



## UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado

**Ingeniería agraria, alimentaria, forestal y de desarrollo rural sostenible**

TESIS DOCTORAL

**Micovirus en aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp *dianthi*: caracterización genómica y biológica.**

**Mycoviruses that infect *Fusarium oxysporum* f. sp *dianthi*: genomic and biological characterization**

Doctoranda

**Almudena Torres Trenas**

DIRECTORAS

**Dra. Encarnación Pérez Artés**

**Dra. María Dolores García Pedrajas**

Septiembre, 2019

TITULO: *MICOVIRUS EN AISLADOS DE FUSARIUM OXYSPORUM F. SP  
DIANTHI: CARACTERIZACION GENOMICA Y BIOLÓGICA*

AUTOR: *Almudena Torres Trenas*

---

© Edita: UCOPress. 2019  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---





**TÍTULO DE LA TESIS:** Micovirus en aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*: caracterización genómica y biológica.

**DOCTORANDO/A:** Almudena Torres Trenas

**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 'Micovirus en aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*: caracterización genómica y biológica.' realizado por Almudena Torres Trenas, 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, con una estancia de tres meses 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 de la doctoranda han sido satisfactorios. Los resultados obtenidos han sido presentados como comunicaciones orales y/o en poster en los Congresos Nacionales XVIII y XIX de la Sociedad Española de Fitopatología (Palencia 2016 y Toledo 2018, respectivamente), en el Congreso Internacional 15th Mediterranean Phytopathological Union Congress (Córdoba 2017), y en el I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias (Almería 2018), obteniendo en este último el premio a la Mejor Comunicación Oral en el Panel Científico de Agronomía, Producción Vegetal, Ingeniería y Sostenibilidad Agrícola.

Asimismo, el contenido de la presente Tesis ha dado lugar a la elaboración de tres manuscritos, uno de ellos publicado en *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Q1), otro que actualmente se encuentra aceptado con modificaciones en *Frontiers in Microbiology* (Q1), y un tercero que será sometido en breve a revisión en la revista *Viruses* (Q2).

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

Córdoba, 17 de Septiembre de 2019

Firma del/de los director/es

Fdo.: Encarnación Pérez Artés

Fdo.: Mª Dolores García Pedrajas





**TÍTULO DE LA TESIS:** Micovirus en aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*: caracterización genómica y biológica.

**DOCTORANDO/A:** Almudena Torres Trenas

#### **INFORME RAZONADO DEL TUTOR**

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

El trabajo de investigación titulado “Micovirus en aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*: caracterización genómica y biológica”, realizado por la doctoranda Dña. Almudena Torres Trenas bajo la dirección de las Dras. Encarnación Pérez Artés y María Dolores García Pedrajas, puede ser presentado para su exposición pública 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, 17 de Septiembre de 2019

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 AGL2013-48980-R ('Análisis de micovirus como potenciales agentes de control biológico en enfermedades fúngicas vasculares') del Ministerio Español de Economía y Competitividad, y AGL2016-80048-R ('Los micovirus como herramientas para el control biológico de la verticilosis y la fusariosis. Elucidando los mecanismos que determinan la interacción virus-hongo-planta'), del Ministerio Español de Ciencia e Innovación, ambos cofinanciados por la Unión Europea (fondos FEDER).

La doctoranda Almudena Torres Trenas ha disfrutado de una ayuda para un contrato de formación de doctores (BES-2014-068780) del Ministerio Español de Ciencia e Innovación, asociada al proyecto de investigación AGL2013-48980-R.





## Agradecimientos

‘Es de bien nacida, ser agradecida’. Este es uno de mis refranes favoritos, y aunque no lo parezca, me hace pensar. Pienso que es fácil acordarte en estos momentos de aquellas personas con las que has trabajado bien, te han prestado su ayuda, te han aconsejado... pero, hay personas en la vida con las que a pesar de que su influencia no haya sido tan positiva, te hacen aprender a ser fuerte, a sobreponerte, a enfrentarte a tus miedos y a aprender a tomar decisiones y saber aceptar las consecuencias. A todas ellas, mi más sincero agradecimiento, sin ellas no sería la investigadora, y lo que es más importante la persona que hoy soy.

Llegar a ser doctora para mí no solo ha consistido en un trabajo de 5 años al que dedicarle mil horas, si no que ha sido un objetivo de vida, una meta que alcanzar, ha supuesto el medio con el que dar rienda suelta a mi gran vocación, la investigación.

Aunque no ha sido un camino de rosas, sí que se ha convertido en una gran aventura que comenzó cuando con unos 6 años dije que quería ser bióloga. En ese momento, mi madre me dijo que si es lo que quería que tenía que llegar a lo más alto, y ahí fijé mis objetivos. Gracias mamá, por creer en mí desde el primer momento, por inculcarme buenos valores y por ser un ejemplo a seguir.

Esta gran aventura ha tenido innumerables capítulos en los que el ‘conejillo de indias’ fue mi hermano mayor. Aún recuerdo pincharle el dedo para tener sangre para ver en el microscopio de juguete; comprobar la hipótesis de que la electricidad atraviesa nuestro cuerpo metiéndole los dedos en el enchufe o irnos a coger lombrices para diseccionarlas después. Gracias Dani por todas las aventuras que hemos vivido juntos y las que nos quedan por vivir. Gracias por pensar siempre que soy ‘la lista’ de la familia y apoyarme en todo momento en mis estudios.

Aunque siempre he dicho que no creo en la suerte, he de reconocer que en 2014 se alinearon los astros y se presentó la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Para mí esos astros tienen nombre, Encarnita y Manuel Pineda. Su confianza me permitió comenzar este camino.

Manolo, gracias por pensar desde el primer momento en que me conociste que podía llegar alto, por tenerme siempre en cuenta y por comprender los fallos de una novata. Has sido y espero que sigas siendo un maestro en mi vida, pues creo que aún me queda mucho que aprender de ti.

Encarnita, que decirte después de estos cinco años...La palabra gracias se queda pequeña para expresar todo lo que pienso. Gracias por depositar la mayor de las confianzas en mí, por ser mi directora, una madre, una amiga y todo lo que ha hecho falta durante este tiempo. Gracias por tu comprensión y paciencia, nadie me ha 'regañado' y al mismo tiempo me ha enseñado a corregir errores tan bien como tú. Gracias por tus múltiples consejos tanto laborales como personales. Realmente, eres una gran mentora, y creo que formamos un pedazo de equipo, juntas somos capaces de hacer más cosas de las que pensamos, (como escribir una tesis en tiempo record, con publicaciones y disfrutando de las múltiples discusiones científicas, jaja!). Espero que nuestro camino no se separe aquí y que podamos cosechar muchos más éxitos juntas.

Gracias Mariola y Carmen, por vuestra gran labor, por ser el ying y el yang de esta tesis, y por enseñarme que con trabajo duro todo sale. Gracias Mariola por confiar en mi para desarrollar este proyecto y por ayudarme en las investigaciones. Gracias Carmen, por dedicarme tu valioso tiempo, por ser mi compi de laboratorio, desayuno y de alguna que otra cerveza con espetos. Me gustaría que os sintierais orgullosas de esta tesis y sobre todo de los conocimientos que se desprenden de ella, ya que junto a vosotras he intentado ser una esponja para aprender lo máximo en mi estancia en 'La Mayora' y poder aplicarlo a todas mis investigaciones.

Gracias Carlos Lemus por dejarme ser tu pupila micoviral durante mis primeros años de tesis y por estar siempre disponible para ayudarme aunque nos separen miles de km. Gracias Carlos Casanova por intentar comprenderme y apaciguarme en mis estreses y rabietas, por no salir huyendo en mis medio destrucciones de laboratorio y ser mucho más que un técnico. Gracias Antonio Valverde por tu trabajo y consejos. Gracias compañeros por vuestra paciencia, por aguantar mis nervios, mi locura y 'mis contaminaciones'. Gracias por vuestras charlas, consejos y ayuda,... simplemente gracias por estar ahí durante todo este tiempo.

Durante mi estancia en 'La Mayora', también he tenido el placer de compartir investigaciones y vida con grandes profesionales y compañeros.

Gracias a todos por el cariño con que me tratasteis y por ser mi pequeña familia de Málaga.

Gracias a todos y cada uno de los compis del IAS, desde los chicos del desayuno (Toñi, Ana, Juanma, Isabel, Carlos López, Pepe Melero) hasta las viejas (Lola, Carmen Osuna, Omar...) y nuevas generaciones de becarios (Fran, Susana, Nuria..) con los que sin lugar a duda he disfrutado de grandes momentos y entre los que me llevo grandes amigos.

No me gustaría dejar atrás a mis otros apoyos, aquellos que no son del trabajo ni de la investigación, y que a pesar de no entender cómo va este mundo o verlo desde otros puntos de vista siempre están ahí para escucharme y ayudarme. Gracias a mis niñas, a mis cubanos, a mis chupiwinis, gracias a todos por ayudarme a hacer este camino más llevadero.

También quiero agradecer al resto de los miembros de mi familia, quienes día a día han disfrutado y sufrido conmigo esta tesis.

Por último, y el más especial de los agradecimientos a mi marido, Manolo. Gracias Manolo por ser mi apoyo, mi guía y mi aliento. Gracias por creer en mí desde el primer momento, por ser siempre tan positivo y por ser el mayor ejemplo de perseverancia que conozco. Gracias por recordarme cada día lo que valgo y por ser el más cariñoso y comprensivo de los compañeros, a pesar de mis malos humos a veces y mis constantes altibajos. Gracias por ser mi compañero de viaje.

A todos vosotros, gracias.



'En algún lugar, alguna cosa increíble aguarda a ser descubierta'.

**Carl Sagan**



## Resumen

*Fusarium oxysporum* es el hongo fitopatógeno de suelo causante de la marchitez vascular, una enfermedad fúngica que origina importantes pérdidas económicas en una gran variedad de cultivos de interés agronómico. *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) es la 'forma specialis' que causa la marchitez vascular en clavel (*Dianthus caryophyllus*). Actualmente no existe ningún método de control eficiente para esta enfermedad, y por ello diversos estudios se han dirigido a la búsqueda de nuevas herramientas de control, incluyendo la utilización de micovirus como agentes de control biológico de los hongos fitopatógenos.

Los micovirus son virus que infectan hongos. Estos virus se han descrito infectando a la mayoría de grupos taxonómicos de hongos, incluyendo hongos fitopatógenos. La mayoría de estos virus poseen genomas de ARN, de doble cadena (dsRNA) o de cadena sencilla (ssRNA), aunque se han descrito unos pocos con genomas de ADN circular (ssDNA). Generalmente, los micovirus carecen de una vía de infección extracelular, y solo se transmiten entre aislados mediante anastomosis hifal (transferencia horizontal), o durante la producción de esporas (transferencia vertical). La mayoría de las infecciones por micovirus son crípticas, es decir, no tienen un efecto sobre su huésped fúngico, pero en algunos casos la infección viral se ha asociado a la alteración de determinados caracteres fenotípicos, siendo el de mayor relevancia la reducción de la virulencia (hipovirulencia).

En estudios recientes se ha identificado y caracterizado el micovirus 'Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1' (FodV1), detectado infectando una cepa de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. Hasta el momento, FodV1 es el único micovirus de *F. oxysporum* que ha sido asociado a la inducción de hipovirulencia. En esta tesis se ha usado la microscopia laser confocal y dos cepas isogénicas de *Fod*, infectada y no infectada con FodV1, marcadas ambas con el gen que expresa la proteína fluorescente GFP, para analizar el efecto del micovirus sobre el patrón de colonización fúngica en el sistema vascular de la planta. Los resultados obtenidos han demostrado que la infección por FodV1 produce una disminución en la velocidad y una restricción en la distribución espacial de la colonización fúngica en el interior de la planta. Además, también se ha analizado la incidencia de infecciones por FodV1 en una colección de 221 aislados de *Fod* obtenidos entre 2008 y 2012 en la misma área geográfica que la



cepa originalmente infectada, observándose finalmente una baja incidencia de la infección viral entre los aislados analizados (<2%).

Como continuación de la búsqueda de micovirus con potencial como agentes de virocontrol de las fusariosis vasculares, en esta tesis se han identificado nuevos micovirus que se encuentran infectado aislados de *Fod*. El primer micovirus identificado y caracterizado molecularmente ha sido 'Fusarium oxysporum f. sp. dianthi hypovirus 2' (FodHV2), detectado en un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* procedente de Marruecos. El genoma de FodHV2 tiene una longitud de 9,444 pb excluyendo la cola poli(A), y un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína. Esta poliproteína contiene 3 dominios altamente conservados de UDP glucosa/esterol glucosiltransferasa, una polimerasa dependiente de ARN (RdRp), y una ARN helicasa viral. Además, se han identificado tres residuos de cisteína, histidina, y glicina en la región N-terminal, que podrían representar el sitio catalítico de una papain like-proteasa. La secuencia genómica completa de FodHV2 se ha comparado con la de otros micovirus en el género *Hypovirus*. Los resultados de esta comparación y del análisis filogenético apoyan la distinción, recientemente propuesta por otros autores, de tres géneros (*Alphahypovirus*, *Betahypovirus*, and *Gammahypovirus*) dentro de la familia *Hypoviridae*, e identifican a FodHV2 como un nuevo miembro del grupo de los Betahipovirus. El efecto biológico de FodHV2 en su aislado portador ha sido determinado utilizando dos cepas isogénicas, infectada y no infectada con FodHV2, obtenidas mediante transferencia horizontal del hipovirus via anastomosis hifal. La comparación de ambas cepas mostró que FodHV2 no tiene efecto sobre el crecimiento vegetativo, la conidiación, ni la virulencia de su aislado hospedador. FodHV2 es el primer hipovirus que se describe infectando una especie *F. oxysporum*, y además es el primero descrito en un aislado procedente de África.

El segundo micovirus identificado en esta tesis ha sido el micovirus 'Fusarium oxysporum f. sp. dianthi mitovirus 1' (FodMV1), detectado en un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* procedente de Colombia. FodMV1 posee un genoma de 2,313 pb de longitud, en el que se ha identificado un único ORF que codifica una RdRp viral. Una búsqueda de homología usando la secuencia nucleotídica y el programa BlastX mostró que FodMV1 es un nuevo miembro del género *Mitovirus* en la familia *Narnaviridae*. Una de las características de los mitovirus es que se replican en la mitocondria. De acuerdo con esto, el genoma de FodMV1 presenta una serie de características comunes al resto de mitovirus,

como son una alta concentración de A+U (58.8%) y la presencia de un número de codones UGA, que codifican el aa triptófano en vez de una señal de 'stop' cuando se aplica el código genético mitocondrial. Asimismo, los extremos 5'- y 3'- UTR presentan una estructura secundaria característica también de mitovirus. El análisis filogenético sitúa a FodMV1 en un clado separado del resto de mitovirus que infectan otras especies de *Fusarium*.

FodMV1 parece tener una relativamente alta incidencia, ya que se ha identificado infectando a otros 22 aislados de *Fod*. Entre estos aislados infectados existen aislados procedentes de España (18) y Colombia (4). La presencia del mismo mitovirus en aislados de zonas geográficas tan separadas sugiere una dispersión de la infección viral a través de la comercialización de esquejes de clavel entre ambos países.



## Summary

*Fusarium oxysporum* is a soilborne fungal pathogen that causes vascular wilt disease in a wide number of agronomically important crops. *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) is the 'forma specialis' that causes vascular wilt in carnation (*Dianthus caryophyllus*). Currently there is no efficient method for the control of this disease, and therefore several studies have been directed to the search for new control tools, including the use of mycoviruses as biological control agents of phytopathogenic fungi.

Mycoviruses are viruses that infect fungi. They have been described infecting all major taxonomic groups of fungi, including phytopathogenic fungi. The majority of mycoviruses have double-stranded or single-stranded RNA genomes. Generally, mycoviruses lack an extracellular route of infection and are transmitted by hyphal anastomosis between isolates (horizontal transmission), and during the production of spores (vertical transmission). Most mycovirus-infections are cryptic, that is, they do not have an effect on their hosts, but in some cases the viral infection has been associated to the alteration of particular phenotypic traits of the fungal host, including the induction of hypovirulence.

In recent studies we have identified and characterized mycovirus 'Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1' (FodV1), found infecting a strain of *Fod*. Till now, FodV1 is the only mycovirus that has been associated to the induction of hypovirulence in *F. oxysporum*. In this thesis, we have used confocal laser scanner microscopy and two isogenic GFP-labelled strains of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, infected and not infected with FodV1, to analyze the effect of the mycovirus on the plant colonization pattern of its fungal host. Results demonstrate that FodV1 decreases the speed and alters the spatial distribution of the fungal colonization into the plant. We have also analysed the incidence of FodV1-viral infections in a collection of 221 isolates sampled between 2008 and 2012 in the same geographic area where the originally infected isolate was obtained. Results evidenced a very low (<2%) incidence of viral infections. These results provide the first microscopic evidence about the effect of a hypovirulence-inducing mycovirus on the pattern of plant colonization by its fungal host.

As a continuation of the search for mycoviruses with potential as virocontrol agents of vascular fusariosis, in this thesis we have identified and

characterized new mycoviruses that are infecting *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* isolates. The first mycovirus identified has been 'Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* hypovirus 2' (FodHV2), found infecting a strain of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* from Morocco. The genome of FodHV2 is 9,444 nucleotides (nt) long excluding the poli(A) tail, and has a single open reading frame (ORF) encoding a polyprotein. The polyprotein contains three highly conserved domains of UDP glucose/sterol glucosyltransferase, RNA-dependent RNA polymerase, and viral RNA helicase. In addition, some particular residues of Cys, Hys, and Gly were detected in the N-terminal region that could represent the catalytic site of a former papain-like protease. The complete genomic sequence of FodHV2 has been compared with that of other mycoviruses in the genus *Hypovirus*. Results from this comparison and from phylogenetic analyses support the distinction, recently proposed by other authors, of three genera (*Alphahypovirus*, *Betahypovirus*, and *Gammahypovirus*) within the family *Hypoviridae*, and identifies FodHV2 as a new member of the *Betahypovirus* group. The biological effect of FodHV2 on the fungal host has also been determined using two isogenic isolates, infected and no-infected with the mycovirus, obtained by horizontal transference of the virus through hyphal anastomosis. Comparison of the infected and non-infected isogenic strains showed that FodHV2 did not alter the vegetative growth, neither the conidiation, nor the virulence of its fungal host. FodHV2 is the first member of the family *Hypoviridae* identified in *F. oxysporum*. Another unique feature of FodVH2 has to do with its geographical origin, because it is the first hypovirus identified in a fungal strain from the African continent.

