured using a milimetric sheet. Presence of FodV1 significantly reduced the growth rate in *Fod* 116 at days 5 to 8, and modified the fluffy appearance of the colonies. To estimate the differences in conidiation rate, 200 conidia·mL⁻¹ of the two isolates were inoculated in 5 mL of casein hydrolysate medium, and conidia counted at 2, 3, 4 and 6 days of growth. The presence of a high titer of FodV1 in isolate *Fod* 116 led to a significantly lower conidiation rate reaching a proportional difference of approximately two to one ($V^- : V^+$) in the last days of growth. Finally, to assess the effect of FodV1 on the virulence of isolate *Fod* 116, two pathogenicity tests were performed. Results showed statistical differences between the standardized area under the disease progress curve (sAUDPC) ($P \leq 0.05$) percentages, obtained with both inoculated isolates, observing a significant reduction of disease severity values with all susceptible carnation cultivars when the fungal isolate was infected with high levels of FodV1. There was an exception with one of the cultivars (cultivar Candela), in one of the pathogenicity tests where this cultivar showed no significant differences in the severity of symptoms between the two inoculated isolates. To solve this inconsistency, two additional assays were performed using only the cultivar Candela. Results of both pathogenicity tests revealed that the presence of high accumulation levels of FodV1 in the inoculated isolate *Fod* 116 significantly reduced the sAUDPC percentage.

The results presented in this chapter support the initial hypothesis that a high titer of mycovirus FodV1 was associated with phenotypic changes and hypovirulence in *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Acknowledgments

This research was supported by Grants AGL 2010-18279 and AGL 2013-48980-R, from the Spanish Ministry of Science and Innovation, co-funded by the European Union (FEDER funds). We thank Antonio Valverde and Carlos Casanova for their valuable technical assistance and Emilio A. Cano (Barberet & Blanc S.A.) for providing carnation cultivars.

CAPÍTULO 4

Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi virus 1

En revisión como/in revisión as:

Lemus-Minor, C. G., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artés, E. (2018). Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi virus 1. *European Journal of Plant Pathology*.

Recently, mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1) was found infecting isolate *Fod* 116 of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Lemus-Minor *et al.*, 2015). The high accumulation levels of this virus were related to an effect on some phenotypic traits of its fungal host, including hypovirulence (Lemus-Minor *et al.*, 2018), thus enhancing its potential to be used as a biological control agent. To determine this possibility, we have studied if FodV1 transfers horizontally through hyphal anastomosis between vegetatively compatible isolates, and vertically through spores, and if its presence in the new fungal host reproduces the same phenotypic changes observed in the originally infected one.

A vegetatively compatible virus-free strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, previously transformed with the hygromycin resistant gene (*Fod* 77Hyg^R), was used as recipient isolate in the horizontal transmission assays. Isolates *Fod* 116 V⁺ (donor) and *Fod* 77Hyg^R (recipient) were grown together in the same potato dextrose agar (PDA) plate until mycelium of both isolates came in contact. Mycelium from the contact zone was propagated in PDA plates with hygromycin. After a single conidia selection, a new version of the isolate *Fod* 77Hyg^R infected with a high titer of FodV1 was obtained (*Fod* 77Hyg^RV⁺).

The effect of FodV1 on particular phenotypic traits of its new fungal host was determined using isolates *Fod* 77Hyg^R and *Fod* 77Hyg^RV⁺, as described above (*see* Capítulo 3). The newly infected isolate showed significant lower rates of growth on solid medium and conidiation in liquid medium. Results obtained from two pathogenicity tests also evidenced that the presence of FodV1 significantly reduced the disease severity values obtained with all susceptible carnation cultivars.

Spread of the mycovirus in the fungal population is also determined by the efficiency in the vertical transmission through asexual spores. A number of conidia were obtained from both virus-infected isolates, which were analysed for the presence of viral dsRNA. Results demonstrate that FodV1 transfers through asexual spores, but the efficiency depends on the isolate considered.

The results contained in this chapter demonstrate that FodV1 can be transferred horizontally through hyphal anastomosis between vegetatively compatible isolates, and vertically during conidiation, and that the new recipient isolate reproduces the same phenotypic alterations that the donor does. These characteristics enhance the possibility to use FodV1 as a biological control agent against *Fusarium* wilt of carnation.

Acknowledgements

This research was supported by Grants AGL 2010-18279 and AGL 2013- 48980-R, from the Spanish Ministry of Science and Innovation, co-funded by the European Union (FEDER funds). We thank Antonio Valverde for their valuable technical assistance and Emilio A. Cano (Barberet & Blanc, Dümme Orange) for providing carnation cultivars.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Hace casi 60 años que se caracterizó el primer micovirus, detectado en la especie cultivada *Agaricus bisporus* (Hollings, 1962), pero no fue hasta la década de los 70 del pasado siglo que se descubrió la existencia de micovirus infectando especies de hongos filamentosos patógenos de plantas, y se mostró que éstos podían ser importantes determinantes de virulencia (Anagnostakis, 1982; Day *et al.*, 1977; Day y Dodds, 1979; Ghabrial, 1980; Sanderlin y Ghabrial, 1978; Van Alfen *et al.*, 1975). Desde entonces, el interés en estos virus que infectan hongos fitopatógenos ha ido creciendo, entre otras cuestiones debido a su potencial uso como agentes de control biológico de las enfermedades causadas por sus hongos hospedadores (revisado en: Ghabrial y Suzuki, 2009; Ghabrial *et al.*, 2015; Pearson *et al.*, 2009; Xie y Jiang, 2014).

Durante el proceso de análisis de la diversidad genética y patogénica de una amplia colección de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), se identificó un elemento extracromosómico multisegmentado en uno de los aislados (Fod 116). Dicho elemento presentaba un nivel de acumulación notable, siendo visible en extractos de ADN total sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Los primeros análisis demostraron que el elemento extracromosómico era resistente a la digestión con DNAsa, RNAsa H, exonucleasa III y exonucleasa λ , pero susceptible a la degradación con RNAsa A. Todo ello indicaba que se trataba de moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA), y por tanto de probable naturaleza viral.