Another mycovirus identified in this thesis has been 'Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* mitovirus 1' (FodMV1), found infecting a strain of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* from Colombia. The genome of FodMV1 is 2,313 nt long, and comprises a 172-nt 5'-UTR, a 2,025-nt single ORF encoding a RdRp of 675 aa residues, and a 113-nt 3'-UTR. Homology BlastX searches identified FodMV1 as a novel member of the genus *Mitovirus* in the family *Narnaviridae*

Mitoviruses are characterized by replicating within the mitochondria of the host. According to this, the genome of FodMV1 presents a series of characteristics common to the rest of mitoviruses, as are a high percentage of A+U (58.8%), and the presence of a number of UGA codons that encode the aa tryptophan rather than acting as stop codons as in the universal genetic code. Also, the 5'- and 3'- UTR regions of FodMV1, like other mitoviruses, can be

folded into potentially stable stem-loop structures. Results from phylogenetic analyses place FodMV1 in a different clade than the rest of mitoviruses described in *Fusarium* spp.

Incidence of FodMV1-infections is relatively high. Of particular interest is the fact that FodMV1 has been detected infecting *Fod* isolates from Spain and Colombia. The presence of the same mitovirus species infecting fungal strains from two geographical areas so far away could be explained by the the dispersion of the viral infection through the commercialization of infected carnation cuttings between both countries.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

## Introducción general

1.- Floricultura .....	2
1.1.-Floricultura en Andalucía.....	2
2.- El cultivo de clavel.....	3
2.1.- Importancia económica y distribución geográfica .....	3
2.2.- Origen del clavel.....	4
2.3.- Morfología e histología del clavel.....	4
2.4.- Plagas y enfermedades del clavel.....	6
3.-Fusariosis vascular del clavel (FVC).....	9
3.1.- <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>dianthi</i> , agente causante de la FVC.....	10
3.2.- Sintomatología e identificación de la enfermedad.....	12
3.3.- Diversidad genética y patogénica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>dianthi</i> .....	12
3.4.- Control de la fusariosis vascular de clavel.....	15
4.- Micovirus.....	16
4.1.- Características generales de los micovirus.....	17
4.2.-Efect de los micovirus sobre las características fenotípicas del huésped.....	17
4.3.- Clasificación de los micovirus.....	18
4.3.1.-Clasificación de los micovirus con genomas de dsRNA.....	19
4.3.2.- Clasificación de los micovirus con genomas de ssRNA.....	27
4.3.2.1.- Clasificación de los micovirus con genomas de ssRNA(+)......	28
4.3.2.2.- Clasificación de los micovirus con genomas de ssRNA(-)......	36
4.4.- Micovirus como agentes de control biológico.....	39
4.5.- Micovirus identificados en especies del género <i>Fusarium</i> .....	41
4.5.1.- Micovirus identificados en la especie <i>Fusarium oxysporum</i> .....	42
4.5.2.- FodV1: El primer micovirus asociado a la inducción de hipovirulencia en <i>Fusarium oxysporum</i> .....	43
<b>Objetivos Generales.....</b>	<b>45</b>



**CAPÍTULO I: Mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 decreases the colonizing efficiency of its fungal host .....47**

1.1.- Abstract

1.2.- Introduction

1.3.- Material and Methods

1.3.1. Fungal isolates and culture conditions

1.3.2. dsRNA Extraction and FodV1 Detection

1.3.3 Obtention of a GFP-Expressing Version of Isolate *Fod 77* and Transference of Mycovirus FodV1

1.3.4. Colonization and Virulence Bioassays

1.3.5. Microscopic Monitoring of Pathogen Progression in Carnation Plants

1.3.6. Pathogenicity tests

1.4. Results

1.4.1. Transformation of Isolate *Fod 77* with the *gfp* Gene and Transference of Mycovirus FodV1

1.4.2. Mycovirus FodV1 Decreases the Speed and Modifies the Spatial Distribution of the Plant Colonization by its Fungal Host

1.4.3. Mycovirus FodV1 Has a Low Incidence in the Collection of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* Isolates Analyzed

1.5. Discussion

Acknowledgements

Supplemental data

**CAPÍTULO II: Molecular and biological characterization of the first hypovirus identified in *Fusarium oxysporum*.....53**

2.1.-Abstract

2.2.-Introduction

2.3.-Material and Methods

2.3.1.-Fungal isolates and culture conditions

2.3.2.-DsRNA purification

2.3.3.-cDNA synthesis, cloning and sequencing, and phylogenetic analysis

2.3.4.-FodHV2 detection

2.3.5.-Virus transmission

2.3.6.-Effect of FodHV2 on selected phenotypic traits of its fungal host

2.4.-Results

2.4.1.-Detection of viral dsRNA in *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*

2.4.2.- Molecular characterization of a novel mycovirus infecting *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*

2.4.3.-Phylogenetic relationship between FodHV2 and other hypoviruses

2.5.2.-Incidence of FodHV2 infections in the collection of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* isolates analysed

2.5.5.-Biological effect of FodHV2 on *F. oxysporum* f. sp *dianthi*

3.5. Discussion  
Acknowledgements  
Supplemental data

**CAPITULO III: Characterization and incidence of the first member of the  
genus *Mytovirus* identified in the phytopathogenic species *Fusarium  
oxysporum*.....57**

3.1.-Abstract

3.2.-Introduction

3.3.-Material and Methods

3.3.1.-Fungal isolates and culture conditions

3.3.2.-dsRNA extraction

3.3.3.-cDNA synthesis, cloning, and sequencing

3.3.4.-Molecular and phylogenetic analysis

3.3.5.-Incidence of mytovirus FodMV1 in the collection analysed

3.4.-Results

3.4.1.-Identification of viral infections in a collection of *F. oxysporum* f.  
sp. *dianthi* isolates

3.4.2.-Cloning and sequencing of the viral dsRNA

3.4.3.-Molecular characterization of a novel mitovirus infecting *F.*  
*oxysporum* f. sp. *dianthi*

3.4.4.-Phylogenetic relationship between FodMV1 and other mitoviruses.

3.4.5.-Incidence of mitovirus FodMV1 in the collection analysed

3.5.-Discussion

Acknowledgements

Supplemental data

**Conclusiones.....61**

**Referencias.....65**



## *Introducción general*

## 1.- Floricultura

Actualmente existe una gran confusión en las diferentes fuentes de información existentes acerca del cultivo de plantas ornamentales debido a que se trata de un sector muy diverso. Los diferentes términos que hacen referencia a este sector, como pueden ser 'floricultura', 'jardinería', 'plantas ornamentales', no son usados de manera apropiada. Dentro de lo que todos conocemos como el área de la floricultura, habría que distinguir tres grupos:

- Plantas ornamentales. Son aquéllas que son comercializadas vivas, en diferentes tipos de soportes (macetas, contenedores, etc), para ser usadas como decoración en los interiores de las casas o en jardines.
- Material vegetal. En este grupo englobamos a esquejes, plántones, etc, usados para la venta a otros invernaderos o viveros donde completan el desarrollo de las plantas.
- Planta para corte (flor cortada). En este caso, el objeto de venta es la flor, la cual es cortada en el momento más óptimo de su desarrollo para su venta en ramos. En este caso, se trata de un producto perecedero con una limitada vida post-cosecha. Normalmente, la parte que es cortada es la flor con el tallo, aunque en algunas ocasiones lo que se corta son las ramas, tallos y hojas.

Estos productos, constituyen la base de un importante sector dentro de la economía de la Unión Europea, siendo España uno de los mayores productores, sólo detrás de Holanda. La floricultura en general cada vez está tomando mayor relevancia dentro del panorama hortofrutícola nacional. Los cultivos destinados a la obtención tanto de plantas ornamentales como de plantas para flor cortada se distribuyen entre las Comunidades Autónomas de Andalucía, Murcia, Canarias, Cataluña, Galicia y Valencia, estando Andalucía a la cabeza con un 56% de la superficie nacional.

### 1.1.- Floricultura en Andalucía

A principios de los años 70, en el Aljarafe Sevillano se comenzó a cultivar plantas para la obtención de flor cortada así como plantas ornamentales.

Rápidamente estos cultivos se extendieron hacia la zona de Los Palacios-Lebrija, llegando a implementarse en los suelos de las costas gaditanas

(Chipiona–Sanlúcar). En Almería también se desarrolló rápidamente este sector, convirtiéndose esta provincia en la principal productora de flor cortada; sin embargo, esto fue durante poco tiempo. El desplome que sufrieron los precios debido a la excesiva producción, no pudo ser soportado por los agricultores, decidiendo gran parte de ellos cambiar sus cultivos a producciones hortofrutícolas. Actualmente, a pesar de diversos periodos de crisis en el sector, Andalucía cuenta con más de 1.200 hectáreas (ha) de suelo destinadas a estos cultivos, repartidas mayoritariamente entre las provincias de Sevilla y Cádiz.

La producción de flor cortada en Andalucía, al igual que en el resto de España, se concentra fundamentalmente en el clavel y la rosa, representando ambas aproximadamente el 60% del total de la producción.

## **2.- El cultivo del clavel**

### **2.1.- Importancia económica y distribución geográfica.**

El clavel constituye uno de los cultivos con mayor relevancia a nivel mundial. Su fácil y rápida multiplicación lo ha convertido en objeto de numerosas comercializaciones de esquejes a nivel internacional. Los principales productores de este cultivo son Colombia y España, seguidos por otros países situados en la cuenca mediterránea como Israel, Turquía, Italia, Palestina, Marruecos, Grecia y Francia.

Actualmente, Colombia es el principal proveedor y productor de clavel estándar a nivel mundial, con más de 4.000 ha dedicadas a este cultivo. En España, se estima que la superficie dedicada al cultivo de clavel ronda las 2.000 ha, encontrándose aproximadamente el 50% localizadas en Andalucía.

La implantación de este cultivo en la comunidad andaluza supuso el comienzo de la floricultura en esta zona. La alta rentabilidad obtenida por los agricultores lo convirtió en una buena alternativa dentro de la horticultura intensiva. De este modo, el clavel ha llegado a ser a día de hoy el cultivo más representativo de la flor cortada en la Comunidad Autónoma, con un 80% de la producción española.

Las zonas de producción andaluzas están concentradas 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).

## 2.2.- Origen del clavel

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Caryophyllaceae, cuyo origen se sitúa en Asia Menor, Persia o India, desde donde se extendió a la cuenca mediterránea. Como ocurre con otras especies, el clavel que conocemos actualmente es el resultado de la domesticación de claveles silvestres. Los primeros datos que conocemos de este cultivo proceden de los primeros compendios de botánica redactados en la antigua Grecia. En ellos, se catalogó la flor del clavel bajo el nombre "Dianthus", nombre derivado de dos palabras griegas: "Dia", o Dios; y "anthos", que significa flor. Por lo tanto, los claveles fueron reconocidos como "las flores de Dios".

El origen del cultivo como tal para la producción de flor cortada ocurrió en Lyon alrededor del año 1845. Los agricultores buscaban variedades de clavel con floración 'remontante' (floración continua), con el objetivo de asegurar el abastecimiento floral durante los meses de invierno. Así, un floricultor lionés cruzó una variedad herbácea con una leñosa existente en el sur de Francia, cuya floración era continua durante el invierno. Este clavel fue denominado 'Clavel Niza'. Más tarde, en 1942, William Sim, tras diferentes hibridaciones y posteriores selecciones, obtuvo una nueva variedad a la que le puso su nombre: 'Clavel Sim o Clavel Americano'. De esta manera se generaron los dos grandes grupos de clavel precursores de las más de 250 variedades actuales, las cuales han sido producidas mediante la mejora clásica y nuevas técnicas como la radiación ionizante, capaz de provocar la aparición de quimeras cuyos caracteres se mantienen mediante multiplicación vegetativa.

## 2.3.- Morfología e histología del clavel

Las plantas de clavel son perennes y pertenecen a la clase Magnoliopsida, es decir, son plantas dicotiledóneas. Su forma típica es una planta cespitosa, que presenta un sistema radicular fibroso. Sus raíces son axomorfas, de gran longitud, pudiendo alcanzar los 30cm de profundidad. Posee numerosos tallos glabros y con nudos muy pronunciados, que pueden alcanzar hasta 1m de altura. Sus hojas son lineales, angostas, opuestas y envainadoras, más anchas

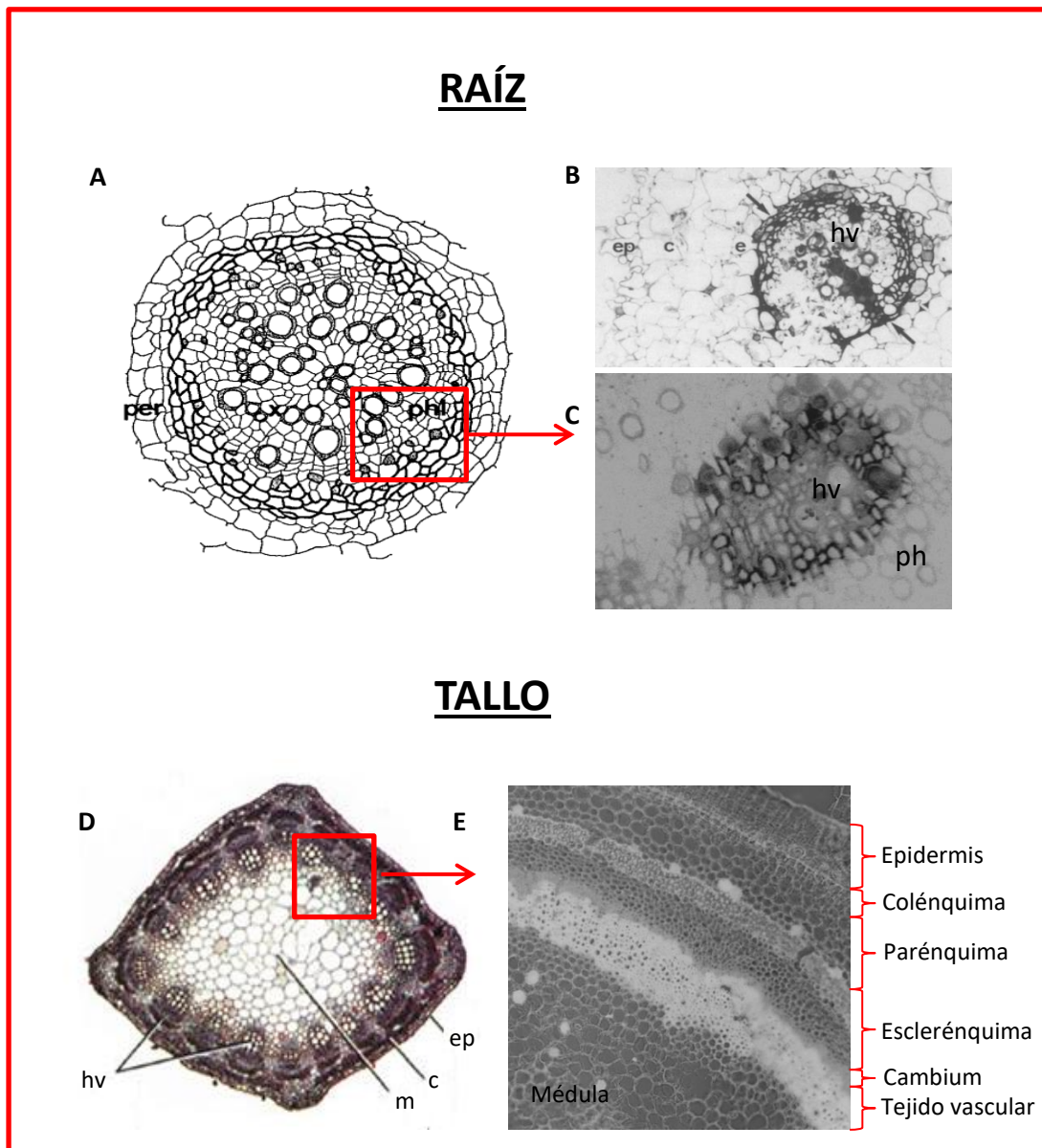
las basales que las caulinares, con nerviación articulada. Sus flores son vistosas, pedunculadas en panícula o cima laxa, y a veces pueden encontrarse solas o en grupos de cinco. Estas flores además son muy olorosas (Rallo y Fernández, 1998) (Figura 1).



**Figura 1.-** Imágenes de clavel donde se pueden observar algunas características botánicas de este cultivo. (A) Planta herbácea. Fuente: [http://malinalli-herbolariamedica.blogspot.com/2013/05/clavel-carnation-dianthus-caryophyllus\\_8.html](http://malinalli-herbolariamedica.blogspot.com/2013/05/clavel-carnation-dianthus-caryophyllus_8.html). (B) Clavel estándar solitario. Fuente: <https://www.gtush.com/los-claveles/>. (C) Clavel en panícula o cima laxa. Fuente: <https://imagenesflores.com/fotos-de-flores-claveles-14-imagenes-bellisimas-hd-gratis/>.

Desde el punto de vista histológico, en un corte transversal del tallo de una planta de clavel se pueden observar los haces vasculares situados de forma circular, delimitando una zona externa y una interna de tejido fundamental: córtex y médula, respectivamente. Los haces vasculares pueden encontrarse muy próximos o separados mediante el parénquima interfascicular. El córtex, por su parte, se encuentra formado por los tejidos que se encuentran en la epidermis y el sistema vascular, constituidos por parénquima y tejidos de sostén como son el colénquima y el esclerénquima. Por último, la médula, formada casi por completo por parénquima, queda encerrada por el sistema vascular. En las plantas de clavel podemos encontrar también el cambium, una estructura secundaria que da lugar a tejidos vasculares secundarios y que se sitúa en los meristemos laterales de forma cilíndrica (Figura 2).





**Figura 2.- Histología de raíz y tallo de clavel.** (A) Esquema de un corte trasversal de raíz de clavel (Baayen, Van Eijk y Elgersma, 1989). (B) Imagen al microscopio óptico de una sección de un corte trasversal de raíz de clavel (Baayen, Van Eijk y Elgersma, 1989). (C) Imagen al microscopio electrónico de una sección de un corte trasversal de raíz de clavel. (D) Esquema de un corte trasversal de tallo de clavel. Fuente: <http://www.vi.cl/gepe/Seccion%206/36-20a.jpg>. (E) Imagen al microscopio electrónico de una sección de un corte trasversal de tallo de clavel. Per: peridermis; ph: tejido floemático; ep: epidermis; c: córtex; e: endodermis; hv: haces vasculares; m: médula.

## 2.4.-Plagas y enfermedades del clavel

Las principales plagas que sufren los cultivos de clavel son:

- **Tortrix europeo (*Cacoecimorpha pronubana*) y tortrix surafricana (*Epichoristodes acerbella*).** Son lepidópteros cuyas larvas se comen las hojas y perforan los botones florales, devorándolos. Tienen entre tres y cuatro generaciones anuales.

- **Pulgonos (*Myzus persicae*)**. Es una plaga muy frecuente en el cultivo del clavel. Los pulgonos pican las hojas y flores para succionar los azúcares que se transportan por el floema.
- **Trips (*Frankliniella occidentalis*)**. Son pequeños insectos chupadores que pueden penetrar fácilmente al botón floral cuando se ha formado y realizar allí su puesta. Los nuevos individuos se alimentan de los pétalos que se están desarrollando y cuando la flor madura aparecen decoloraciones sobre los bordes de los pétalos. En algunas ocasiones atacan a los nuevos brotes, retrasando el desarrollo.
- **Minadores (*Pseudonapomyza dianthicola*)**. Se trata de un díptero frecuente en la zona mediterránea. Sus larvas forman galerías en las hojas. Produce un debilitamiento y una depreciación comercial de los claveles.
- **Araña roja (*Tetranychus urticae*)**: Se presenta cuando la humedad ambiental disminuye. Los síntomas que se manifiestan son pequeñas punteaduras amarillentas con posterior abarquillamiento y caída de la hoja. Además, se observan pequeñas telarañas en el envés del limbo foliar.
- **Mosca blanca (*Bemisia tabaco*)**: Se presenta principalmente cuando las temperaturas alcanzan los 25°C. Los síntomas son manchas amarillas y marchitamiento de las hojas. Para evitar/prevenir el ataque severo de mosca blanca, se deben colocar trampas cromotrópicas de color amarillo.

Además de las plagas ya descritas, los claveles pueden sufrir otras enfermedades ocasionadas por diferentes agentes, como pueden ser virus, bacterias y hongos.

Enfermedades causadas por virus o viroides:

- **Virus del jaspeado del clavel o *Carnation Mottle Carmovirus* (CarMV)**. Produce un leve moteado foliar.
- **Virus de las manchas anilladas del clavel o *Carnation Ringspot Dianthovirus* (CRSV)**. Ocasiona manchas amarillas cubiertas por anillas que se tornan grises, y producen ondulación en la hoja.
- **Virus del mosaico de las nerviaciones del clavel o *Carnation Vein Mottle Potyvirus* (CVMV)**. Provoca sobre los cultivares americanos un jaspeado foliar difuso localizado cerca de las nerviaciones.
- **Virus del jaspeado del clavel o *Carnation Etched Ring Virus* (CERV)**. Se

manifiesta por pequeñas manchas necróticas en líneas o anillos sobre el limbo. En ocasiones, las necrosis se ensanchan en placas bordeadas de color pardo o púrpura, situadas en la punta de las hojas deformando el limbo.

- **El debilitamiento o *stunt* del clavel (CarSAVd).** Produce alteraciones importantes en el crecimiento, y proliferación anárquica de las yemas axilares. Las plantas toman un aspecto vegetativo achaparrado, siendo frecuente la ausencia total de floración.
- **Virus latente del clavel o *Carnation latent virus* (CLV).** Produce manchas pequeñas de lesiones cloróticas locales que posteriormente degeneran en manchas sistémicas.
- **Enfermedad de las estrías o *Carnation Streak* (CNFV).** Provoca veteado y aclarado de venas, y al cabo de tres a cinco semanas líneas grises o manchas necróticas rojas.

#### Enfermedades causadas por bacterias:

- **Mancha foliar (*Pseudomonas andropogonis*).** Se manifiesta con lesiones foliares circulares e irregulares, centros marrones y bordes pardo rojizo, con o sin halo clorótico.
- **Marchitamiento bacteriano (*Burkholderia caryophylli*).** Produce una coloración verdosa en los brotes, hinchazón del tallo bajo los nudos y estallido de la corteza.
- **Retardo en el crecimiento y marchitez bacteriana (*Erwinia chrysanthemi*).** Causa marchitez. Las hojas apicales crecen erectas con bordes enrollados, las inferiores se vuelven rojizas y luego amarillean, se acortan los entrenudos y el tallo se hincha.
- **Escoba de brujas o *Fasciation* (*Rhodococcus fascians*).** Da lugar a un cepillo de hijuelos cortos y gruesos unidos entre sí en la base del tallo y/o en las axilas de las hojas.
- **Agallas de cuello (*Agrobacterium tumefaciens*).** Forma voluminosas agallas, sobre todo en el cuello del tallo (intersección entre tallo y raíz), aunque también en las raíces y tallo.

#### Enfermedades causadas por hongos:

- **Roya (*Uromyces caryophyllinus*).** Desarrolla pequeñas pústulas redondas y alargadas, con esporas pardas en las hojas y ocasionalmente en los tallos, amarilleando los tejidos circundantes.

- **Marchitamiento (*Phialophora cinerescens*)**. Produce marchitamiento debido a la invasión de los vasos vasculares, impidiendo el transporte de agua a las hojas.
- **Tizón (*Alternaria saponariae*)**. Causa pequeñas manchas de color rojo y borde amarillo en hojas, tallos y flores.
- **Mancha foliar anillada (*Mycosphaerella dianthi*)**. Se manifiesta como manchas foliares blanquecinas o de color pajizo, de dos a seis mm de diámetro, con un halo oscuro negro-violáceo difuminado hacia el exterior que le da el aspecto de ocelos. Cuando las manchas son numerosas, la hoja se seca. Afecta a todas las partes verdes del clavel.
- **Pudrición de cuello (*Rhizoctonia solani*)**. Provoca pudrición de la base del cuello y la raíz formando una constricción de color marrón en el cuello sin atacar a los haces vasculares.
- **Podredumbre gris (*Botrytis cinérea*)**. Provoca manchas foliares y chancros en tallo, rizoma y flores.
- **Fusariosis (*Fusarium oxysporum*)**. Se trata de la enfermedad más grave que afecta a clavel. La fusariosis vascular se caracteriza por los síntomas externos que presenta la planta, que son: decaimiento, clorosis y marchitez hasta la muerte de la planta.

### 3.- Fusariosis Vascular del Clavel

La Fusariosis Vascular del Clavel (FVC), o marchitez vascular, es producida por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp *dianthi* (Prill. & Del.) Snyder & Hans. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Prilleux y Delacroix en 1899. Desde su identificación ha sido considerada una de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo del clavel (Garibaldi, 1978a y 1978b), pero las numerosas pérdidas que ocasiona desde hace más de 30 años la han situado como la enfermedad más limitante y severa en todo el mundo (Baayen, 1988; Garibaldi y Gullino, 1987).

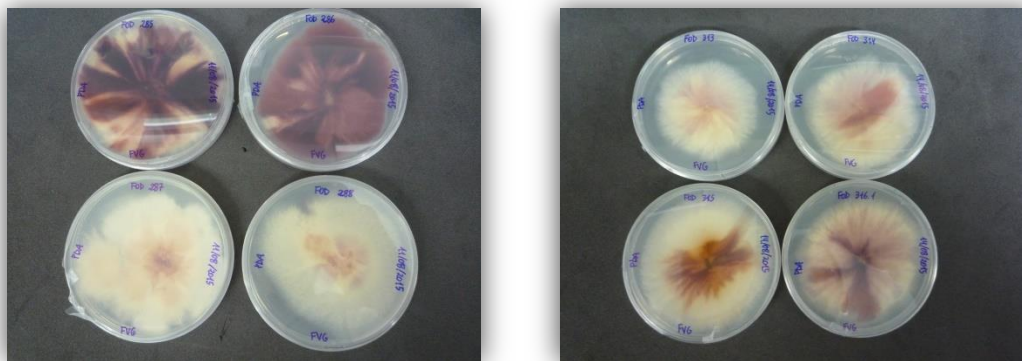
En 1970 se observó por primera vez en España síntomas de fusariosis vascular en cultivos del sureste peninsular (Tello y Lacasa, 1990), propagándose rápidamente hasta los cultivos de Galicia (Andrés Arés, 1995). La intensidad de la enfermedad era limitada debido a la previa desinfección del suelo utilizando bromuro de metilo de manera generalizada. Sin embargo, estas medidas no fueron suficientes para frenar la enfermedad, de manera que tras cinco años desde la introducción de las primeras plantaciones, en las principales áreas de

producción de clavel en la costa noroeste de Cádiz, la enfermedad comenzó a ser un problema (García-Ruíz *et al.*, 2009).

Muestreos posteriores, realizados entre los años 2008 y 2014, evidenciaron igualmente una elevada presencia del patógeno en los suelos de cultivo (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.

### 3.1.- *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, agente causante de la FVC

*F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) es el hongo de suelo causante de la fusariosis vascular del clavel. Se trata de un hongo necrotrofo que produce conidias con un rápido crecimiento, y estructuras de resistencia capaces de sobrevivir en el suelo durante años en ausencia de la planta huésped. El micelio es, generalmente, aéreo, abundante y algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado, pero, comúnmente, con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar (Booth, 1970) (Figura 3).



**Figura 3.-Diversidad morfológica de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.** La imagen muestra la diversidad en el crecimiento, morfología y coloración del micelio de diferentes cepas de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Los tres tipos de conidias que puede producir son:

- Microconidias. Son esporas unicelulares, sin septas, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas. Las microconidias tienen 5 – 12 micras de largo por 2,5 - 3,5 micras de ancho (Nelson, 1981) (Figura 4-A).
- Macroconidias: son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5

septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada. Tiene un tamaño de 27 a 46 micras de largo por 3,0 a 4,5 micras de ancho (Nelson, 1981) (Figura 4-B)

- Clamidosporas. Son esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las macroconidias de paredes gruesas, mediante las cuales el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en ausencia de plantas hospedantes. Estas esporas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares y tienen un tamaño de 5 a 15 micras de diámetro (Nelson, 1981) (Figura 4-C).



**Figura 4.** Imágenes de las diferentes conidias producidas por *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. (A) Microconidias; (B) Macroconidias; (C) Clamidospora. (Fourie et al., 2011).

La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en latencia estimuladas por los exudados secretados por las raíces de las plantas de clavel recién sembradas. Las hifas del hongo penetran directamente a la epidermis de las raíces, pasan a la corteza y a la endodermis y entran a los vasos del xilema (Baker, 1978; Baayen, 1988). Las hifas pueden penetrar también a través de heridas hechas de forma mecánica hecha durante el manejo de los esquejes, o por nemátodos, insectos o miriápodos (García-Ruíz *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). La colonización inicial se encuentra restringida al tejido vascular, y cuando la planta se encuentra muy afectada la infección se trasvasa a los tejidos adyacentes, como son la médula, el cambium, el floema y la corteza (Pennypacker y Nelson, 1972; Harling *et al.*, 1988). El patógeno va colonizando la planta de manera tanto apical como radial, ya sea por el crecimiento de micelio o por el transporte pasivo de microconidias en la corriente xilemática (Baayen, 1988). Cuando las plantas se encuentran a punto

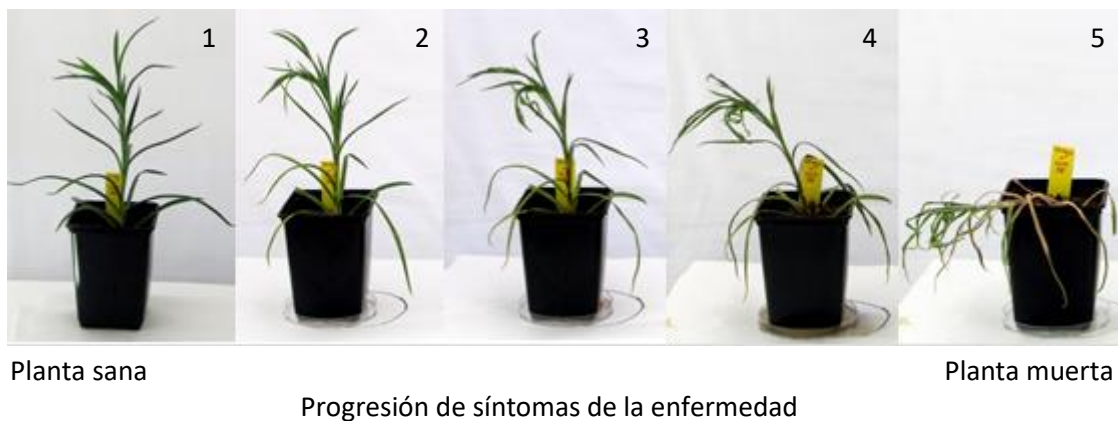
de morir, el hongo pasa de los tejidos vasculares a la superficie, produciendo en ésta esporodocios de color naranja (Demmink *et al.*, 1989).

### 3.2.- Sintomatología e identificación de la enfermedad

Aparentemente, *F. oxysporum* no causa síntomas en los primeros días de la infección. En este tiempo, el hongo se encuentra colonizando los haces vasculares a partir de su entrada por la raíz. El continuo crecimiento de las hifas a través del tejido vascular provoca que la planta de clavel ocluya los vasos xilémicos colindantes a aquellos que se encuentran invadidos, para así poder frenar la invasión. En estos momentos la planta comienza a mostrar síntomas de amarilleamiento en las hojas basales. En un corte trasversal del tallo se puede observar el colapso del tejido vascular que adquiere tonalidades marrones.

El progreso de la colonización deriva en la falta de agua y nutrientes que da lugar al síntoma más característico de la enfermedad, la marchitez de la planta. El avance unilateral de las hifas por los haces vasculares provoca, además de los síntomas de marchitamiento, el amarilleamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma.

En los estados finales de la enfermedad, las raíces de la planta se pudren y el tallo muestra agrietamientos por la parte exterior tomando aspecto de leña seca. Por último la planta se seca por completo y muere (Figura 5).



**Figura 5.- Sintomatología de la Fusariosis vascular del clavel.** Progresión de síntomas de la Fusariosis vascular en clavel; los números 1-5 indican el progreso en la severidad de síntomas, desde planta sana a planta muerta. Esquema tomado de 'Tesis doctoral de Carlos Germán Lemus- Minor (2018).

### 3.3.-Diversidad genética y patogénica en *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), al igual que otras formas especiales

de *F. oxysporum*, presenta una amplia diversidad genética y patogénica. Un total de 11 razas fisiológicas han sido descritas en base a diferencias en la reacción de cultivares de clavel diferenciadores. En 1977, Garibaldi describió la existencia de las razas 1 y 2 en Italia y en Francia. Posteriormente, 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). Por último, 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).

El origen de las razas 1 (R1), 2 (R2) y 8 (R8) reside probablemente en Europa, desde donde se extendió al resto de los países productores por medio del material de propagación. En la actualidad, la R2 se encuentra distribuida por todo el mundo (Aloi y Baayen, 1993; Baayen *et al.*, 1997), mientras que las razas 1 y 8, procedentes de la Riviera Italiana, 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), aunque actualmente se conservan pocos representantes de éstas. Por último, las razas 9, y 10 y 11 parecen muy restringidas a las zonas geográficas donde se identificaron (Wright *et al.*, 1996; Baayen *et al.*, 1997).

En España, la raza más ampliamente distribuida es la R2 (Andrés Arés *et al.*, 2001; Tello y Lacasa, 1990), aunque también han sido identificados en determinadas zonas y momentos, aislados pertenecientes a 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).

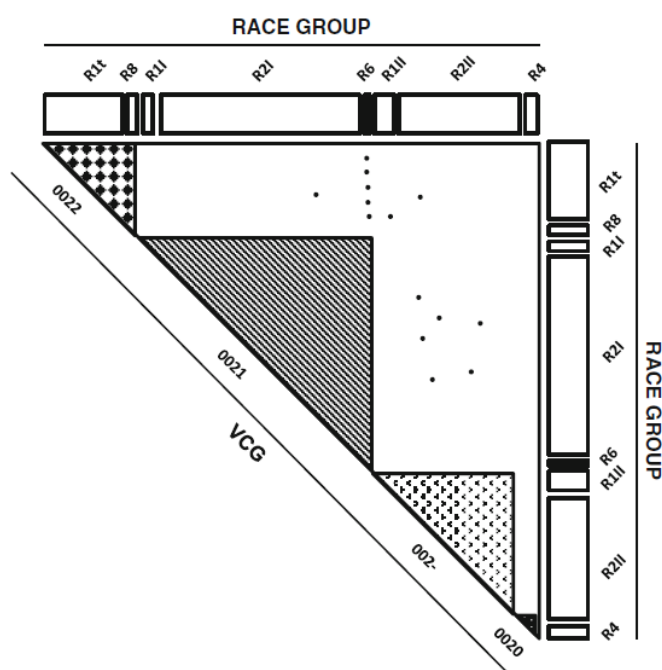
La amplia diversidad patogénica descrita en *Fod* se corresponde con una amplia diversidad genética que también ha sido objeto de estudio. El estudio de esta diversidad genética culminó en los años 90 con el desarrollo de protocolos basados en PCR-específica que permitían identificar a aislados de R1 o R8, de una parte, y a aislados de R2, R5 o R6, de otra (Chiochetti *et al.*, 1999). El estudio de aislados de R1 y R2 obtenidos de las diferentes zonas productoras del sur de España aplicando estos protocolos, demostró por primera vez la existencia de



diversidad molecular dentro de las razas 1 y 2, y llevó al diseño de nuevos cebadores para PCRs específicas que permitían la identificación de los definidos como grupos moleculares I y II dentro de cada una de esas razas (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2012). Además, la realización de ensayos de patogenicidad comparativa entre representantes de los grupos moleculares previamente 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 de 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). Hasta el momento, todos los trabajos realizados con *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* habían asignado 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). Sin embargo, los resultados obtenidos por Gómez-Lama Cabanás y Pérez-Artés (2014) han aportado

novedosos datos, demostrando que aislados de R1 y R2 pueden compartir VCG siempre que pertenezcan al mismo grupo molecular (Figura 6).