Con este precedente, en la presente Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes Objetivos: 1) determinar la secuencia y organización genómica del micovirus, 2) analizar las relaciones filogenéticas con otros micovirus previamente descritos, 3) estudiar el efecto del micovirus sobre determinadas características fenotípicas de su hongo hospedador, y 4) determinar la capacidad de transmisión horizontal del micovirus entre aislados compatibles vegetativamente, y vertical a través de las esporas, y comprobar los efectos del micovirus sobre el fenotipo del nuevo aislado hospedador.

El análisis de la secuencia y organización genómica ha puesto de manifiesto que el micovirus, al que hemos denominado *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1), está compuesto por 4 segmentos de dsRNA de entre 3.555 y 2.646 pb. El segmento 1 codifica una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), y el segmento 3 una proteína de la cápsida (CP). Los segmentos 2 y 4, por su parte, codifican para proteínas hipotéticas de funciones desconocidas (Lemus-Minor *et al.*, 2015). El análisis filogenético basado en las secuencias aminoacídicas determinadas para la RdRp y la CP sitúa claramente a FodV1 en la familia *Chrysoviridae*, dentro del grupo de los que han sido denominados como chryso-like micovirus (Lemus-Minor *et al.*, 2015). A este grupo pertenecen también dos micovirus previamente identificados en el complejo de especies *Fusarium graminearum*: *Fusarium graminearum* virus China 9 (FgV-ch9) (Darissa *et al.*, 2012) y *Fusarium graminearum* virus 2

(FgV2) (Lee *et al.*, 2014), ambos asociados a la inducción de alteraciones fenotípicas, incluida la inducción de hipovirulencia, en su huésped fúngico.

La similitud genómica de FodV1 con micovirus inductores de hipovirulencia nos hizo plantearnos la hipótesis de que FodV1 podría también inducir alteraciones fenotípicas asociadas a hipovirulencia en su hongo hospedador *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Para probar esta hipótesis, en el segundo objetivo de esta Tesis analizamos el efecto que la infección por FodV1 ejerce sobre determinadas características fenotípicas en su aislado hospedador. Para llevar a cabo dicho análisis, era necesario obtener una versión curada (sin virus) del aislado originalmente infectado *Fod* 116 (a partir de ahora denominado como *Fod* 116V⁺). La aproximación para obtener una versión curada, consistió en la selección de conidias individuales del aislado *Fod* 116V⁺ y el subsiguiente análisis de los cultivos monoconídicos obtenidos para determinar la presencia o ausencia de infección viral en cada uno de ellos. De esta manera pudimos seleccionar una versión de *Fod* 116 aparentemente libre de virus (a partir de ahora denominada como *Fod* 116V) (Lemus-Minor *et al.*, 2018). A diferencia del aislado original infectado con FodV1, el aislado *Fod* 116V no dio señal de infección vírica ni en extractos de ADN total, ni en extractos enriquecidos en dsRNA obtenidos mediante cromatografía en columna de celulosa (Lemus-Minor *et al.*, 2018). No obstante, al realizar una RT-PCR cuantitativa para corroborar lo anterior, se detectaron niveles residuales de infección por FodV1 (infección latente) en el aislado *Fod* 116V (Lemus-Minor *et al.*, 2018). Esta dificultad en conseguir versiones curadas de la infección vírica no parece un hecho inusual. Así, en el caso de *Fusarium graminearum* y su micovirus FgV-ch9 tampoco fue posible obtener una versión curada, y los análisis comparados se llevaron a cabo igualmente con un aislado con alta acumulación y otro con baja acumulación de virus (Darissa *et al.*, 2012). Por ello, en nuestro caso, y considerando la extrema diferencia en los niveles de acumulación del micovirus, estas dos versiones del aislado *Fod* 116, V⁺ y V, se usaron para estudiar el efecto de FodV1 sobre determinadas características fenotípicas de su huésped fúngico (Lemus-Minor *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto un claro efecto del micovirus FodV1 sobre todos los caracteres fenotípicos analizados. El análisis comparado de la morfología y velocidad de crecimiento de la colonia en medio sólido, la tasa de conidiación en medio líquido, y la virulencia sobre una gama de cultivares de clavel susceptibles, utilizando los aislados *Fod* 116V⁺ y *Fod* 116V, evidenció alteraciones significativas en todos estos caracteres fenotípicos cuando el aislado fúngico estaba infectado con grandes cantidades del micovirus FodV1 (Lemus-Minor *et al.*, 2018). Así, altos niveles de acumulación de FodV1 dieron lugar a cambios en la morfología de la colonia y a una disminución de la velocidad de crecimiento en medio sólido, así como a una reducción de la tasa de conidiación en medio líquido (Lemus-Minor *et al.*, 2018). Efectos similares han sido descritos para otros micovirus que infectan diferentes especies fúngicas, como es el caso de los micovirus FgV-ch9 (Darissa *et al.*, 2012) y FgV2 (Lee *et al.*, 2014) en *F. graminearum*; de los micovirus MoCV1-A (Urayama *et al.*, 2010) y MoCV1-B (Urayama *et al.*, 2014) en *Magnaporthe oryzae*; y del micovirus BdCV1 (Wang *et al.*, 2014) en *Botryosphaeria dothidea*. Todos estos micovirus se

agrupan, junto con el micovirus FodV1 analizado en esta Tesis, en el clado de los chryso-like micovirus dentro de la familia *Chrysoviridae* (Liu *et al.*, 2012; Lemus Minor *et al.*, 2015; Ghabrial *et al.*, 2015). El hecho de que casi todos los chryso-like micovirus descritos hasta el momento induzcan cambios similares en la morfología de la colonia, en el crecimiento, y en la tasa de conidiación de sus hospedadores fúngicos, sugiere que este grupo de virus podría estar implicado de manera específica en la alteración de procesos celulares relacionados con el crecimiento y la esporulación en hongos.