**Figura 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; R1: 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-y

### 3.4.- Control de la fusariosis vascular de clavel

La amplia variabilidad racial del *Fod*, junto con las excelentes condiciones climáticas y agronómicas, hacen difícil el control de esta enfermedad. Para ello, de manera tradicional, se han tratado los suelos con fumigantes como bromuro de metilo (BM) antes de la plantación, pero el efecto perjudicial de estos químicos sobre la capa de ozono hizo que la UE dispusiera en el Protocolo de Montreal el fin de su uso como agente de control fúngico. La aplicación de esta disposición estimuló a la comunidad científica a investigar otras vías de control de las poblaciones del patógeno en el suelo, como la adición de enmiendas orgánicas fundamentalmente. 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).

Como ocurre con otras enfermedades vasculares, el control de la fusariosis vascular del clavel (FVC) hoy en día, requiere del uso integrado de una serie de medidas, como son la utilización de suelos libres del patógeno o con bajas densidades de él y la plantación de variedades de clavel resistentes o tolerantes a las razas de *Fod* presentes en la zona. Aunque existen variedades comercializadas como resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, dicha resistencia no es completa, ya que depende de otros factores como son las condiciones ambientales y la raza o razas del patógeno presentes en el suelo de cultivo. 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).

Actualmente, para el desarrollo de medidas de control eficientes, además de la búsqueda de resistencia en la planta huésped, es de gran utilidad conocer los mecanismos moleculares que controlan la virulencia en el patógeno. Los determinantes de virulencia en las especies fúngicas pueden estar asociados tanto a elementos cromosómicos como extracromosómicos, pudiéndose encontrar entre estos últimos ARNs con características de genomas víricos, los denominados micovirus (Ghabrial, 1998).

#### 4.- Micovirus

Los virus que infectan hongos se denominan micovirus. Estos virus son organismos cosmopolitas presentes en la mayoría de los grupos fúngicos, incluidos los hongos fitopatógenos (Ghabrial y Suzuki, 2009). Generalmente, sus genomas están constituidos por ARN de doble cadena (dsRNA) o cadena sencilla (ssRNA), aunque se han identificado algunos micovirus con genomas de ADN circular de cadena sencilla (ssDNA) (Ghabrial *et al.*, 2015). Su replicación es paralela a la del hongo, y para ello hacen uso de una polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que suele estar codificada en su genoma. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la amplia diversidad de genomas que podemos encontrar entre estos virus (Ghabrial *et al.*, 2015), que aunque en muchos casos parecen ser de naturaleza críptica, se ha demostrado que pueden tener importantes efectos fenotípicos sobre su aislado hospedador.

Los primeros indicios acerca de la existencia de micovirus en los hongos microscópicos surgieron en investigaciones sobre el comportamiento de extractos obtenidos de cultivos en medios líquidos de *Penicillium funiculosum* y *P. stoloniferum* (Shope, 1953, 1966). Previamente, en levaduras se había descrito la presencia de partículas virales por Lindergreen (1962). Border (1972) también presentó pruebas sobre la presencia de estas partículas virales en *Saccharomyces cerevisiae*, y más tarde Buck (1973) logró purificarlas en gradientes de densidad de sacarosa, demostrando a la vez que sus ácidos nucleicos consistían en dsRNA. En ese mismo año, Nesterova (1973) observó las partículas virales al microscopio electrónico en cepas termosensibles de *Candida tropicalis*.

El primer micovirus descrito en macromicetos fue 'Agaricus bisporus virus 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'. Más tarde, 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. Este fue el inicio de la micovirología moderna.

#### 4.1.- Características generales de los micovirus

Aunque los micovirus tienen características virales fundamentales, como la necesidad de infectar células vivas de otros organismos para poder replicarse, también presentan peculiaridades que los distinguen o hacen diferentes de los virus de plantas y animales (Son *et al.*, 2015). Algunas de estas características específicas son:

- Los micovirus se encuentran confinados en las células de su aislado hospedador. Salvo en casos excepcionales, no se han identificado rutas extracelulares de infección en los micovirus.
- Las vías de transmisión son mediante anastomosis hifal (transmisión horizontal) o durante el proceso de división celular y esporulación (transmisión vertical).
- 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 su existencia es ancestral. Además, 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. Este hecho es apoyado por los numerosos datos que demuestran que la mayoría de infecciones son inocuas y persistentes. El estado latente del micovirus permitiría al aislado hospedador sobrevivir, mientras que la permanecía en las células del huésped beneficiaría al micovirus al carecer este de un modo de transmisión extracelular.

#### 4.2.- Efecto de los micovirus sobre las características fenotípicas del huésped.

De manera general, una de las principales características de los micovirus es su naturaleza críptica, es decir, sus infecciones normalmente son asintomáticas. Sin embargo, en algunas ocasiones se ha observado que las infecciones por estos virus pueden tener efectos sobre el fenotipo del huésped, como puede ser cambios en la morfología de la colonia, reducciones en la tasa de crecimiento, infertilidad femenina, reducción en la esporulación asexual, y pigmentación reducida (Anagnostakis, 1982; MacDonald y Fulbright, 1991; Nuss, 1996; Castro *et al.*, 2003; Moleleki *et al.*, 2003; Suzaki *et al.*, 2005). Entre los diferentes efectos que han sido observados en los aislados infectados, el más estudiado y de mayor relevancia ha sido la capacidad que poseen algunos micovirus de reducir la virulencia de su hongo hospedador, es decir, la inducción de hipovirulencia

(Pearson *et al.*, 2009).

Este fenómeno se describió por primera vez en poblaciones de *Cryphonectria parasítica*, el agente causal del chancro del castaño, por lo que lo ha convertido a su vez en el caso más estudiado (Dawe y Nuss, 2001). 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. parasítica* en Europa se observó una reducción en virulencia que se había extendido de forma natural en las poblaciones. Diversos estudios posteriores demostraron que la hipovirulencia estaba asociada a elementos citoplasmáticos transmisibles por anastomosis hifal que se identificaron como micovirus (Day *et al.*, 1977; Choi y Nuss, 1992). La caracterización molecular de estos micovirus dio lugar a la descripción de una nueva familia, que se denominó *Hypoviridae* (Milgroom y Cortesi, 2004).

El fenómeno de la hipovirulencia no solo se encuentra asociado a algunos miembros de la familia *Hypoviridae*. También se han descrito micovirus con capacidad para inducir hipovirulencia pertenecientes a la mayoría de las familias virales (Tabla 1). Además, en algunos casos, el fenómeno de la hipovirulencia no se debe sólo a la presencia de un micovirus, sino que la cepa descrita como hipovirulenta se encuentra infectada por más de un micovirus. Este es el caso de cepas hipovirulentas del patógeno de avena *Helminthosporium victoriae*, infectadas por dos micovirus de familias distintas, un totivirus y un chrysovirus (Ghabrial *et al.*, 2002).

Actualmente, se han identificado una amplia variedad de cepas hipovirulentas infectadas por micovirus, pertenecientes a casi todas las familias fúngicas existentes, como por ejemplo *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, y *Botrytis cinerea* (Azhar *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Kamaruzzaman *et al.*, 2019). La constante identificación de nuevas cepas hipovirulentas resulta ser un aliciente para proseguir con la búsqueda e identificación de nuevos micovirus.

#### 4.2.-Clasificación de los micovirus

Al igual que ocurre con los virus de animales y plantas, los micovirus presentan una amplia diversidad en sus genomas. Entre ellos podemos encontrar virus con genomas de dsRNA y ssRNA, como ya se ha indicado anteriormente. Estos últimos a su vez pueden ser tanto de polaridad positiva

como negativa. También se han identificado micovirus de ADN circular de cadena sencilla (ssDNA). Los micovirus, al igual que el resto de virus, pueden encontrarse envueltos, o no, por una membrana lipídica procedente de la célula hospedadora. Esta envuelta ayuda al virion a sobrevivir e infectar otras células. Por otra parte, su genoma puede estar encapsidado por péptidos codificados por ellos mismos.

Los micovirus que poseen genomas de dsRNA se clasifican en 8 familias: *Alternaviridae*, *Botybirnaviridae*, *Chrysoviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadriviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae*, y *Totiviridae*. Los micovirus con genomas de ssRNA de polaridad positiva pueden pertenecer a 8 familias distintas: *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Deltaflexiviridae*, *Endornaviridae*, *Fusariviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae*, y *Narnaviridae*. Finalmente, entre los micovirus que poseen genomas de ssRNA de polaridad negativa, sólo encontramos una familia, *Mymonaviridae*, mientras que los micovirus de ssDNA están aún sin clasificar (Ghabrial *et al.*, 2015; Son *et al.*, 2015).

#### 4.2.1.- Clasificación de micovirus con genomas de dsRNA

Los micovirus con genomas de dsRNA constituyen el grupo más numeroso de los descritos hasta ahora y, como ya hemos dicho, sus miembros pueden pertenecer a 8 familias distintas.

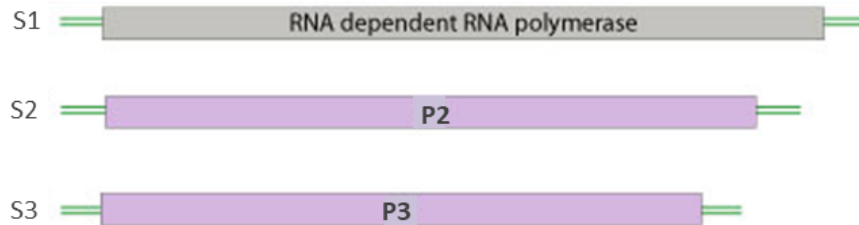
##### **Familia *Alternaviridae***

La familia *Alternaviridae* ha sido recientemente propuesta a partir de la identificación de micovirus tales como 'Fusarium graminearum alternavirus 1' (Hao *et al.*, 2018), 'Alternaria alternata virus 1' (Aoki *et al.*, 2009), y 'Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus' (Kozlakidis *et al.*, 2013). Los diversos análisis filogenéticos situaban a estos micovirus en un clado claramente diferenciado de otras familias de micovirus de dsRNA descritas, como la familia *Totiviridae* y la familia *Chrysoviridae*.

Los miembros de esta familia poseen un genoma multisegmentado formado por 3 o 4 elementos de dsRNA. Los tamaños de estos segmentos oscilan entre 3.5 y 2 kb, siendo algo más pequeños que los segmentos de miembros de la familia *Chrysoviridae*. Normalmente el segmento de mayor peso molecular codifica una RdRp, mientras que del resto de los segmentos no se tiene información aún. Todos los segmentos poseen una cola poli(A) en su extremo 3'

y secuencias no codificantes (UTR) altamente conservadas en el extremo 5'.

### *Alternaviridae*



Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las RdRp de estos micovirus con las de miembros de otras familias, muestra la presencia de los 8 motivos conservados característicos de estas proteínas. Todos los miembros de la familia *Alternaviridae* presentan una diferencia en común con otras familias víricas, y es la presencia del tripéptido ADD que codifica una alanina en el dominio VI, en vez de poseer el tripéptido GDD universalmente conservado (Gilbert *et al* 2019).

### Género *Botybirnavirus*

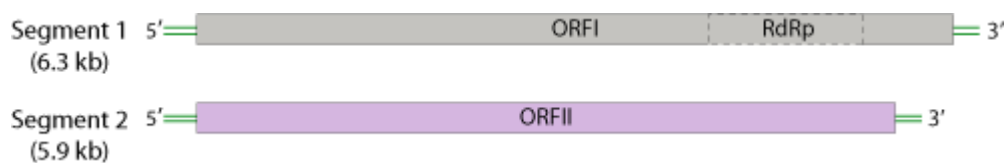
El género *Botybirnavirus*, aunque aún no ha sido asignado a ninguna familia vírica, ha sido recientemente aprobado. Dicho género fue propuesto tras la identificación del micovirus 'Botrytis porri botybirnavirus 1' (Wu *et al.*, 2012). Actualmente cuenta con al menos 6 nuevas especies que se encuentran infectando aislados pertenecientes a familias fúngicas tales como *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019), *Botryosphaeria dothidea* (Zhai *et al.*, 2019), *Bipolaris maydis* (Wang *et al.*, 2018), *Botrytis cinerea* (Cottet *et al.*, 2019) y *Alternaria alternata* (Shsamsi *et al.*, 2019).

Los genomas de estos micovirus son bipartitos, con segmentos de dsRNA cuyos pesos moleculares oscilan entre 6.5 y 5.9 kb. En cada segmento se puede identificar un ORF, y en cada uno de ellos se encuentran codificadas dos proteínas estructurales, encontrándose en el ORF1 el dominio codificante de la RdRp (Wu y Li, propuesta ICTV, 2014). Los viriones se encuentran

encapsidados por una cubierta formada por tres tipos de proteínas.

El micovirus ‘*Bipolaris maydis botybirnavirus 1*’, identificado inicialmente en la cepa BdEW220 de *Bipolaris maydis*, así como el micovirus ‘*Botrytis porri botybirnavirus 1*’, identificado en un aislado de *Botrytis porri*, fueron detectados infectando a nuevos aislados hipovirulentos de *Botryosphaeria dothidea* (Zhai *et al.* 2019) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Wang *et al.*, 2019), respectivamente. La aparente capacidad de estos micovirus para transferirse entre especies fúngicas diferentes, además de su capacidad para inducirles hipovirulencia, ha convertido a estos virus en interesantes objetos de estudio.

### *Botybirnavirus*

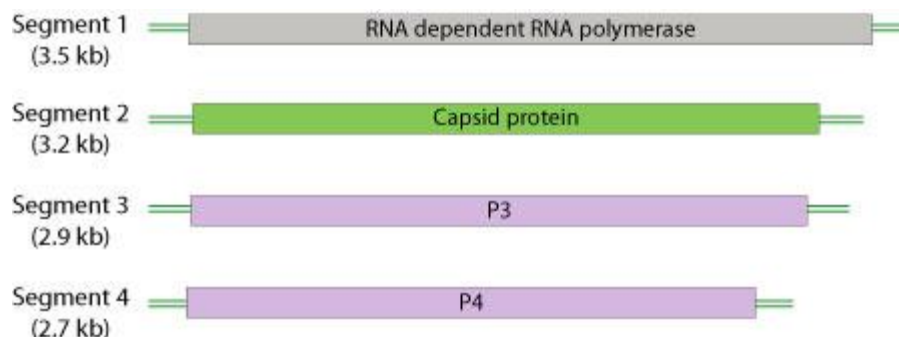


Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

### Familia *Chrysoviridae*

El genoma de los miembros de esta familia es multisegmentado, formado por un grupo de entre 3 y 5 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, 4 y 5 (dsRNAs 3,4 y 5) codifican proteínas de función desconocida.

### *Chrysoviridae*



Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)



Estos micovirus se caracterizan por poseer un extremo 5'UTR que generalmente oscila entre los 140 y los 400 nt de longitud y que contiene dos regiones altamente conservadas, 'Box 1' y 'Box 2' (Ghabrial *et al.*, 2018). Sin embargo, nuevos virus identificados entre los que se encuentra 'Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1' (Kim *et al.*, 2010) poseen extremos 5'UTR bastante más cortos, que oscilan entre los 80 y los 110 nt.

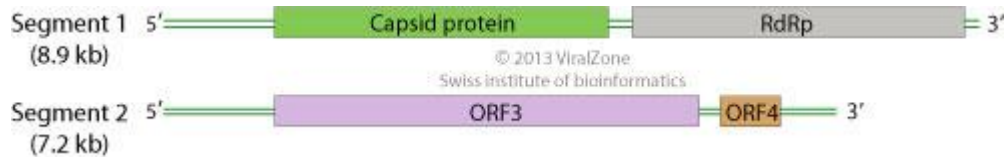
El género *Chrysovirus* es el único género de esta familia, y su especie tipo es 'Penicillium chrysogenum virus' (Ghabrial *et al.*, 2018). Filogenéticamente, los chrysovirus se agrupan en dos clados, donde el clado 1 agrupa a los miembros que poseen genomas de entre 3 y 4 segmentos, y el clado 2 contiene los virus formados por 4 o 5 segmentos (Ghabrial *et al.*, 2018). Los micovirus pertenecientes al clado 2, denominados "chryso-like" virus, no han sido aún asignados a otra categoría taxonómica por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Lemus-Minor *et al.*, 2015; 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; Lemus-Minor *et al.*, 2018; Urayama *et al.*, 2012, 2014).

### **Familia Megabirnaviridae**

Los micovirus que conforman esta familia presentan un genoma compuesto de dos segmentos encapsidados por separado. Hasta el momento, el único género en esta familia es el género *Megabirnavirus*, que incluye al micovirus 'Rosellinia necatrix megabirnavirus 1', identificado en el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* (Chiba *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2019), al cual le confiere hipovirulencia.

Los segmentos de este micovirus tienen una longitud de 8.9 y 7.2 kb, respectivamente. El segmento mayor (dsRNA1) contiene dos ORFs que se solapan parcialmente en el mismo sentido. El ORF1 codifica una CP y el ORF2 una RdRp. El segundo segmento (dsRNA2) también contiene dos ORFs, pero en este caso no se solapan. El ORF3 aparentemente codifica un producto que es procesado en pequeñas proteínas por el micelio infectado, y el ORF4 codifica una proteína de función desconocida (Kanematsu *et al.*, 2014). Ambos segmentos se caracterizan por tener regiones 5' no traducidas de más de 1.6 kb.

## *Megabirnaviridae*

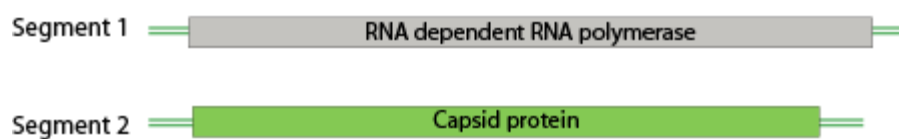


Fuente: *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>)

## Familia *Partitiviridae*

La familia *Partitiviridae* es una familia formada por virus pequeños, isométricos, sin envoltura, con genomas de dsARN bisegmentados de 3-4.8 kb. Los dos segmentos del genoma están encapsidados individualmente y cada uno 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. Los extremos 5' UTR de cada uno de los segmentos del genoma poseen secuencias altamente conservadas (Vainio *et al.*, 2018).