Aún más interesante resulta el efecto del micovirus FodV1 sobre la virulencia del aislado fúngico. La presencia de altos niveles de infección vírica provocó una disminución significativa en los valores de severidad de la enfermedad, apreciable en todos los cultivares susceptibles de clavel utilizados (Lemus-Minor *et al.*, 2018). En el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, un patógeno vascular, esta reducción de la severidad podría estar relacionada con la reducción significativa del crecimiento micelial y de la tasa de conidiación provocada por la infección viral. Ambas alteraciones podrían estar afectando la eficiencia en la colonización del sistema vascular de la planta, contribuyendo a una disminución en la severidad de los síntomas. Los resultados obtenidos de las pruebas de reaislamiento fúngico realizadas al final de cada ensayo de patogenicidad apoyan esta idea. Se observó que, mientras en las plantas inoculadas con Fod 116V⁻ el hongo se reaislaba con éxito de la mitad superior del tallo, en el caso de las plantas inoculadas con el aislado hipovirulento Fod 116V⁺ el hongo sólo se reaislaba de la parte basal de la planta (Lemus-Minor *et al.*, 2018). Sin embargo, es posible que FodV1 afecte la virulencia de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* a través de otros mecanismos que no sean el impacto negativo directo que un crecimiento y esporulación reducidas puedan tener en la capacidad de éste de colonizar la planta. En este sentido, es interesante señalar que en el hipovirus tipo CHV1-EP713 de *C. parasitica* se ha mostrado que la inducción de alteraciones en crecimiento vegetativo y el efecto en virulencia residen en partes distintas del genoma del micovirus, y que son efectos independientes que pueden ser separados. Así, las actividades de las proteínas p29 y p40, correspondientes a la parte N-terminal y C-terminal de la proteína p69 codificada por la ORF1 respectivamente, son necesarias para inducir pigmentación y esporulación reducidas en *C. parasitica* pero prescindibles para la inducción de hipovirulencia; hipovirus carentes de estas proteínas pierden en gran medida la capacidad de inducir esporulación y pigmentación reducida pero mantienen intacta su capacidad de inducir hipovirulencia (Craven *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1999; Suzuki y Nuss, 2002).

Todos estos resultados confirman la hipótesis inicial y demuestran que la presencia de altos niveles de acumulación del micovirus FodV1 altera significativamente todos los caracteres fenotípicos analizados, incluida la virulencia del aislado frente a clavel (Lemus-Minor *et al.*, 2018). Estos resultados son similares a los publicados para otros chryso-like micovirus, como es el caso de FgV-ch9 (Darissa *et al.*, 2012), MoCV1-A (Urayama *et al.*, 2012), y MoCV1-B (Urayama *et al.*, 2014), y sitúan a FodV1 en el grupo de micovirus inductores de hipovirulencia, con potencial para ser utilizado como agente de control biológico en la fusariosis vascular del clavel.

Una cuestión importante desde el punto de vista del posible uso de FodV1 como agente de control biológico, es la estabilidad de las infecciones que establece en su aislado hospedador. Para determinar si, en efecto, los niveles de infección viral se mantenían estables tras sucesivos subcultivos y a lo largo del tiempo, las colonias fúngicas obtenidas de los reaislamientos al final de cada bioensayo se analizaron para comprobar la presencia y nivel de acumulación de FodV1 en cada una de las versiones de *Fod 116* (V^+ y V^-) inoculadas. En todos los casos se constató que los niveles de infección viral en cada uno de los aislados *Fod 116 V⁺* y *Fod 116 V⁻* permanecían estables a lo largo del tiempo.

El éxito en la utilización de micovirus para controlar poblaciones de hongos fitopatógenos no solo depende de su capacidad para acumularse de manera estable en su hospedador fúngico, sino también de su eficiencia para transmitirse entre aislados y dispersarse en las poblaciones fúngicas naturales. Los micovirus carecen de una fase de infección extracelular, y solo se transmiten intracelularmente mediante anastomosis hifal (transmisión horizontal), y durante la esporogénesis (transmisión vertical). La transmisión horizontal ocurre naturalmente entre individuos que pertenecen al mismo Grupo de Compatibilidad Vegetativa (VCG). La transmisión vertical a través de esporas asexuales también ocurre comúnmente, pero su frecuencia varía ampliamente dependiendo del virus y la cepa implicados (Chen *et al.*, 1996; Enebak *et al.*, 1994; Shain y Miller, 1992).

En el último objetivo de esta Tesis nos planteamos investigar algunos de estos aspectos relacionados con la transmisión viral que determinarán el potencial de FodV1 como posible agente de control biológico. Para ello, hemos analizado si FodV1 se transfiere horizontalmente mediante anastomosis hifal entre aislados compatibles vegetativamente, de una parte, así como la frecuencia de transmisión vertical durante la conidiación, de otra. Además, en el caso de la transmisión horizontal, hemos determinado si el nuevo aislado hospedador reproduce las alteraciones fenotípicas previamente identificadas en el aislado infectado original.

Para analizar la transferencia horizontal, se ha utilizado el aislado originalmente infectado (*Fod 116V⁺*, donante), y otro aislado marcado con un gen de resistencia a higromicina (*Fod 77Hg^R*, receptor). Ambos son aislados que pertenecen al mismo VCG (VCG 0021), y proceden de la misma zona geográfica (Chiclana, Cádiz), pero que habían sido muestreados en años diferentes (2000 y 2008, respectivamente). Nuestros resultados han demostrado que FodV1 puede transferirse horizontalmente desde el aislado *Fod 116V⁺* al aislado *Fod 77Hg^R* mediante anastomosis hifal. Más aún, hemos comprobado que FodV1 se acumula en el nuevo aislado hospedador (*Fod 77Hg^R V⁺*) a niveles inusualmente altos, similares a los detectados en el aislado *Fod 116V⁺* originalmente infectado con el virus. Este resultado muestra que FodV1 tiene una capacidad de acumularse a altos niveles que viene determinada por el propio virus, ya que mantiene dicha capacidad en fondos genéticos distintos del hospedador. Sin embargo, nuestros datos indican también que FodV1 no siempre mantiene niveles altos de acumulación en las células fúngicas, pudiendo presentar

niveles residuales de infección que requieran técnicas sensibles como RT-PCR para su detección. Los mecanismos que determinan la carga viral de FodV1 parecen por lo tanto complejos y elucidarlos requerirá futuras investigaciones.

El análisis comparado de los aislados *Fod* 77Hg^R (libre de virus), y *Fod* 77Hg^R V⁺ (infectado con el virus) ha puesto de manifiesto que FodV1 induce alteraciones fenotípicas en su nuevo hospedador, y que estas alteraciones son similares a las previamente identificadas en el aislado fúngico originalmente infectado. La presencia de Fod V1 produjo una disminución en la velocidad de crecimiento en medio sólido, y en la tasa de conidiación en medio líquido, y alteró la pigmentación y el aspecto algodonoso de la colonia fúngica en el nuevo aislado infectado. Además, y más importante aún, también hemos comprobado que la transferencia del micovirus FodV1 desde el aislado original portador a un nuevo aislado receptor provoca hipovirulencia en este último, cumpliéndose de esta manera el requisito de reproducción de síntomas asociados a hipovirulencia en aquéllos nuevos aislados de la población que pudieran actuar como receptores en la transferencia viral.

Como hemos mencionado anteriormente, mientras que a nivel de poblaciones la principal vía de propagación de la infección viral es por anastomosis hifal (transmisión horizontal), a nivel de individuo los micovirus se propagan fundamentalmente a través de las esporas asexuales (transmisión vertical). La eficiencia en dicha transmisión vertical es un factor que, al determinar como de estable se mantiene la infección vírica en los aislados durante su reproducción, condicionaría la efectividad del posible tratamiento de biocontrol. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que la eficiencia en la transmisión vertical varía dependiendo del aislado portador del virus analizado. En el caso de otras especies fúngicas infectadas con otros micovirus también se han descrito diferencias en la eficiencia de transmisión vertical entre aislados (Chen *et al.*, 1996; Enebak *et al.*, 1994; Shain y Miller, 1992; Zamora *et al.*, 2017). Esta evidencia de variabilidad en el grado de eficiencia en la transmisión vertical sugiere que la selección del aislado fúngico adecuado como diseminador de la infección viral puede ser determinante para el éxito en la transmisión de hipovirulencia en la población.

Como ha quedado establecido desde el primer momento, el micovirus FodV1 ha sido identificado infectando a un aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Aunque existen publicaciones previas describiendo la presencia de dsRNA de origen viral en otras especies del género *Fusarium*, solo en el caso de *Fusarium graminearum* se ha podido establecer una relación entre la presencia del micovirus y la alteración de caracteres fenotípicos asociados a hipovirulencia (Chu *et al.*, 2002; Darissa *et al.*, 2012). Por tanto, FodV1 constituye el primer caso de un micovirus asociado a inducción de hipovirulencia en la especie fitopatógena *F. oxysporum*. *Fusarium oxysporum* es responsable de un amplio rango de enfermedades de plantas, incluyendo cultivos de enorme interés agronómico. Esta especie fúngica se estructura en las que se denominan formae especiales, es decir, aislados del patógeno especializados en la infección de una, o unas pocas, especies vegetales. Aunque el micovirus FodV1 ha sido detectado en la formae specialis *dianthi*, que infecta clavel, su uso como

agente de control biológico podría extenderse a otros cultivos por transfección de otras formae especiales de *F. oxysporum*. La transmisión de virus de dsRNA entre aislados de distintas formae especiales se ve dificultada por la barrera que supone la incompatibilidad vegetativa. No obstante, dicha barrera podría ser superada en el laboratorio utilizando la fusión de protoplastos. En la literatura existen varios ejemplos en los que se ha conseguido transferir micovirus de dsRNA vía fusión de protoplastos a otros aislados de la misma o diferente especie, e incluso de diferente género (van Diepeningen *et al.*, 2000; Kanematsu *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Un caso representativo es el de la transferencia del micovirus FgV1-DK21, el virus asociado a hipovirulencia en la cepa DK 21 de *F. graminearum* (posteriormente *F. bothii*) a aislados de *F. asiaticum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *Cryphonectria parasitica* (Lee *et al.*, 2011). El éxito en la transfección de otras formae especiales de *F. oxysporum* abriría la posibilidad de utilizar el micovirus FodV1 no solo para el control biológico de la marchitez vascular del clavel, sino también para el control de otras marchiteces de cultivos de interés agronómico producidas por *Fusarium*.