### *Partitiviridae*



Fuente: *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>)

Esta familia se compone de 5 géneros, con un rango muy variado de especies hospedadoras (plantas, hongos, y protozoarios). Los géneros *Alpha-*, *Beta-*, y *Gammapartitivirus* son los únicos de esta familia que se han encontrado infectando hongos (Nibert *et al.*, 2014).

Los virus del género *Alphapartitivirus* se han identificado en hongos y plantas, y su especie tipo es 'White clover cryptic virus 1' (Boccardo *et al.*, 1985). Algunos miembros de este género, como es el caso de 'Cherry chlorotic rusty spot associated partitivirus' (Covelli *et al.*, 2008), pueden presentar secuencias de dsRNA satélite. Los virus del género *Betapartitivirus* también se han encontrado infectando hongos y plantas, y su especie tipo es 'Atkinosella hypoxylon virus' (Oh y Hillman, 1995). Por último, el género *Gammapartitivirus* parece exclusivo de hongos, y su especie tipo es 'Penicillium stoloniferum virus S' (Kim *et al.*, 2003).

Dos nuevos géneros han sido propuestos para formar parte de esta familia, el género *Epsilonpartitivirus* y el género *Zetapartitivirus*. Diversos análisis filogenéticos realizados con los micovirus recientemente identificados 'Colletotrichum eremochloae partitivirus 1' (no publicado), 'Penicillium aurantiogriseum partiti-like virus' (Nerva *et al.*, 2017), 'Penicillium brasilianum partitivirus 1' (Horn *et al.*, 2015), y 'Delitschia confertaspora partitivirus 1' (no publicado), los agruparon en dos nuevos clados separados del resto de los miembros de los demás géneros de esta familia, aunque relativamente cercanos a los gammapartitivirus. Los miembros del género *Epsilonpartitivirus* han sido identificados tanto en hongos como en invertebrados. Por otro lado, los micovirus descritos del género *Zetapartitivirus* presentan características específicas de este género como son la presencia de 10 nt altamente conservados en el extremo 3' UTR y un rango de longitud de la RdRp y la CP único entre los miembros de este género (Vainio *et al.*, 2018).

Anteriormente, se pensaba que los miembros de la familia *Partitiviridae* estaban asociados a infecciones latentes, ya que no tenían ningún efecto sobre su aislado hospedador (Ghabrial *et al.*, 2012). Sin embargo, esta consideración cambió al identificarse el micovirus 'Sclerotinia sclerotiorum partitivirus 1' (Xiao *et al.* 2014) y el alphapartitivirus 'Rhizoctonia solani partitivirus 2' (Zheng *et al.*, 2014), los cuales son capaces de inducir hipovirulencia en sus huéspedes.

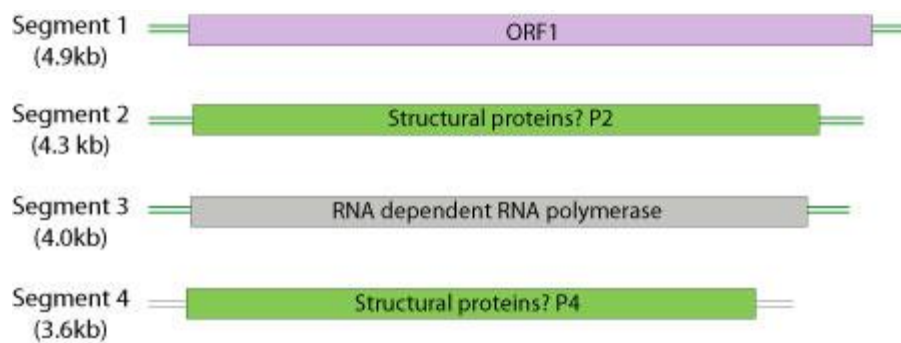
### **Familia *Quadriviridae***

La familia *Quadriviridae* es una familia monogénica de virus esféricos no envueltos, con genomas de dsRNA cuadripartitos cuyos segmentos poseen un tamaño de entre 3.5-5 kb y que se encuentran encapsidados por separado (Chiba *et al.*, 2018). Dentro de esta familia sólo se han descrito hasta el momento

dos especies, 'Rosellinia necatrix quadrivirus 1' (Lin *et al.*, 2012, 2013), y 'Leptosphaeria biglobosa quadrivirus-1' (Shah *et al.*, 2018). Actualmente, no se ha informado acerca de la patogenicidad de estos virus.

Los quadrivirus tienen características estructurales muy específicas en comparación con las de otros virus de dsRNA conocidos. Cada segmento de su genoma contiene un único ORF. El ORF1, codifica una proteína de función desconocida, mientras que los ORFs 2 y 4, codifican CPs, que pueden ser procesadas durante el ensamblaje del virion. Por último, el ORF3, codifica una RdRp.

### *Quadriviridae*

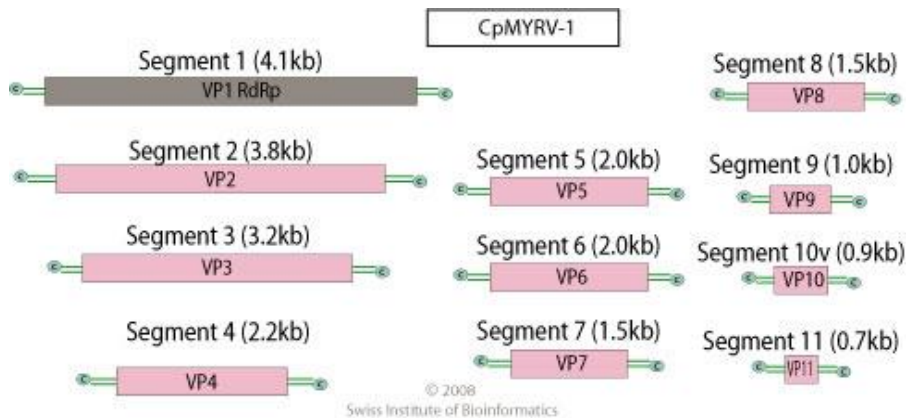


Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

### *Familia Reoviridae*

En la familia *Reoviridae* se encuentran agrupados numerosos virus que infectan tanto plantas, como hongos o insectos. Estos virus se clasifican en 15 géneros dentro de 2 subfamilias. Los micovirus asignados a esta familia se encuentran agrupados en el género *Mycoreovirus*. Entre ellos podemos encontrar a 'Cryphonectria parasitica mycoreovirus-1' y 'Rosellinia necatrix W370 virus' (Hillman y Suzuki, 2004; Wei *et al.*, 2004).

Los micoreovirus se encuentran encapsidados en una estructura doble, donde se agrupan los múltiples segmentos (11-12) de dsRNA que forman parte de su genoma. Estos segmentos tienen unos tamaños comprendidos entre 0.7 y 4.11 kb, y cada uno de ellos codifica una proteína. Todos los micoreovirus descritos hasta el momento inducen hipovirulencia en sus hospedadores fúngicos.

*Mycoreovirus*

Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

**Familia *Totiviridae***

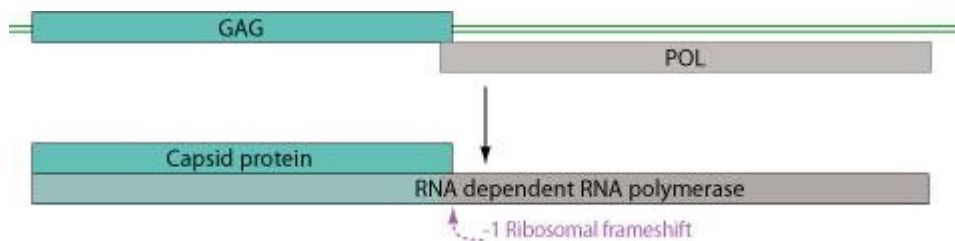
Los miembros de la familia *Totiviridae* son micovirus icosaedricos no envueltos, que poseen un genoma monosegmentado cuyo tamaño oscila entre 4.6 y 7.0 kb. Usualmente, este único segmento de dsRNA se encuentra encapsidado y contiene dos ORFs que se solapan parcialmente en el mismo sentido de la cadena de RNA. El primer ORF codifica un solo tipo de proteína para la cápside, mientras que el segundo ORF codifica una RdRp. Algunos miembros de esta familia pueden poseer un tercer ORF de pequeño tamaño en el extremo 5', así como RNA satélites que codifican proteínas 'killer' que son encapsidadas de manera separada (Gilbert *et al.*, 2019).

Aunque esta familia se encuentra formada por 5 géneros, tan solo en los géneros *Totivirus* y *Victorivirus* podemos encontrar micovirus. 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). A diferencia de los miembros del género *Totivirus*, los micovirus del género *Victorivirus* no parecen presentar solapamiento entre la proteína de la cápside y la RdRp (Preisig *et al.*, 1998). Otra diferencia entre ambos géneros es la abundancia de residuos de alanina, glicina y prolina en el

extremo carboxilo de la secuencia proteica de la cápside de los victorivirus (Gilbert *et al.*, 2019).

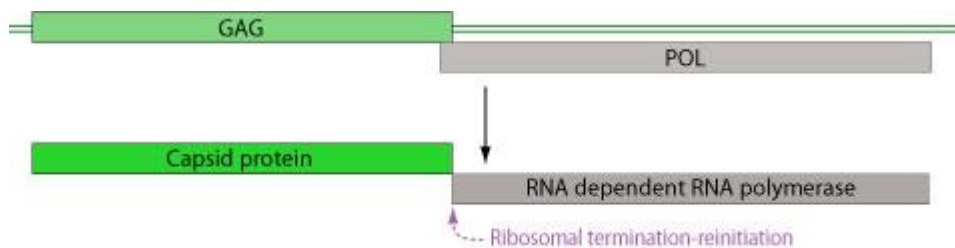
Actualmente, en ambos géneros podemos encontrar micovirus capaces de inducir hipovirulencia en su aislado hospedador, como es el caso de 'Botrytis cinerea virus 1 (Yu *et al.*, 2015) del género *Totivirus*, y la especie tipo del género 'Victorivirus, *Helminthosporium victoriae* virus 190S' (Xie *et al.*, 2016)

### *Totivirus*



Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

### *Victorivirus*



Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

## 4.2.2.- Clasificación de micovirus con genomas de ssRNA

El porcentaje de micovirus de ssRNA identificados parece ser inferior al de virus de dsRNA. En ocasiones, debido a que los métodos usados para el aislamiento de estos organismos están basados en el enriquecimiento de ARN de doble cadena, se cometen errores al clasificar a los micovirus identificados. Entre los micovirus de ssRNA podemos encontrar dos subtipos, genomas de polaridad positiva y genomas de polaridad negativa.

#### 4.2.2.1.- Clasificación de micovirus con genomas de ssRNA (+)

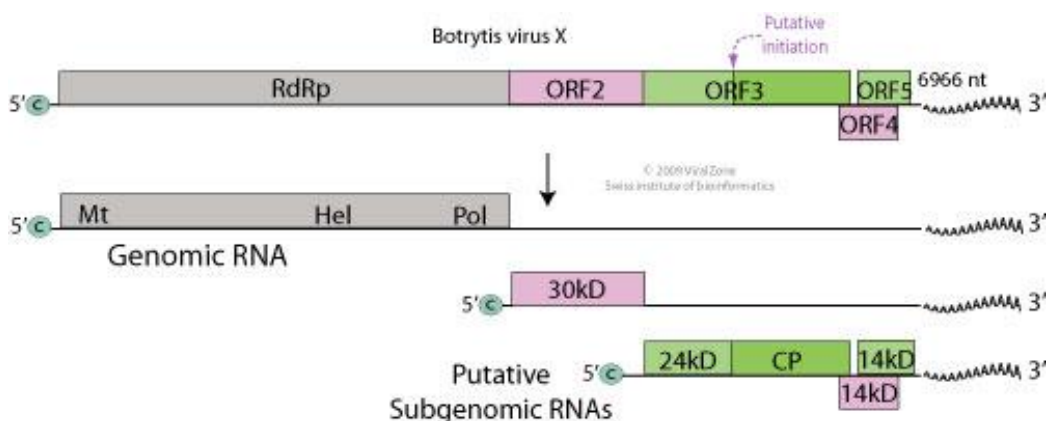
##### Familia *Alphaflexiviridae*

La familia *Alphaflexiviridae* pertenece al orden *Tymovirales*. Miembros de esta familia también se han identificado infectando plantas, además de hongos. Los viriones no se encuentran envueltos, son flexibles y filamentosos. Su genoma lineal de ssRNA de polaridad positiva posee una longitud de entre 5.4 - 9 kb y puede codificar de 1 a 6 proteínas, siendo una de ellas una RdRp. El extremo 3' se encuentra poliadenilado. La RdRp es traducida directamente del ARN genómico, mientras que cuando se presentan otros péptidos estos son traducidos a partir de transcritos de subgenómicos de ARNm monocistrónico (Adams *et al.*, 2011).

Los micovirus asignados a esta familia se pueden clasificar a su vez en 7 géneros, aunque sólo en dos de ellos podemos encontrar micovirus. Estos géneros son *Botrexvirus* y *Sclerodarnavirus*.

Actualmente, el género *Botrexvirus* se encuentra constituido por un solo representante, 'Botrytis virus X' (Howitt *et al.*, 2006). Este micovirus presenta un genoma encapsidado con una longitud de 7 kb, y en él se pueden identificar 5 ORFs. El primero de ellos codifica una RdRp, la cual muestra homología con la replicasa de virus de plantas de la familia *Potyviridae*. El tercer ORF codifica para proteínas de la cápside (CP), mientras que el resto codifican proteínas aún desconocidas.

##### *Botrexvirus*



Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

Al igual que ocurre en el anterior género, el género *Sclerodarnavirus* se encuentra formado por un solo miembro, 'Sclerotinia sclerotiorum debilitation associated RNA virus' (Xie *et al.*, 2006). Este micovirus no se encuentra ni envuelto ni encapsidado, y no genera viriones verdaderos. El tamaño de su genoma es de 5.5 kb, en el cual tan sólo se encuentra codificada una RdRp. Su extremo 3' se encuentra poliadelinado como ocurre en el resto de los miembros de esta familia.

Análisis realizados con este micovirus para determinar el posible efecto sobre su aislado hospedador, han demostrado que *Sclerotinia sclerotiorum debilitation associated RNA virus* debilita a su huésped e incluso puede llegar a inducirle hipovirulencia (Xie *et al.*, 2006).

### *Sclerodarnavirus*



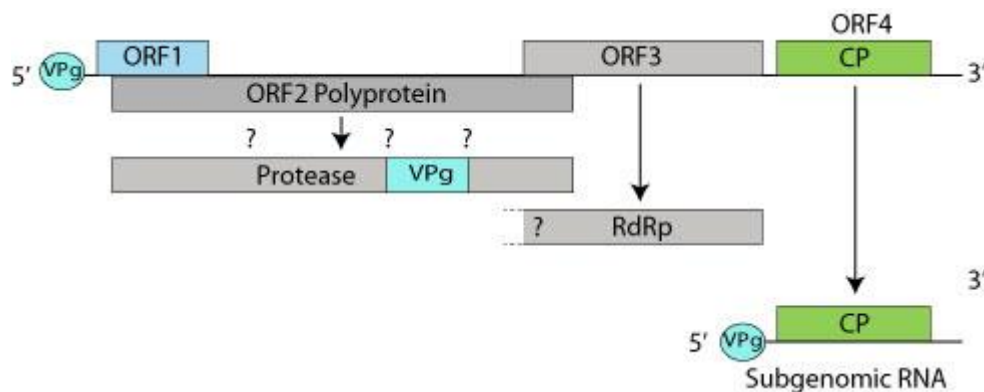
Fuente: *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>)

### Familia *Barnaviridae*

La familia *Barnaviridae* es una familia en la que tan solo se conoce un género, *Barnavirus*, y una especie, 'Mushroom bacilliform virus' (ICTV 9th Report, 2011). Los viriones de esta especie son baciliformes y no están envueltos aunque sí encapsidados. Su genoma contiene una única molécula lineal de ssRNA de sentido positivo, con un tamaño de 4 kb. El ARN tiene unida una proteína VPg (viral protein genome-linked) en su extremo 5', que actúa como cebador durante la síntesis del ARN, y parece carecer de una cola poli(A).

En su genoma podemos encontrar 4 ORFs principales que codifican una proteasa (ORF2), una RdRp (ORF3), y la proteína de la cápside (ORF4), y 3 ORFs de menor longitud que codifican polipéptidos de bajo peso molecular.



*Barnaviridae*

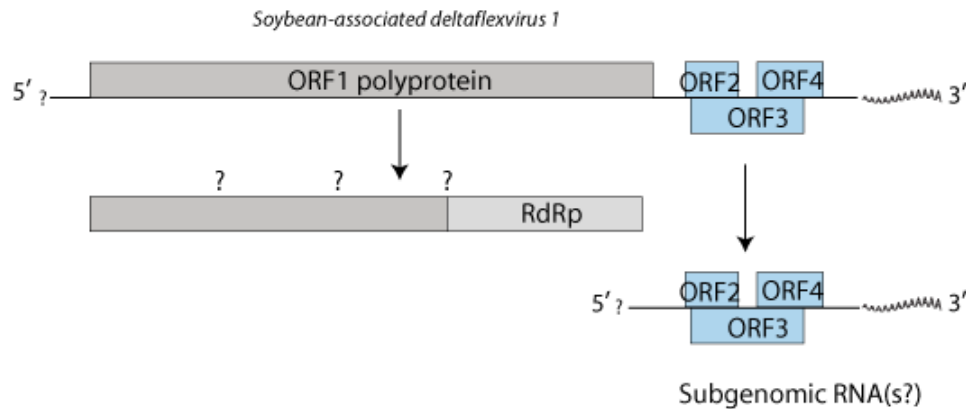
Fuente: *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>)

*Familia Deltaflexiviridae*

La familia *Deltaflexiviridae* ha sido recientemente propuesta. Dentro de esta familia sólo se han descrito 3 micovirus, 'Fusarium deltaflexivirus 1' (Chen *et al.*, 2016), 'Sclerotinia sclerotiorum deltaflexivirus 1' (Li *et al.*, 2015), y 'Soybean-associated deltaflexivirus 1' (Marzano y Domier, 2016). Estos micovirus se agrupan en un único género, *Deltaflexivirus*.

Aunque no han sido observados, en base a sus características genómicas se piensa que carecen de cápside. Su genoma tiene una longitud que oscila entre 6 y 8 kb y el 3' se encuentra poliadenilado. En su secuencia genómica se pueden identificar entre 4 y 5 ORFs. El ORF1 codifica una RdRp que es traducida directamente del ARN genómico, en el cual la polimerasa se salta la lectura de un codón de parada que se encuentra separando la región codificante de la helicasa y la RdRp.

## *Deltaflexivirus*



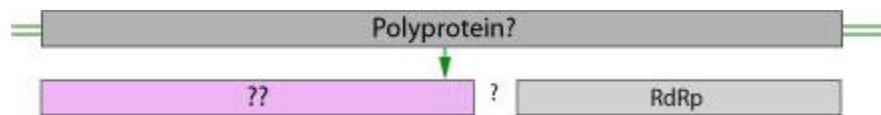
Fuente: *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>)

## Familia *Endornaviridae*

Las primeras clasificaciones situaban a los endornavirus junto a los micovirus con genomas de dsRNA, pero diversos estudios filogenéticos los consideraban más próximos a los virus de ssRNA (Ghabrial y Suzuki, 2009; Hacker *et al.*, 2005). Finalmente, se ha demostrado que los endornavirus poseen genomas de ARN lineales, monocatenarios y de sentido positivo, que varían de 9.7 a 17.6 kb, y se ha informado que infectan plantas, hongos y oomicetos (Valverde *et al.*, 2019).

Los micovirus asignados a esta familia no forman verdaderos viriones y se localizan en vesículas citoplasmáticas. Generalmente, los endornavirus codifican una única poliproteína, en la que se pueden identificar un dominio RdRp y un dominio helicasa. También, en algunos casos, se puede encontrar en estos genomas un dominio metiltransferasa viral (MET) y/o un dominio glicosiltransferasa (UGT).

### *Endornaviridae*

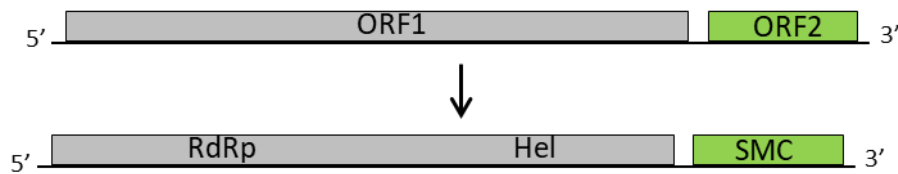


Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

La familia consta de dos géneros, *Alphaendornavirus* y *Betaendornavirus* (Khalifa y Pearson, 2014) en los que los virus se clasifican según su tamaño genómico, huésped, y presencia de dominios únicos. El género *Alfaendornavirus* incluye especies cuyos miembros infectan plantas, hongos y oomicetos, mientras que el género *Betaendornavirus* incluye especies cuyos miembros infectan hongos ascomicetos. Los miembros del género *Alphaendornavirus* poseen genomas de entre 13.8 y 17.5 kb, y presentan un dominio UGT. Además, aunque estos virus codifican un único ORF, se han identificado sitios de excisión en la secuencia, que darían lugar a dos péptidos (Moriyama *et al.*, 1999). Por otro lado, los micovirus agrupados en el género *Betaendornavirus*, poseen genomas algo más cortos, encontrándose en un rango de entre 9.5 a 11.4 kb de longitud. Los betaendornavirus poseen un dominio que codifica una metiltransferasa, pero no poseen un dominio UGT, ni tampoco el sitio específico de escisión (Khalifa y Pearson, 2014).

### Familia *Fusariviridae*

Los miembros de la familia propuesta *Fusariviridae* tienen genomas monosegmentados, que codifican entre 2 y 4 ORFs. El ORF1 es el más largo, y contiene motivos de la RdRp y helicasa. El siguiente ORF en longitud codifica una proteína desconocida, que a menudo contiene un motivo de 'mantenimiento estructural de cromosomas' (SMC). Algunos virus asignados a esta familia pueden codificar pequeñas proteínas adicionales en el extremo 3' (Gilbert *et al.*, 2019).

*Fusariviridae*

Diversos análisis filogenéticos basados en la secuencia aminoacídica de la RdRp, clasifican a los fusarivirus en dos grupos. La estructura genómica de estos dos grupos sugieren algunos patrones generales. Todos los miembros del 'Grupo 1', normalmente poseen sólo dos ORFs, y codifican un dominio funcional en el segundo ORF de mayor longitud (Yang *et al.*, 2015; Kellner *et al.*, 2014). Por el contrario, los virus asignados al 'Grupo 2', suelen presentar 3 ORFs, pero en este caso en el segundo, de mayor longitud, no hay codificada ninguna proteína funcional (Hulvey *et al.*, 2012).

Como la familia *Fusariviridae* aún no ha sido oficialmente reconocida, las características específicas para distinguir nuevas especies o géneros aún no están claramente establecidas.

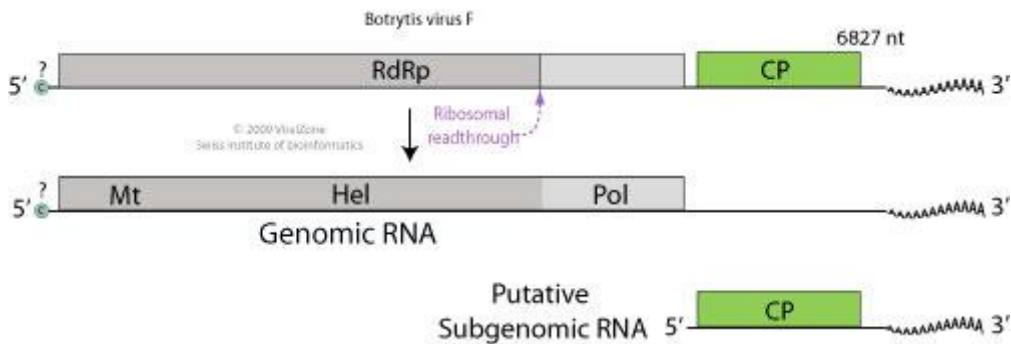
Entre los fusarivirus descritos hasta el momento, 'Botrytis cinerea fusarivirus 1', es el único asociado a la inducción de hipovirulencia en su hospedador fúngico. (Hao *et al.*, 2018).

**Familia *Gammaflexiviridae***

La familia *Gammaflexiviridae* también pertenece al orden *Tymovirales*, como ocurre con la familia *Alphaflexiviridae*. Actualmente, sólo hay un género, *Mycoflexivirus*, y una especie, 'Botrytis virus F', formando parte de esta familia (ICTV: 'Virus Taxonomy: 2018b Release'; Pearson y Bailey, 2013).

Los viriones no poseen una envuelta y son flexibles y filamentosos. Su genoma lineal tiene una longitud de 6.8 kb. El extremo 3' se encuentra poliadenilado. En este genoma podemos encontrar dos ORFs claramente separados. El ORF1 contiene motivos conservados correspondientes a una metiltransferasa y a una helicasa que terminan con un codón de parada UGA. En este mismo ORF se encuentra codificada la RdRp. El ORF2 codifica la proteína de recubrimiento. La RdRp es traducida directamente del ARN genómico mediante el salto en la lectura del codón de parada, que se encuentra entre la región codificante de una helicasa y la RdRp, y la proteína de la cápside parece que es transcrita como un ARN subgenómico (*Howitt et al., 2001*).

### *Mycoflexivirus,*

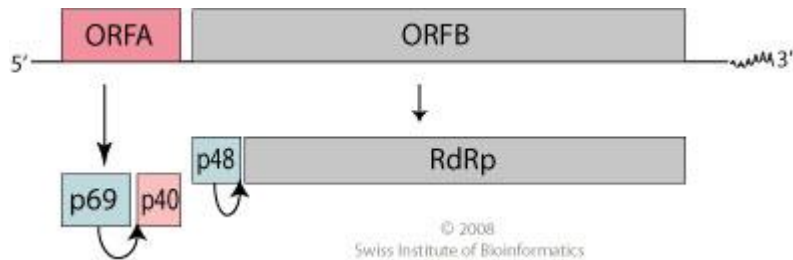


Fuente: *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>)

### Familia *Hypoviridae*

La familia *Hypoviridae* es una familia de virus sin cápside, con genomas de ssRNA de sentido positivo monosegmentados cuya longitud oscila entre 9 y 13 kb. Pueden contener uno o dos ORF, cada uno de los cuales codifica una poliproteína (*Suzuki et al., ICTV report Consortium, 2018*). En el extremo 3' se puede identificar una cola poli(A), y su genoma no codifica proteínas estructurales. Estos virus se replican dentro de vesículas lipídicas procedentes del aparato de Golgi del huésped. (*Fahima et al., 1993; Jacob-Wilk et al., 2006*). Además pueden presentar moléculas de ARN asociadas.

Una de las características más importantes de esta familia, razón por la que reciben su nombre, es que, a menudo, la infección por estos micovirus puede reducir la virulencia del hospedador fúngico.

*Hypoviridae*

Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

Actualmente, hay cuatro especies oficialmente reconocidas en la familia *Hypoviridae*, *Cryphonectria hypovirus* 1, 2, 3, y 4 (CHV1, CHV2, CHV3, y CHV4), identificados en aislados de *Cryphonectria parasitica*, aunque se han descrito miembros de esta familia infectando otras muchas especies de hongos. En base a las relaciones filogenéticas entre estos 4 hipovirus y las características que presentan, se han propuesto dos géneros, *Alphahypovirus*, que contendría a los hipovirus CHV1 y CHV2 (Li *et al.*, 2015) y *Betahypovirus*, en el que se agrupan CHV3 y CHV4 (Yaegashi *et al.*, 2012). Los miembros del género *Alphahypovirus* poseen genomas más largos (de 12.5 a 14.4 kb) y están caracterizados por poseer dos ORFs. El ORF1 parece codificar diversas proteasas, mientras que el segundo ORF contiene los dominios proteasa, RdRp y helicasa. Por otro lado, los virus que forman parte del género *Betahypovirus* tienen un genoma algo más pequeño (9 - 11 kb), que contiene un único ORF. Generalmente, este ORF codifica una poliproteína en la que pueden observarse dominios proteasa, UGT, RdRp y helicasa. Este último género posee en su extremo 5' secuencias altamente conservadas entre sus miembros.

Actualmente, se especula acerca de la propuesta de un nuevo género en esta familia, el género *Gammahypovirus* (Hu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019). Este sería el resultado de la separación filogenética de los micovirus identificados 'Sclerotium rolfsii hypovirus 1' y 'Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 2' los cuales parecen presentar algunas diferencias claras en el genoma con respecto al resto los miembros de esta familia.

### Familia *Narnaviridae*

La familia *Narnaviridae* se encuentra formada por micovirus no envueltos, con genomas de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva de pequeño tamaño. Su longitud oscila entre 2 y 2.9 kb, y codifican una RdRp como único péptido (Hillman y Cai, 2013). Estos micovirus no codifican proteínas estructurales. Su genoma posee un alto contenido en A+U y no parecen tener su extremo 3' poliadenilado. Actualmente, se pueden distinguir dos géneros dentro de esta familia, *Narnavirus* y *Mitovirus*.

Mientras que los micovirus del género *Narnavirus* presentan las características típicas de la familia y se replican en el citoplasma, los micovirus agrupados en el género *Mitovirus* se caracterizan por replicarse dentro de la mitocondria de su huésped fúngico (Hillman y Cai, 2013). Además, el ORF codificante de estos genomas comienza con el codón de inicio mitocondrial UGA (Osawa *et al.*, 1992).

Normalmente los miembros de esta familia son cripticos, aunque en algunos casos, la infección por estos micovirus tiene efectos sobre la morfología de la mitocondria, el crecimiento *in vitro* y la virulencia de su huésped fúngico, (Wu *et al.*, 2010; Polashock *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015).

### *Narnaviridae*



Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>)

#### 4.2.2.2 Clasificación de micovirus con genomas de ssRNA (-)

### Familia *Mymonaviridae*

Actualmente, la familia *Mymonaviridae* es la única familia con virus de ssRNA de polaridad negativa que infectan hongos. En ella sólo se encuentra asignado un género, *Sclerotimonavirus*, en el cual se encuentran asignadas 5 especies. Tres de ellas se han identificado infectando al hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2017; Marzano *et al.*, 2016), otra a *Botrytis cinerea* (Hao *et al.*, 2018) y la última especie se ha identificado

infectando a *Fusarium graminearum* (Wang *et al.*, 2018).

Los miembros de la familia *Myomonaviridae* producen viriones filamentosos envueltos que contienen una sola molécula de ARN lineal de sentido negativo de aproximadamente 10 kb. Su genoma codifica hasta 6 proteínas en diferentes ORFs. En el ORF5, de mayor longitud, se encuentra codificada la RdRp viral. Ésta, una vez que es traducida, se une al genoma en la "leader región" y transcribe secuencialmente cada gen al reconocer las señales de inicio y parada que flanquean los diferentes ORFs.

### *Sclerotimonavirus*

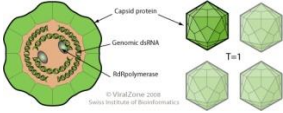
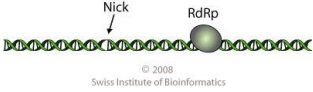
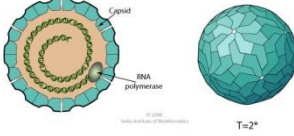
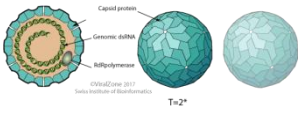
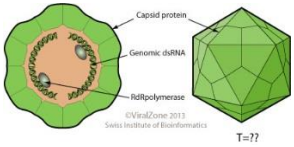
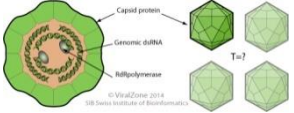
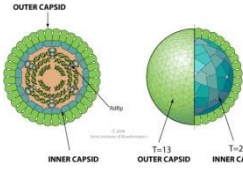
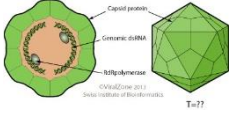




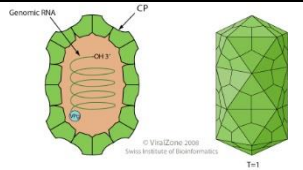


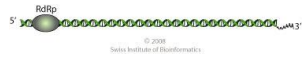
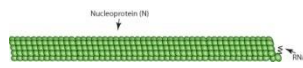
Fuente: *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>)

El micovirus 'Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 1', un mymonavirus que se encuentra infectando un aislado de *Sclerotinia sclerotium*, causa fenotipos de hipovirulencia, incluyendo lentitud en el crecimiento y pérdida de patogenicidad.



Tabla 1 | Clasificación y características generales de las distintas familias de micovirus

FAMILIA	GEÉNERO	GENOMA	ESQUEMA	EFFECTO SOBRE EL HUÉSPED	HUÉSPED	REFERENCIA
<i>Chrysoviridae</i>	<i>Chrysovirus</i>	Tetrasegmentado 3.5-2.7 kb		Si	Hongos	Ghabrial et al., 2018
<i>Endornaviridae</i>	<i>Alphaendornavirus Beta</i>	Monosegmentado 9.5-17.5 kb		---	Hongos Plantas Oomycetos	Fukuhara and Gibbs, 2012
<i>Alternaviridae</i>	<i>Alternavirus</i>	Tetrasegmentado 3.5- 2kb	----	Si	Hongos	Aoki et al., 2009
<i>Totiviridae</i>	<i>Totivirus</i> <i>Victorivirus</i>	Monosegmentado 4.6-7 kb		Si	Hongos Protozoarios	Yu et al., 2015 Xie et al., 2016
<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphapartitivirus</i> <i>Betapartitivirus</i> <i>Gammapartitivirus</i> <i>Epsilonpartitivirus</i> <i>Zetapartitivirus</i>	Bisegmentado 1.4 y 2.4 kb		Si	Hongos Plantas Protozoarios	Vainio et al., 2018
<i>Megabirnaviridae</i>	<i>Megabirnavirus</i>	Bisegmentado 7.2-8.9 kb		Si	Hongos	Ghabrial et al., 2015
<i>Quadriviridae</i>	<i>Quadrivirus</i>	Tetrasegmentado 3.7-4.9 kb		Si	Hongos	Ghabrial et al., 2015; Lin et al., 2012
<i>Reoviridae</i>	<i>Mycoreovirus</i>	Multisegmentado 0.7-5 kb		Si	Hongos Plantas Protozoarios Vertebrados	Attoui et al., 2012
---	<i>Botybirnavirus</i>	Bisegmentado 6.2-5.9 kb		Si	Hongos	Wu et al., 2012
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Botrexvirus</i>	Monosegmentado. 7 kb		No	Plantas Hongos	Howitt et al., 2005

	<i>Sclerodarnavirus</i>	Monosegmentado. 5.5 kb		Si	Plantas Hongos	Xie et al., 2006
<i>Barnaviridae</i>	<i>Barnavirus</i>	Monosegmentado. 4 kb		No	Hongos	ICTV 9th Report, 2011
<i>Gammaflexiviridae</i>	<i>Mycoflexivirus</i>	Monosegmentado. 6.8 kb		No	Hongos	Pearson y Balley, 2013
<i>Narnaviridae</i>	<i>Narnavirus</i> <i>Mitovirus</i>	Monosegmentado. 2-3 kb		Si	Plantas Hongos	Hillman y Cai, 2013
<i>Hypoviridae</i>	<i>Alphahipovirus</i> <i>Betahipovirus</i>	Monosegmentado. 9-14.4 kb		Si	Hongos	Li et al., 2015 Yaegashi et al., 2012
<i>Fusariviridae</i>	<i>Grupo 1</i> <i>Grupo 2</i>	Monosegmentado. 6-8 kb	----	---	Hongos	Hao et al 2018
<i>Deltaflexiviridae</i>	<i>Deltaflexivirus</i>	Monosegmentado. 6-8 kb	----	----	Hongos Plantas	Li et al., 2015
<i>Myomonaviridae</i>	<i>Sclerotimonavirus</i>	Monosegmentado. 10 kb		Si	Hongos	Liu et al. 2014

Basado en: Nuss (2005), Nature reviews Microbiology, vol 3; Ghabrial *et al.* (2015), Virology 479–480, (2015),

<sup>a</sup>Esquemas que muestran la estructura de los viriones de las diferentes familias y géneros (Fuente: ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>))

<sup>b</sup> Familias o géneros en los que se agrupan especies con capacidad para inducir hipovirulencia.