Todos los resultados descritos en la presente Tesis doctoral estimulan a continuar las investigaciones sobre el uso de FodV1 en el control biológico de las marchiteces vasculares producidas por *Fusarium*. Para ello sería necesario, de una parte, profundizar en el conocimiento de la interacción virus-hongo, y de otra, comprobar la efectividad en la propagación de la infección por el virus y sus efectos sobre la población del patógeno en condiciones de campo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El micovirus FodV1, identificado en el aislado *Fod 116* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, consta de 4 segmentos de dsRNA de 3.555pb (dsRNA1), 2.809 pb (dsRNA2), 2.794 pb (dsRNA3), y 2.646 pb (dsRNA4). Los segmentos 1 y 3 codifican una ARN polimerasa dependiente de ARN y una proteína de la cápsida, respectivamente. Los segmentos 2 y 4, por su parte, codifican supuestas proteínas desconocidas.
2. El perfil de segmentos de dsRNA, la secuencia y organización genómica, y los valores de similitud observados en el análisis filogenético, identifican al micovirus FodV1 como un nuevo miembro de la familia *Chrysoviridae*, muy relacionado con otros chryso-like virus previamente descritos.
3. FodV1 presenta un elevado nivel de acumulación en su aislado hospedador. Este nivel de acumulación permanece estable a lo largo del tiempo, tras sucesivos subcultivos o después del paso por planta.
4. La presencia de altos niveles de acumulación de FodV1 altera una serie de caracteres fenotípicos en su aislado hospedador:
 - a) De una parte, modifica la morfología y disminuye la velocidad de crecimiento de la colonia en medio sólido.
 - b) Además disminuye la tasa de conidiación en medio líquido.
 - c) Finalmente, provoca una disminución significativa de la virulencia del aislado fúngico frente a todas las variedades de clavel susceptibles ensayadas.
5. FodV1 puede transferirse horizontalmente mediante anastomosis hifal a otro aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* compatible vegetativamente con el aislado portador. Además, FodV1 se acumula en el nuevo aislado a niveles elevados similares a los del aislado portador original.
6. La transferencia de FodV1 al nuevo aislado fúngico provoca, en este último, alteraciones fenotípicas similares a las observadas en el aislado portador original, incluyendo la inducción de hipovirulencia.
7. FodV1 también se transmite verticalmente a través de las esporas asexuales. La eficiencia en esta transmisión vertical depende del aislado considerado. Así, mientras el aislado *Fod 116*, originalmente portador de la infección viral, mostró una baja eficiencia en la transmisión, el aislado *Fod 77*, el nuevo aislado portador, mostró una eficiencia del 100% en dicha transmisión vertical.
8. FodV1 es el primer micovirus asociado a hipovirulencia descrito en la especie *F. oxysporum*. Sus efectos sobre el huésped y su capacidad de transmisión lo identifican como un potencial agente de control biológico de la fusariosis vascular del clavel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Science.
- Aloi, C., and Baayen, R. P. 1993. Examination of the relationships between vegetative compatibility groups and races in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Plant Pathol. 42(6):839-850.
- Aminian, P., Azizollah, A., Abbas, S., and Naser, S. 2011. Effect of double-stranded RNAs on virulence and deoxynivalenol production of *Fusarium graminearum* isolates. J Plant Prot Res 51(1):29.
- Anagnostakis, S. L., and Day, P. R. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. Phytopathology 69(12):1226-1229.
- Anagnostakis, S. L. 1982. Biological Control of Chestnut Blight. Science 215(4532):466-471.
- Anagnostakis, S. L. 1984. Nuclear gene-mutations in *Endothia (Cryphonectria) parasitica* that affect morphology and virulence. Phytopathology 74(5):561-565.
- Anagnostakis, S. L., and Kranz, J. 1987. Population-dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. Phytopathology 77(5):751-754.
- Andrés Arés, J. L., Vicente, M. J., Cenis, J. L., Collar, J., Tello, J. C., y Cifuentes, D. 2001. Variación genética y patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en España. Boletín Sanidad Vegetal Plagas, 27, 249–257.
- Baker, R., Hanchey, P., and Dottarar, S. D. 1978. Protection of carnation against *Fusarium* stem rot fungi. Phytopathology 68(10):1495-1501.
- Baayen, R. P. 1988. *Fusarium* wilt of carnation. Disease development, resistance mechanism of the host and taxonomy of the pathogen. Thesis. University of Utrecht, Holland.
- Baayen, R. P., vanDreven, F., Krijger, M. C., and Waalwijk, C. 1997. Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f sp *dianthi* and *Fusarium redolens* f sp *dianthi*. Eur. J. Plant Pathol. 103(5):395-408.
- Ben-Yephet, Y., Reuven, M., Lampel, M., Nitzani, Y., and Mor, Y. 1992. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* races in carnation. Phytoparasitica 20: 225.
- Ben-Yephet, Y., Reuven, M., Zveibil, A., and Shtienberg, D. 1996. Effects of abiotic variables on the response of carnation cultivars to *Fusarium oxysporum* f sp *dianthi*. Plant Pathol. 45(1):98-105.
- Bisseger, M., Rigling, D., and Heiniger, U. 1997. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. Phytopathology 87(1):50-59.
- Boccardo, G., Milne, R. G., Luisoni, E., Lisa, V., and Accotto, G. P. 1985. Three seedborne cryptic viruses containing double-stranded RNA isolated from white clover. Virology 147(1):29-40.
- Cevallos, J. F., Gonzalez, D., y Arbelaez, G. 1990. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en clavel en la sabana de Bogotá. Agronomía Colombiana 7: 40-46.
- Cortesi, P., McCulloch, C. E., Song, H. Y., Lin, H. Q., and Milgroom, M. G. 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Genetics 159(1):107-118.

- Craven, M. G., Pawlyk, D. M., Choi, G. H., and Nuss, D. L. 1993. Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *Journal of virology* 67(11):6513-6521.
- Chen, B. S., Chen, C. H., Bowman, B. H., and Nuss, D. L. 1996. Phenotypic changes associated with wild-type and mutant hypovirus RNA transfection of plant pathogenic fungi phylogenetically related to *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86(3):301-310.
- Chiba, S., Salaipeth, L., Lin, Y. H., Sasaki, A., Kanematsu, S., and Suzuki, N. 2009. A novel bipartite double-stranded RNA Mycovirus from the white root rot Fungus *Rosellinia necatrix*: molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. *Journal of Virol.* 83(24):12801-12.
- Chiocchetti, A., Ghignone, S., Minuto, A., Gullino, M. L., Garibaldi, A., and Migheli, Q. 1999. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* Isolated from Soil, Basil Seed, and Plants by RAPD Analysis. *Plant Dis.* 83(6):576-581.
- Choi, G. H., and Nuss, D. L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257(5071):800-803.
- Chu, Y.-M., Jeon, J.-J., Yea, S.-J., Kim, Y.-H., Yun, S.-H., Lee, Y.-W., and Kim, K.-H. 2002. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5):2529-2534.
- Chu, Y.-M., Lim, W.-S., Yea, S.-J., Cho, J.-D., Lee, Y.-W., and Kim, K.-H. 2004. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes* 28(1):135-143.
- Darissa, O., Willingmann, P., and Adam, G. 2010. Optimized approaches for the sequence determination of double-stranded RNA templates. *J. Virol. Methods* 169(2):397-403.
- Darissa, O., Willingmann, P., Schafer, W., and Adam, G. 2011. A novel double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*: nucleic acid sequence and genomic structure. *Arch. Virol.* 156(4):647-658.
- Darissa, O., Adam, G., and Schafer, W. 2012. A dsRNA mycovirus causes hypovirulence of *Fusarium graminearum* to wheat and maize. *Eur. J. Plant Pathol.* 134(1):181-189.
- Dawe, A. L., and Nuss, D. L. 2001. Hypoviruses and chestnut blight: Exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 35:1-29.
- Day, P. R., Dodds, J. A., Elliston, J. E., Jaynes, R. A., and Anagnostakis, S. L. 1977. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 67(11):1393-1396.
- Day, P. R., and Dodds, J. A. 1979. Viruses of plant pathogenic fungi. *Viruses and Plasmids in Fungi*:201-238.
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., and Roncero, M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* 4(5):315-325.
- Elliston, J. E. 1985. Characteristics of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia-parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology* 75(2):151-158.
- Enebak, S. A., Hillman, B. I., and Macdonald, W. L. 1994. A hypovirulent isolate of *Cryphonectria-parasitica* with multiple, genetically unique dsRNA segments. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7(5):590-595.

- Eusebio-Cope, A., Sun, L. Y., Tanaka, T., Chiba, S., Kasahara, S., and Suzuki, N. 2015. The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. *Virology* 477:164-175.
- Fekete, C., Giczey, G., Papp, I., Szabo, L., and Hornok, L. 1995. High-frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded-RNA genome in *Fusarium-Poae*. *Fems Microbiology Letters* 131(3):295-299.
- García-Ruiz, A., Tello, J. C., Avilés-Guerrero, A., y Ordovás-Ascaso, J. 2009. Fusariosis del clavel (*F. oxysporum* f. sp. *dianthi*). Últimos avances en su control. Ediciones Agrotécnicas S. L., Madrid, 275 pp.
- Garibaldi, A. 1977. Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and varietal susceptibility. *Acta Hort.* 71:97-101.
- Garibaldi, A. 1981. Ulteriori ricerche sulla specializzazione biologica di *Fusarium oxysporum* Schlecht, f. sp. *dianthi* (Prill, et Del.) Snyd. et Hans. *Rivista di ortoflorofruitticoltura italiana* 65(5):353-358.
- Garibaldi, A. 1983. Resistenza di cultivar di garofano nei confronti di otto patotipi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyd et Hans. *Rivista di ortoflorofruitticoltura italiana* 67(4):261-270.
- Garibaldi, A., Brunatti, F., and Gullino, M. L. 1986. Suppression of *Fusarium* wilt of carnation by competitive non-pathogenic strains of *Fusaria*. *Medical Fac. Landbouw Rijksuniv Gent*. 51: 633–638.
- Garibaldi, A., and Gullino, M. L. 1987. Attempts of biocontrol of *Fusarium*-wilt of carnation in Italy. *Phytopathology* 77(12):1721-1721.
- Ghabrial, S. A. 1980. Effects of Fungal Viruses on Their Hosts. *Annual review of phytopathology* 18(1):441-461.
- Ghabrial, S. A., Soldevila, A. I., and Havens, W. M. 2002. Molecular genetics of the viruses infecting the plant pathogenic fungus *Helminthosporium victoriae*. In: Tavantzis, S. (Ed.), *Molecular Biology of double stranded RNA: Concepts and Applications in Agriculture, Forestry and Medicine*. CRC Press, Boca Raton, pp. 2013-236.
- Ghabrial, S. A., and Suzuki, N. 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:353-84.
- Ghabrial, S. A., and Castón, R. J. 2012. Family - Chrysoviridae report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Pages 509-513. in: *Virus Taxonomy A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz, eds. Elsevier, San Diego.*
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., and Suzuki, N. 2015. 50-plus years of fungal viruses. *J. Virol.* 479–480(0):356-368.
- Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., and Perez-Artes, E. 2012. Molecular analysis of Spanish populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* demonstrates a high genetic diversity and identifies virulence groups in races 1 and 2 of the pathogen. *Eur. J. Plant Pathol.* 132(4):561-576.
- Gómez-Lama Cabanás, C., and Perez-Artes, E. 2014. New evidence of intra-race diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* populations based on Vegetative Compatibility Groups. *Eur. J. Plant Pathol.* 139(3):445-451.