### 4.3.- Micovirus como agentes de control biológico

Los micovirus parecen *et al.*, jugar un importante papel en la modulación de la interacción hongo-planta, de manera que aquellos virus con capacidad para reducir la virulencia del aislado hospedador, y por tanto limitar las enfermedades de las plantas, se convierten en candidatos idóneos para su uso como agentes de control biológico (Dawe y Nuss, 2001; Ghabrial y Suzuki, 2009; Dawe y Nuss, 2013). Este hecho supondría un avance en el desarrollo de nuevas estrategias de control de enfermedades fúngicas menos perjudiciales para el medio ambiente. Así, los micovirus se consideran actualmente organismos de gran interés en fitopatología, llegándose a plantear la posibilidad de su uso no sólo como agentes de control biológico (virocontrol), sino también como herramientas para estudiar e incluso manipular la interacción entre el patógeno

fúngico y la planta hospedadora.

Aunque el número de micovirus identificados con capacidad para inducir hipovirulencia es elevado, el único que hasta el momento se ha usado como un agente efectivo de virocontrol es 'Chryphonectria hypovirus 1' (CHV1). Desde que se observó en Europa cómo las infecciones por *Cryphonectria parasítica* se controlaban de manera natural por CHV1, este micovirus se ha estado utilizando hasta ahora para controlar el chancro del castaño en los viveros de castaños europeos (Bissegger *et al.*, 1997; Milgroom y Cortesi, 2004).

La utilización exitosa de micovirus en el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos no sólo requiere que el micovirus induzca hipovirulencia, sino que también es necesario que dicho micovirus se mantengan de forma estable en las células y que se transmita 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 (transmisión horizontal), y a través de las esporas (transmisión vertical). Para que se produzca la anastomosis hifal entre dos aislados fúngicos es necesario que ambas cepas 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). Una de las hipótesis más extendidas es que este sistema evolucionó como un mecanismo de defensa para limitar la transmisión de virus, transposones y plásmidos que confieren senescencia. Los trabajos de campo realizados con cepas hipovirulentas de *C. parasítica* han mostrado que el uso de micovirus como herramientas de control biológico funciona mejor cuando las poblaciones del patógeno a controlar poseen una baja diversidad en VCGs. 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 disperse. La alta diversidad en VCGs ha sido, en efecto, la causa de que la utilización de cepas hipovirulentas de *C. parasítica* infectadas con CHV1, utilizada con éxito en Europa, no haya sido efectiva en el control del chancro del castaño en Norteamérica (Liu y Milgroom, 1996; Cortesi *et al.*, 2001).

La eficiencia en la transmisión vertical dentro de los distintos individuos de una población también juega un papel importante en el posible uso de los

micovirus como agentes de virocontrol. Esta transmisión se produce fundamentalmente a través de las conidias, y la 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; Lemus-Minor *et al.*, 2019; Shain y Miller, 1992). Por ello, el éxito en el tratamiento de biocontrol con virus inductores de hipovirulencia también dependerá de la elección adecuada del aislado(s) portador(es) de la infección viral.

#### 4.4.- Micovirus identificados en especies del género *Fusarium*

*Fusarium* ha resultado ser una de las familias fúngicas con mayor número de infecciones virales. Gracias a las nuevas tecnologías, actualmente se conocen una amplia diversidad de especies de micovirus infectando distintos géneros y especies de este hongo fitopatógeno. Entre los géneros infectados podemos encontrar a *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; Lemus-Minor *et al.*, 2015).

Hasta el momento, se han descrito micovirus infectado a *Fusarium* en casi todas las familias víricas, presentado genomas que pueden ser de dsRNA, ssRNA de polaridad positiva y ssRNA de polaridad negativa, pero hasta el momento no se ha identificado ningún micovirus de ADN. A pesar del amplio número de micovirus identificados, tan solo cuatro de ellos parecen poseer la capacidad de inducir hipovirulencia en su huésped fúngico. Tres de ellos han sido identificados en *Fusarium graminearum* (Darissa *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014), mientras que el cuarto ha sido identificado en el género *Fusarium oxysporum* (Lemus-Minor *et al.*, 2018)

‘*Fusarium graminearum* virus China 9’ ha sido el primer virus de *Fusarium* que se ha asociado a hipovirulencia (Darissa *et al.*, 2012). Más tarde, fueron identificados otros dos virus en *F. graminearum*, ‘*Fusarium graminearum* virus 1’ y ‘*Fusarium graminearum* virus 2’ (Lee *et al.*, 2014). Los estudios realizados con estos micovirus y sus aislados hospedadores los han convertido en un modelo para el estudio de la interacción hongo-virus, especialmente para determinar los cambios en el fenotipo (incluyendo la hipovirulencia), y la

reducción de la producción de micotoxinas causadas por la infección del micovirus.

#### 4.4.1.- Micovirus identificados en la especie *Fusarium oxysporum*

A día de hoy, el número de micovirus descritos en la especie *Fusarium oxysporum* es muy reducido, es más, tan sólo han sido identificados cinco micovirus infectando esta especie. Sin embargo, sólo uno de ellos se ha podido asociar a la inducción de hipovirulencia

En 1998, Killic y Griffin describieron por primera vez partículas virales infectando un total de 6 aislados de *F. oxysporum*. Se trataba de virus de dsRNA cuyo genoma estaba formado por 4 segmentos con tamaños estimados de 4, 3.1, 2.7 y 2.2 kb. 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. Por otro lado, Killic y Griffin no observaron una asociación clara entre la presencia de estos dsRNAs y la virulencia del aislado fúngico evaluada en ensayos con semillas de soja.

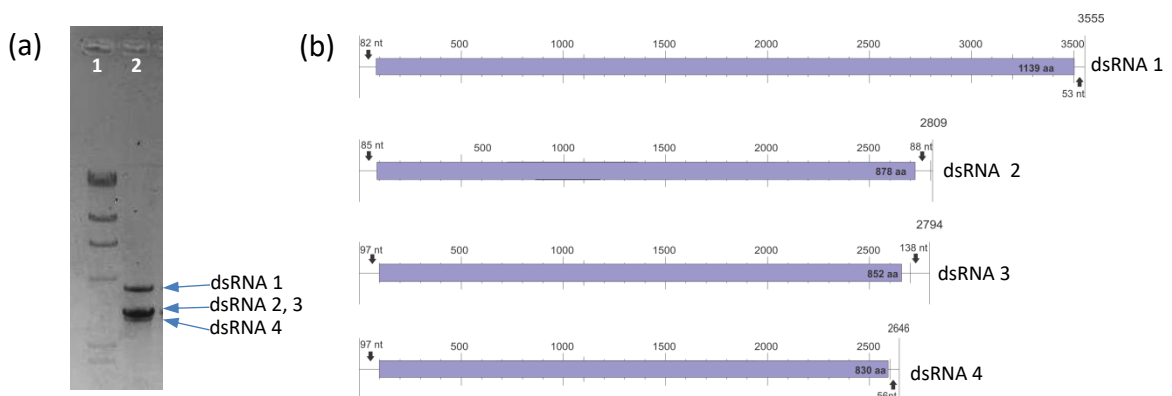
Otro micovirus, denominado 'Fusarium oxysporum chrysovirus 1' (FoCV1), ha sido identificado en la forma especialis *melonis* de *F. oxysporum* (Sharzei *et al.*, 2007). FoCV1 es también un miembro de la familia *Chrysoviridae*, cuyo genoma se compone de 4 segmentos de dsRNA de aproximadamente 3, 2.5, 2.3, y 0.7 kb. Solo se dispone de la secuencia parcial del segmento de mayor tamaño (dsRNA I), que codifica una proteína que exhibe una gran similitud con RdRps de chrysovirus. Se ha mostrado que la infección por FoCV1 no tiene ningún efecto en el crecimiento, la morfología, o la virulencia de su hongo hospedador (Sharzei *et al.*, 2007)

El micovirus identificado más recientemente ha sido 'Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1' (Lemus-Minor *et al.*, 2015), detectado infectando una cepa de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, y el único hasta el momento asociado a la inducción de hipovirulencia. A él nos referiremos más extensamente en el apartado siguiente.

#### 4.4.2- FodV1: El primer micovirus asociado a la inducción de hipovirulencia en *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1) fue identificado con un alto nivel de acumulación en la cepa *Fod* 116 de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, una cepa aislada en 2008 de una planta de clavel enferma procedente de la provincia de Cádiz (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2012) *et al.*

El genoma de FodV1 consta de cuatro segmentos de dsRNA, que fueron nombrados, desde el de mayor tamaño hasta el más pequeño, como dsRNA 1, 2, 3 y 4. Cada uno de estos segmentos contiene un único ORF y sus tamaños oscilan entre 3.5 kb y 2.6 kb. En los segmentos dsRNA 1 y 3 se encuentran codificadas una RdRp y una proteína de la capsida (CP), respectivamente. Los segmentos de dsRNA 2 y 4 codifican hipotéticas proteínas de función desconocida, nombradas como P2 y P4. El análisis de su estructura genómica, las búsquedas de homologías de las secuencias aminoacídicas, y el análisis filogenético, indican que FodV1 es un nuevo miembro de la familia *Chrysoviridae* (Lemus-Minor *et al.*, 2015)



**Figura 7.- Caracterización de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1).** (A) Patrón de bandas de dsRNA de FodV1 analizado por electroforesis en gel de agarosa. La línea 1 corresponde al marcador de peso  $\lambda$ -HindIII; La línea 2 corresponde a los extractos enriquecidos en dsRNA del aislado *Fod* 116 obtenidos por cromatografía. (B) Representación esquemática del genoma de FodV1. Imagen tomada de Lemus-Minor *et al.*, Archives of Virology, 2015.

Con el objetivo de poder estudiar los posibles efectos de este micovirus sobre su aislado hospedador, los investigadores obtuvieron un aislado de la cepa *Fod* 116 con niveles residuales de FodV1, la cual compararon con la cepa originalmente infectada. Esta comparación mostró significativas alteraciones en el fenotipo del hospedador debidas al micovirus. La presencia de un alto título viral de FodV1 se mostró asociada a modificaciones morfológicas y reducción del crecimiento de las colonias en medio sólido, a una disminución de la

conidiación en medio líquido, y a una pérdida de virulencia del aislado fúngico (Figura 8) (Lemus-Minor *et al.*, 2018).



Figura . 8.- Diferencia en la severidad de síntomas de la enfermedad en claveles inoculados con cada versión de la cepa de FodV1: (A) bajo título viral y (B) alto título viral.

También se ha analizado la capacidad de FodV1 para ser transmitido horizontalmente por anastomosis hifal, y verticalmente a través de las conidias, además de comprobar si los niveles de acumulación en los aislados receptores se mantenían similares a los altos niveles detectados en la cepa originalmente portadora. Los resultados mostraron que el micovirus FodV1 se transfería horizontalmente entre aislados compatibles, manteniendo altos niveles de acumulación en el nuevo aislado receptor. Asimismo, se ha demostrado que FodV1 se transmite eficientemente a través de las esporas, aunque dicha eficiencia depende del aislado portador considerado (Lemus-Minor *et al.*, 2019).

Las nuevas cepas infectadas obtenidas por transmisión horizontal fueron usadas para comprobar si las alteraciones fenotípicas que originaba FodV1 en el aislado originalmente portador, se reproducían en los nuevos aislados receptores. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de FodV1 en los nuevos aislados inducía alteraciones fenotípicas similares a las descritas en el aislado portador original, incluyendo la inducción de hipovirulencia (Lemus-Minor *et al.*, 2019).

Todos estos resultados sugieren que FodV1 podría ser un buen candidato para su aplicación como agente de virocontrol de la fusariosis vascular de clavel.

## Objetivos de esta Tesis

Los objetivos generales de esta Tesis han sido dos:

1. Analizar el efecto del micovirus FodV1 sobre el patrón de colonización vascular del aislado fúngico infectado (Capítulo 1).
2. Identificar nuevos micovirus en poblaciones de *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi*: analizar sus estructuras genómicas y sus relaciones filogenéticas, y determinar sus efectos sobre el fenotipo del aislado infectado (Capítulos 2 y 3).

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

Capítulo 1: 'Mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Virus 1 decreases the colonizing efficiency of its fungal host' Publicado en: *Front. Cell. Infect. Microbiol* (2019). Online publication doi:10.3389/fcimb.2019.00051

Capítulo 2: 'Molecular and biological characterization of the first hypovirus identified in *Fusarium oxysporum*'. Aceptado con modificaciones en *Frontiers in Microbiology*

Capítulo 3: "Characterization and incidence of the first member of the genus *Mytovirus* identified in the phytopathogenic species *Fusarium oxysporum*". Enviado a *Viruses*.





## CAPÍTULO I

### **Mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 decreases the colonizing efficiency of its fungal host**

**Publicado como/Published as:**

Torres-Trenas, A., Prieto, P., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artés, E. (2019). Mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Virus 1 Decreases the Colonizing Efficiency of Its Fungal Host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 51. doi:10.3389/fcimb.2019.00051.



## Resumen

Los micovirus que inducen hipovirulencia en hongos fitopatógenos son interesantes debido a su potencial uso como agentes de control biológico de las enfermedades de las plantas causadas por hongos. El chrysovirus recientemente identificado *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1) se ha asociado a la inducción de hipovirulencia en *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, la 'forma specialis' de *F. oxysporum* que causa marchitez vascular en el clavel (*Dianthus caryophyllus*). En este trabajo, se ha utilizado microscopía de escáner láser confocal y dos cepas isogénicas de *F. oxysporum* sp. *dianthi*, una infectada con FodV1 (V+) y otra sin infectar (V-), marcadas con el gen que expresa la proteína verde fluorescencia GFP, para analizar el efecto del micovirus en el patrón de colonización de plantas de su huésped fúngico.

Los resultados demuestran que la infección viral por FodV1 afecta a la velocidad y la distribución espacial de la colonización del hongo en la planta. Las etapas iniciales de la colonización externa de la raíz fueron similares para ambas cepas, pero la cepa libre de virus colonizó los tejidos vegetales internos más rápido que la cepa infectada por el virus. Además, se observaron otras diferencias relacionadas con la zona específica colonizada y la densidad de colonización entre ambas cepas de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. Las hifas de las cepas V- y V+ progresaron a través de los vasos del xilema, pero se encontraron diferencias en el número de vasos colonizados y del número de hifas dentro de ellos. Además, a medida que progresaba la colonización, las hifas tanto de V- como de V+ se propagaban horizontalmente hasta llegar a la médula central, pero, mientras que la cepa V-, libre de virus colonizaba densamente el interior de las células de la médula, la cepa V+, infectada por virus aparecía principalmente en los espacios intercelulares y con una menor densidad de colonización.

Finalmente, también se analizó la incidencia de infecciones virales por FodV1 en una colección de 221 aislamientos muestreados entre 2008 y 2012 en el área geográfica donde se obtuvo el aislado originalmente infectado. Aquí se discute la baja (<2%) incidencia de infecciones virales por FodV1. Hasta donde sabemos, este trabajo proporciona la primera evidencia microscópica sobre el efecto de un micovirus inductor de hipovirulencia en el patrón de colonización de plantas por su huésped fúngico.

### Abstract

Mycoviruses that induce hypovirulence in phytopathogenic fungi are interesting because their potential use as biological control agents of the plant diseases caused by their fungal hosts. The recently identified chrysovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1 (FodV1) has been associated to the induction of hypovirulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, the forma specialis of *F. oxysporum* that causes vascular wilt in carnation (*Dianthus caryophyllus*). In this work, we have used confocal laser scanner microscopy and two isogenic GFP-labelled strains of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* infected (V<sup>+</sup>) and not infected (V<sup>-</sup>) with the *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1, respectively, to analyze the effect of mycovirus FodV1 on the plant colonization pattern of its fungal host. Results demonstrate that FodV1-viral infection affects the speed and spatial distribution of fungal colonization into the plant. Initial stages of external root colonization were similar for both strains, but the virus-free strain colonized the internal plant tissues faster than the virus-infected strain. In addition, other differences related to the specific zone colonized and the density of colonization were observed between both *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* strains. The hyphae of both V<sup>-</sup> and V<sup>+</sup> strains progressed up through the xylem vessels but differences in the number of vessels colonized and of hyphae inside them were found. Moreover, as colonization progressed, V<sup>-</sup> and V<sup>+</sup> hyphae propagated horizontally reaching the central medulla but, while the virus-free strain V<sup>-</sup> densely colonized the interior of the medulla cells, the virus-infected strain V<sup>+</sup> appeared mainly in the intercellular spaces and with a lower density of colonization. Finally, the incidence of FodV1-viral infections in a collection of 221 isolates sampled between 2008 and 2012 in the geographic area where the originally infected isolate was obtained has been also analyzed. The very low (<2%) incidence of viral infections is discussed here. To the best of our knowledge, this work provides the first microscopic evidence about the effect of a hypovirulence-inducing mycovirus on the pattern of plant colonization by its fungal host.

### Acknowledgements

This research was supported by Grants AGL 2013-48980-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and AGL 2016-80048-R from the Spanish Ministry of Science and Innovation, co-funded by the European Union (FEDER funds). We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI). We thank Antonio Valverde for their valuable technical assistance and Emilio A. Cano (Barberet & Blanc S.A.) for providing carnation cultivars.



## CAPÍTULO II

### **Molecular and biological characterization of the first hypovirus identified in *Fusarium oxysporum***

**Aceptado con modificaciones como / accepted with modifications as:**

Torres-Trenas, Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artés, E. (2019). Molecular and biological characterization of the first identified in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers.in Microbiology*





### Resumen

Un nuevo micovirus llamado *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* hypovirus 2 (FodHV2) se ha identificado infectando a dos aislados, *Fod* 408 y *Fod* 409, de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* procedentes de Marruecos. En ambos aislados también se observó la presencia de una forma defectuosa de FodHV2.