- Griffin, G. J., and Elkins, J. R. 1986. Chestnut blight. In: Roane, M. K., Griffin, G. J., Elkins, J. R. (Eds.), Chestnut blight, other endothenia diseases, and the genus Endothenia. St. Paul, American Phytopathological Society, pp. 1–26.
- Hacker, C. V., Brasier, C. M., and Buck, K. W. 2005. A double-stranded RNA from a Phytophthora species is related to the plant endornaviruses and contains a putative UDP glycosyltransferase gene. J. Gen. Virol. 86:1561-1570.
- Heaton, L., and Leslie, J. 2004. Double-stranded RNAs associated with Fusarium proliferatum mitochondria. Mycol Progress 3(3):193-198.
- Heiniger, U., and Rigling, D. 1994. Biological-control of chestnut blight in Europe. Annual review of phytopathology 32:581-599.
- Hillman, B. I., and Suzuki, N. 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, Cryphonectria parasitica. Adv. Virus Res. 63:423-472.
- Hollings, M. 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. Nature 196:962.
- Huang, S., and Ghabrial, S. A. 1996. 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 93(22):12541-12546.
- Icho, T., and Wickner, R. B. 1989. The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. Journal of Biological Chemistry 264(12):6716-6723.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput. Appl. Biosci. 8(3):275-282.
- Kanematsu, S., Sasaki, A., Onoue, M., Oikawa, Y., and Ito, T. 2010. Extending the fungal host range of a partitivirus and a mycoreovirus from Rosellinia necatrix by inoculation of protoplasts with virus particles. Phytopathology 100(9):922-930.
- Kanematsu, S., Shimizu, T., Salaipeh, L., Yaegashi, H., Sasaki, A., Ito, T., and Suzuki, N. 2014. Genome rearrangement of a mycovirus Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 affecting its ability to attenuate virulence of the host fungus. Virology 450:308-315.
- Kilic, O., and Griffin, G. J. 1998. Effect of dsRNA-containing and dsRNA-free hypovirulent isolates of Fusarium oxysporum on severity of Fusarium seedling disease of soybean in naturally infested soil. Plant and Soil 201(1):125-135.
- Kim, J. W., Kim, S. Y., and Kim, K. M. 2003. Genome organization and expression of the Penicillium stoloniferum virus S. Virus Genes 27(3):249-256.
- Lakshman, D. K., Jian, J., and Tavantzis, S. M. 1998. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of Rhizoctonia solani occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences 95(11):6425-6429.
- Lee, K.-M., Yu, J., Son, M., Lee, Y.-W., and Kim, K.-H. 2011. Transmission of Fusarium boothii Mycovirus via Protoplast Fusion Causes Hypovirulence in Other Phytopathogenic Fungi. PLOS ONE 6(6):e21629.

- Lee, K. M., Cho, W. K., Yu, J., Son, M., Choi, H., Min, K., Lee, Y. W., and Kim, K. H. 2014. A comparison of transcriptional patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. *Plos One* 9(6):11.
- Lemke, P. A. 1979. Coevolution of fungi and their viruses. In: Molitoris H.P., Hollings M., Wood H.A. (eds) *Fungal Viruses. Proceedings in Life Sciences*. Springer, Berlin, Heidelberg 2-7.
- Lemus-Minor, C. G., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artés, E. 2015. Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Arch. Virol.* 160(9):2375-2379.
- Lemus-Minor, C. G., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artés, E. 2018. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 accumulation is correlated with changes in virulence and other phenotypic traits of its fungal host. *Phytopathology*. *online publication*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0200-R>.
- Leslie, J. F., and Zeller, K. A. 1996. Heterokaryon incompatibility in fungi - More than just another way to die. *J. Genet.* 75(3):415-424.
- Li, L., Liu, J., Xu, A., Wang, T., Chen, J., and Zhu, X. 2013. Molecular characterization of a trisegmented chrysovirus isolated from the radish *Raphanus sativus*. *Virus Res.* 176(1-2):169-178.
- Li, P., Zhang, H., Chen, X., Qiu, D., and Guo, L. 2015. Molecular characterization of a novel hypovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology* 481(Supplement C):151-160.
- Li, P., Lin, Y., Zhang, H., Wang, S., Qiu, D., and Guo, L. 2016. Molecular characterization of a novel mycovirus of the family Tymoviridae isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology* 489(Supplement C):86-94.
- Lin, Y. H., Chiba, S., Tani, A., Kondo, H., Sasaki, A., Kanematsu, S., and Suzuki, N. 2012. A novel quadripartite dsRNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology* 426(1):42-50.
- Lin, Y. H., Hisano, S., Yaegashi, H., Kanematsu, S., and Suzuki, N. 2013. A second quadrivirus strain from the phytopathogenic filamentous fungus *Rosellinia necatrix*. *Archives of virology* 158(5):1093-1098.
- Liu, H., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S. A., Li, G., Peng, Y., Yi, X., and Jiang, D. 2012. Evolutionary genomics of mycovirus-related dsRNA viruses reveals cross-family horizontal gene transfer and evolution of diverse viral lineages. *Bmc Evolutionary Biology* 12.
- Liu, Y. C., and Milgroom, M. G. 1996. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86(1):79-86.
- Lopez-Fernandez, L., Ruiz-Roldan, C., Pareja-Jaime, Y., Prieto, A., Khraiweh, H., and Roncero, M. I. G. 2013. The *Fusarium oxysporum* *gnt2*, encoding a putative N-acetylglucosamine transferase, is involved in cell wall architecture and virulence. *Plos One* 8(12):21.

- Macdonald, W. L., and Fulbright, D. W. 1991. Biological-control of chestnut blight - use and limitations of transmissible hypovirulence. *Plant Dis.* 75(7):656-661.
- Marvelli, R. A., Hobbs, H. A., Li, S. X., McCoppin, N. K., Domier, L. L., Hartman, G. L., and Eastburn, D. M. 2014. Identification of novel double-stranded RNA mycoviruses of *Fusarium virguliforme* and evidence of their effects on virulence. *Archives of virology* 159(2):349-352.
- Melero-Vara, J. M., López-Herrera, C. J., Prados-Ligero, A. M., Vela-Delgado, M. D., Navas-Becerra, J. A., and Basallote-Ureba, M. J. 2011. Effects of soil amendment with poultry manure on carnation *Fusarium* wilt in greenhouses in southwest Spain. *Crop Protection* 30(8):970-976.
- Milgroom, M. G., and Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annual review of phytopathology* 42:311-338.
- Navas-Becerra, J. A., Melero-Vara, J. M., Prados-Ligero, A. M., López-Rodríguez, M., Basallote-Ureba, M. J., y López-Herrera, C. J. 2002. Methyl bromide alternatives for cut-flower production in Chipiona. *Proceeding of International Conference on Alternatives to Methyl Bromide*, 252-255.
- Nelson, P. E., Tammen, J., and Baker, R. 1960. Control of vascular wilt diseases of carnation by culture-indexing. *Phytopathology* 50(5):356-360.
- Nogawa, M., Shimosaka, M., Kageyama, T., and Okazaki, M. 1993. A double-stranded-RNA mycovirus from the plant-pathogenic fungus, *Fusarium-solani* f. sp. *robiniae*. *Fems Microbiology Letters* 110(2):153-158.
- Nuss, D. L. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(8):632-642.
- Oh, C.-S., and Hillman, B. I. 1995. Genome organization of a partitivirus from the filamentous ascomycete *Atkinsonella hypoxylon*. *J. Gen. Virol.* 76(6):1461-1470.
- Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., and Arthur, K. 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol. Plant. Pathol.* 10(1):115-28.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. On the maximum-likelihood method for molecular phylogeny. *Jpn. J. Genet.* 62(6):547-548.
- Sanderlin, R. S., and Ghabrial, S. A. 1978. Physicochemical properties of two distinct types of virus-like particles from *Helminthosporium victoriae*. *Virology* 87(1):142-151.
- Shain, L., and Miller, J. B. 1992. Movement of cytoplasmic hypovirulent agents in chestnut blight cankers. *Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot.* 70(3):557-561.
- Sharzei, A., Banihashemi, Z., and Afsharifar, A. 2007. Detection and characterization of a double-stranded RNA mycovirus in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Iran J. Plant Path Vol. 43(2007):9-26.
- Sinden, J.W., and Hauser, E. 1950. Report of two new mushroom diseases. *Mushroom Sci.* 1, 96-100.
- Son, M., Yu, J., and Kim, K. H. 2015. Five questions about mycoviruses. *PLoS Pathog.* 11(11):7.
- Suzuki, N., Chen, B. S., and Nuss, D. L. 1999. Mapping of a hypovirus p29 protease symptom determinant domain with sequence similarity to potyvirus HC-Pro protease. *J. Virol.* 73(11):9478-9484.

- Suzuki, N., and Nuss, D. L. 2002. Contribution of protein p40 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. *Journal of virology* 76(15):7747-7759.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725-2729.
- Tello, J. C., y Lacasa, A. 1990. *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (*Fusariosis* vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Bol. San. Veg. Plagas* 19:1-190.
- Urayama, S., Kato, S., Suzuki, Y., Aoki, N., Le, M. T., Arie, T., Teraoka, T., Fukuhara, T., and Moriyama, H. 2010. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *J. Gen. Virol.* 91:3085-3094.
- Urayama, S., Ohta, T., Onozuka, N., Sakoda, H., Fukuhara, T., Arie, T., Teraoka, T., and Moriyama, H. 2012. Characterization of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 structural proteins and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 86(15):8287-8295.
- Urayama, S., Sakoda, H., Takai, R., Katoh, Y., Tuong Minh, L., Fukuhara, T., Arie, T., Teraoka, T., and Moriyama, H. 2014. A dsRNA mycovirus, *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-B, suppresses vegetative growth and development of the rice blast fungus. *Virology* 448:265-273.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T., and Jordan, R. L. 1990. Analysis of double-stranded-RNA for plant-virus diagnosis. *Plant Dis.* 74(3):255-258.
- Valverde, R., and Gutierrez, D. 2007. Transmission of a dsRNA in bell pepper and evidence that it consists of the genome of an endornavirus. *Virus Genes* 35(2):399-403.
- Van Alfen, N. K., Jaynes, R. A., Anagnostakis, S. L., and Day, P. R. 1975. Chestnut Blight: Biological Control by Transmissible Hypovirulence in *Endothia parasitica*. *Science* 189(4206):890-891.
- Van Diepeningen, A. D., Debets, A. J., Slakhorst, S. M., Fekete, C., Hornok, L., and Hoekstra, R. F. 2000. Interspecies virus transfer via protoplast fusions between *Fusarium poae* and black *Aspergillus* strains. *Fungal Gen. Reports.* 47(20):99-100.
- Wang, L., Zhang, J. Z., Zhang, H. L., Qiu, D. W., and Guo, L. H. 2016. Two Novel Relative Double-Stranded RNA Mycoviruses Infecting *Fusarium poae* Strain SX63. *Int. J. Mol. Sci.* 17(5):13.
- Wang, L. P., Jiang, J. J., Wang, Y. F., Hong, N., Zhang, F. P., Xu, W. X., and Wang, G. P. 2014. Hypovirulence of the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*: association with a coinfecting Chrysovirus and a Partitivirus. *J. Virol.* 88(13):7517-7527.
- Wang, S., Kondo, H., Liu, L., Guo, L., and Qiu, D. 2013. A novel virus in the family Hypoviridae from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virus research* 174(1-2):69-77.
- Wej, C. Z., Osaki, H., Iwanami, T., Matsumoto, N., and Ohtsu, Y. 2004. Complete nucleotide sequences of genome segments 1 and 3 of *Rosellinia* anti-rot virus in the family Reoviridae. *Archives of virology* 149(4):773-777.
- Wright, G. F. K., Guest, D. I., Wimalajeewa, D. L. S., and vanHeeswijck, R. 1996. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based

- on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Eur. J. Plant Pathol.* 102(5):451-457.
- Xie, J., and Jiang, D. 2014. New Insights into Mycoviruses and Exploration for the Biological Control of Crop Fungal Diseases. *Annual review of phytopathology* 52(1):45-68.
- Yu, J., Kwon, S. J., Lee, K. M., Son, M., and Kim, K. H. 2009. Complete nucleotide sequence of double-stranded RNA viruses from *Fusarium graminearum* strain DK3. *Archives of virology* 154(11):1855-1858.
- Yu, J., Lee, K. M., Son, M., and Kim, K. H. 2011. Molecular characterization of *Fusarium graminearum* virus 2 isolated from *Fusarium graminearum* strain 98-8-60. *Plant Pathol. J.* 27(3):285-290.
- Zamora, P., González Casas, A., Dueñas, M., San Martín, R., and Díez, J. J. 2017. Factors influencing growth, sporulation and virus transfer in *Cryphonectria parasitica* isolates from Castilla and León (Spain). *Eur. J. Plant Pathol.* 148(1):65-73.