El genoma de FodHV2 tiene una longitud de 9,444 nucleótidos, excluyendo la cola poli(A), y presenta un único marco abierto de lectura (ORF), que codifica una poliproteína. La poliproteína contiene tres dominios altamente conservados, un dominio de UDP glucosa/esterol glucosiltransferasa, el dominio de una ARN polimerasa dependiente de ARN y el de una ARN helicasa viral. Además, se detectaron algunos residuos particulares de Cys, Hys y Gly en la región N-terminal que podrían representar el sitio catalítico de una proteasa extinta. La organización genómica, la presencia de determinados motivos conservados y el resultado de diferentes análisis filogenéticos basados en alineaciones múltiples, claramente agruparon al micovirus FodHV2 con los miembros del nuevo género propuesto *Betahypovirus* en la familia *Hypoviridae*.

FodHV2, junto con su forma defectuosa, fue transferido por anastomosis hifal a una cepa receptora libre de virus marcada con el gen de resistencia a higromicina (HgR). La comparación de las cepas isogénicas obtenidas, una infectada y otra no infectada por el hipovirus, mostró que FodHV2 no altera el crecimiento vegetativo, ni la conidiación ni la virulencia de su huésped fúngico. La eficiencia en la transmisión del FodHV2 a través de las conidias fue similar (100%) tanto en los aislados infectados originales como en los receptores.

Hasta donde sabemos, este es el primer informe de un hipovirus que infecta la especie patógena de plantas *F. oxysporum*, y también el primero descrito en una cepa de hongos del continente africano.

### Abstract

A novel mycovirus named *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* hypovirus 2 (FodHV2) has been identified infecting isolates *Fod* 408 and *Fod* 409 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from Morocco. The presence of a defective form of FodHV2 has also been observed in both isolates. The genome of FodHV2 is 9444 nucleotides long excluding the poli(A) tail, and has a single open reading frame (ORF) encoding a polyprotein. The polyprotein contains three highly conserved domains of UDP glucose/sterol glucosyltransferase, RNA-dependent RNA polymerase, and viral RNA helicase. In addition, some particular residues of Cys, Hys, and Gly were detected in the N-terminal region that could represent the catalytic site of a former papain-like protease. Genomic organization, presence of particular conserved motifs, and phylogenetic analyses based on multiple alignments clearly grouped FodHV2 with the members of the new proposed genus *Betahypovirus* in the family *Hypoviridae*. FodHV2, together with its defective, was transferred by hyphal anastomosis to a recipient Hg<sup>R</sup>-tagged virus-free strain. Comparison of the infected and non-infected isogenic strains showed that FodHV2 did not alter the vegetative growth, neither the conidiation nor the virulence of its fungal host. Efficiency in the transmission of the FodHV2 through the conidia was similar (100%) in both the original and the recipient infected-isolates. To the best of our knowledge, this is the first report of a hypovirus infecting the plant pathogenic species *F. oxysporum*, and also the first one described in a fungal strain from the African continent.

### Acknowledgements

This research was supported by Grants AGL 2013-48980-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and AGL 2016-80048-R from the Spanish Ministry of Science and Innovation, co-funded by the European Union (FEDER funds). We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI). We thank Antonio Valverde and Carlos Casanova for their valuable technical assistance and Emilio A. Cano (Barberet & Blanc S.A., Dümme Orange) for providing carnation cultivars.

## CAPÍTULO III

### **Characterization and incidence of the first member of the genus *Mitovirus* identified in the phytopathogenic species *Fusarium oxysporum***

**Enviado como/Send as:**

Torres-Trenas and Pérez-Artés, E. (2019). Characterization and incidence of the first member of the genus *Mytovirus* identified in the phytopathogenic species *Fusarium oxysporum*. *Viruses*.



### Resumen

En este trabajo se ha identificado un nuevo micovirus llamado micovirus 'Fusarium oxysporum f. sp. dianthi mitovirus 1' (FodMV1) infectando un aislado de *Fod* procedente de Colombia. FodMV1 posee un genoma de 2,313 pb de longitud, en el que se ha identificado un único ORF que codifica una RdRp viral. Una búsqueda de homología usando la secuencia nucleotídica y el programa BlastX mostró que FodMV1 es un nuevo miembro del género *Mitovirus* en la familia *Narnaviridae*.

Una de las características de los mitovirus es que se replican en la mitocondria. De acuerdo con esto, el genoma de FodMV1 presenta una serie de características comunes al resto de mitovirus, como son una alta concentración de A+U (58.8%) y la presencia de un número de codones UGA, que codifican el aminoácido triptófano en vez de una señal de 'stop' cuando se aplica el código genético mitocondrial. Asimismo, los extremos 5'- y 3'- UTR presentan una estructura secundaria característica también de mitovirus. El análisis filogenético sitúa a FodMV1 en un clado separado del resto de mitovirus que infectan otras especies de *Fusarium*.

FodMV1 parece tener una relativamente alta incidencia, ya que se ha identificado infectando a otros 22 aislados de *Fod*. Entre estos aislados infectados podemos encontrar aislados procedentes de España (18) y Colombia (4). La presencia del mismo micovirus en aislados de zonas geográficas tan separadas sugiere una dispersión de la infección viral a través de la comercialización de esquejes de clavel entre ambos países.

### Abstract

A novel mycovirus named *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* mitovirus 1 (FodMV1) has been identified infecting a strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from Colombia. The genome of FodMV1 is 2,313 nt long, and comprises a 172-nt 5'-UTR, a 2,025-nt single ORF encoding a RdRp of 675 aa residues, and a 113-nt 3'-UTR. Homology BlastX searches identified FodMV1 as a novel member of the genus *Mitovirus* in the family *Narnaviridae*. Mitoviruses are characterized by replicating within the mitochondria of the host. According to this, the genome of FodMV1 presents a series of characteristics common to the rest of mitoviruses, as are a high percentage of A+U (58.8%), and the presence of a number of UGA codons that encode the aa tryptophan rather than acting as stop codons as in the universal genetic code. Also, the 5'- and 3'- UTR regions of FodMV1, like other mitoviruses, can be folded into potentially stable stem-loop structures. Results from phylogenetic analyses place FodMV1 in a different clade than the rest of mitoviruses described in *Fusarium* spp.

Incidence of FodMV1-infections is relatively high. Of particular interest is the fact that FodMV1 has been detected infecting *Fod* isolates from Spain and Colombia. The presence of the same mitovirus species infecting fungal strains from two geographical areas so far away could be explained by the dispersion of the viral infection through the commercialization of infected carnation cuttings between both countries.

### Acknowledgements

This research was supported by Grants AGL 2013-48980-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and AGL 2016-80048-R from the Spanish Ministry of Science and Innovation, co-funded by the European Union (FEDER funds).

## *Conclusiones*



1. El análisis mediante microscopia laser confocal, utilizando dos cepas isogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, infectada y no infectada con el micovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Virus 1 (FodV1), demuestra que la infección por FodV1 produce una disminución en la velocidad y una restricción en la distribución espacial de la colonización fúngica en el interior de la planta.
2. El micovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Virus 1 presenta una baja incidencia en la colección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* de un total de 221 aislados fúngicos obtenidos en su misma área geográfica. Este dato podría sugerir una baja eficiencia en su transmisión.
3. Un nuevo micovirus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* hipovirus 2 (FodHV2), ha sido identificado infectando un aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* procedente de Marruecos. La organización genómica, la presencia de determinados motivos conservados, y los análisis filogenéticos basados en alineamientos múltiples, identifican a FodHV2 como un nuevo miembro de la familia *Hypoviridae*, y lo sitúan agrupado con los miembros del aún no aprobado género *Betahipovirus*.
4. El genoma de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* hipovirus 2 tiene una longitud de 9,444 pb excluyendo la cola poli(A), y un único marco abierto de lectura que codifica una poliproteína. Esta poliproteína contiene 3 dominios altamente conservados de UDP glucosa/esterol glucosiltransferasa, una polimerasa dependiente de ARN, y una ARN helicasa viral. Además, se han identificado tres residuos de cisteína, histidina, y glicina en el extremo N-terminal, que podrían representar el sitio catalítico de una papain like-proteasa.
5. El análisis comparado de dos cepas isogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, infectada y no infectada con FodHV2, muestra que este hipovirus no tiene efecto sobre el crecimiento vegetativo, la conidiación, ni la virulencia de su aislado hospedador.

6. El segundo micovirus identificado en esta tesis es *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* mitovirus 1 (FodMV1), detectado en un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* procedente de Colombia. FodMV1 es un nuevo miembro del género *Mitovirus* en la familia *Narnaviridae*.
7. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* mitovirus 1 posee un genoma de 2,313 pb, en el que se ha identificado un único ORF que codifica una RdRp viral. FodMV1 presenta características comunes al resto de mitovirus derivadas de su replicación en la mitocondria, como son una alta concentración de A+U y la presencia de un número codones UGA, que codifican el aminoácido triptófano en vez de una señal de 'stop'.
8. Los análisis filogenéticos sitúan a FodMV1 en un clado separado del resto de mitovirus descritos en otras especies de *Fusarium*, lo que lo señala como el más diferente al resto de mitovirus descritos en este género fúngico.
9. FodMV1 parece tener una alta incidencia, ya que se ha identificado infectando a otros 22 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. Entre estos aislados infectados existen aislados procedentes de España y Colombia. La presencia del mismo mitovirus en aislados de zonas geográficas tan separadas sugiere una dispersión de la infección viral a través de la comercialización de esquejes de clavel entre ambos países.



## *Referencias bibliográficas*

Adams M. J., Candresse T., Hammond J., Kreuze J. F., Martelli G. P., Namba S., et al. (2011). Family: alphaflexiviridae, Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses, eds A. King, E. Lefkowitz, M. J. Adams, and E. B. Carstens (Amsterdam: Elsevier), 904–919.

Allen T. D. and Nuss D. L. (2004). Specific and common alterations in host gene transcript accumulation following infection of the chestnut blight fungus by mild and severe hypoviruses. *J Virol.* 78(8), 4145-4155.

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.

Alves-Santos F. M., Ramos B., García-Sánchez M. A., Eslava A. P. and Díaz-Mínguez J. M. (2002a). A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology.* 92(3), 237-244.

Alves-Santos F. A., Cordeiro-Rodrigues L., Sayagués J. M., Martín-Domínguez R., García-Benavides P., Crespo M. C., et al. (2002b). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathol.* 51, 605–611. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00745.

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. (1982). Biological control of chestnut blight. *Science* 215, 466-471

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. (1995). La fusariosis del clavel en Galicia. Estudio crítico acerca de los patotipos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en las comunidades de Galicia y Murcia. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. 292 pp.

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.

Aoki N, Moriyama H, Kodama M, Arie T, Teraoka T, Fukuhara T.(2009). A novel micovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. *Virus Res*. 140, 179–187. doi:10.1016/j.virusres.2008.12.0037

Arbeláez G. (1993). Las enfermedades vasculares del clavel en Colombia y en el mundo. *Agronomía Colombiana*. 2. 12- 18. (Agron. colomb., Volumen 10, Número 1, p. 12-18, 1993. ISSN electrónico 2357-3732. ISSN impreso 0120-9965.)

Arjona-Lopez J. M., Telengech P., Jamal A., Hisano S., Kondo H., Yelin M. D., Arjona-Girona I., Kanematsu S., Lopez-Herrera C. J., and Suzuki N. (2018). Novel, diverse RNA viruses from Mediterranean isolates of the phytopathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*: insights into evolutionary biology of fungal viruses. *Environ. Microbiol*. 20, 1464–1483. doi:10.1111/1462-2920.14065.

Azhar A, Mu F, Huang H, Cheng J, Fu Y, Hamid MR, Jiang D, Xie J.(2019). A novel RNA virus related to sobemoviruses confers hypovirulence on the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Viruses*. 11(8). Pii, E759. doi: 10.3390/v11080759.

Baayen R.P., van Dreven F., Krijger M. C., Waalwijk C. (1997). Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp.*dianthi* and *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*. *Eur J Plant Pathol*. 103, 395–408.

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.

Baker R., Hanchey P., and Dottarar S. D. (1978). Protection of carnation against *Fusarium* stem rot fungi. *Phytopathology*. 68(10),1495-1501.

- Ben-Yephet Y., Reuven M., and Shtienberg D. (1997). Complete resistance by carnation cultivars to Fusarium wilt induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* race 2. *Plant Dis.* 81(7), 777-780.
- Biella S., Smith M. L., Aist J. R., Cortesi P., and Milgroom M. G. (2002). Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proc. Biol. Sci.* 269, 2269–2276. doi:10.1098/rspb.2002.2148.
- Bissegger 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.
- Booth, C. (1970). *Fusarium oxysporum*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *CMI.* 211,1-2
- Border D. J. (1972). Electron microscopy of cells of *Saccharomyces cerevisiae* infected with double stranded RNA viruses from *Aspergillus niger* and *Penicillium stoloniferum*. *Nature New Biol.* 236, 87–88. doi:10.1038/newbio236087a0.
- Buck K.W., Lhoas P.,and Border D.J., (1973). Virus panicles in yeast. *Biochem. Sac. Tran.* I, 1141-1142.
- Buck, K.W. (1996). Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv. Virus Res.* 47, 159–251.
- Buck K.W., Brasier C.M., (2002). Viruses of the Dutch elm disease fungus. In: Tavantzis,S.M. (Ed.), *dsRNA Genetic Elements: Concepts and Applications in Agriculture, Forestry and Medicine.* CRC Press LCC, FL, USA, 165–190.
- Cai G., Gale L. R., Schneider R. W., Kistler H. C., Davis R. M., Elias K. S., and Miyao E. M. (2003). Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a

single site in California. *Phytopathology* 93, 1014–1022. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.8.1014.

Castro M., Kramer K., Valdivia L., Ortiz S., and Castillo A. (2003). A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol.* 228, 87–91.

Caten C. E. (1972). Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *J. Gen. Microbiol.* 72, 221–229. doi:10.1099/00221287-72-2-221.

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.

Chen X., He H., Yang X., Zeng H., Qiu D., Guo L. (2016). The complete genome sequence of a novel *Fusarium graminearum* RNA virus in a new proposed family within the order Tymovirales. *Arch. Virol.* 161, 2899–2903, doi:10.1007/s00705-016-2961-1.

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. *J. Virol.* 83, 12801–12812. doi:10.1128/JVI.01830-09.

Chiba S., Castón J. R., Ghabrial S. A., Suzuki N., and Ictv Report Consortium (2018). ICTV virus taxonomy profile: quadriviridae. *J. Gen. Virol.* 99, 1480–1481. doi:10.1099/jgv.0.001152.

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.



Choi G. H., Dawe A. L., Churbanov A., Smith M. L., Milgroom M. G., and Nuss D. L. (2012). Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*. 190, 113–127. doi:10.1534/genetics.111.133983.

Cho W. K., Yu J., Lee K. M., Son M., Min. K., Lee Y.W. and Kim K.H. (2012). Genome-wide expression profiling shows transcriptional reprogramming in *Fusarium graminearum* by *Fusarium graminearum* virus 1-DK21 infection. *BMC Genomics*. 13, 173. doi: 10.1186/1471-2164-13-173.

Choi G. H., Dawe A. L., Churbanov A., Smith M. L., Milgroom M. G. and Nuss D. L. (2012). Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*. 190(1), 113-127. doi: 10.1534/genetics.111.133983.

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.

Cook S.; Chung B.Y.; Bass D.; Moureau G.; Tang S.; McAlister E.; Culverwell C.L.; Glücksman E.; Wang H.; Brown T.D.; et al.(2013). Novel virus discovery and genome reconstruction from field RNA samples reveals highly divergent viruses in dipteran hosts. *PLoS ONE*. 8, e80720. doi:10.1371/journal.pone.0080720.

Cortesi P., McCulloch C. E., Song H., Lin H. and Milgroom M. G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159(1), 107-118.

Cottet L., Potgieter C. A., Castro M. E., and Castillo A. (2019). Molecular characterization of a new botybirnavirus that infects *Botrytis cinerea*. *Arch. Virol.* 164, 1479–1483. doi:10.1007/s00705-019-04184-2.

Covelli L., Kozlakidis Z., Di Serio F., Citir A., Açikgöz S., Hernández C., Ragozzino A., Coutts R. H. A., and Flores R. (2008). Sequences of the smallest double-stranded RNAs associated with cherry chlorotic rusty spot and *Amasya* cherry diseases. *Arch. Virol.* 153, 759–762. doi:10.1007/s00705-008-0039-4.

Czymmek K. J., Fogg M., Powell D. H., Sweigard J., Park S. Y. and Kang S. (2007). In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the Arabidopsis root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol.* 44(10), 1011-1023.

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.

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.

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.

Dawe A.L. y Nuss D.L. Hypovirus molecular biology: from Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus transmission (2013) *Adv. Virus Res.* 86, 109-147.

Deakin G., Dobbs E., Bennett J. M., Jones I. M., Grogan H. M., and Burton K. S. (2017). Multiple viral infections in *Agaricus bisporus*. Characterisation of 18 unique RNA viruses and 8 ORFans identified by deep sequencing. *Sci. Rep.* 7, 2469. doi:10.1038/s41598-017-01592-9.

Demmink J.F. Baayen R. P. y Sparnaaij L. D. (1989). Evaluation of the virulence of races 1, 2, and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation. *Euphytica*, 42, 55-63.

Deng F.; Xu R.; Boland G. J. (2003). Hypovirulence-associated double-stranded RNA from *Sclerotinia homoeocarpa* is conspecific with *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a-Ld. *Phytopatholog.* 93, 1407-1414, doi:10.1094/PHYTO.2003.93.11.1407.

Dobinson K. F., Grant S. J. and Kang S. (2004). Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Curr Genet.* 45(2), 104-110.

Enebak S. A., MacDonald W. L., Hillman B. I. (1994). Effect of dsRNA associated with isolates of *Cryphonectria parasitica* from the central Appalachians and their relatedness to other dsRNAs from North America and Europe. *Phytopathology.* 84, 528–534. doi:10.1094/Phyto-84-528

Esser K. Heterogenic incompatibility in fungi. (2006). In Kues U, Fischer R, editors. *The Mycota. I. Growth, differentiation and sexuality.* Springer-Verlag. 141–165

Fahima T, Kazmierczak P, Hansen DR, Pfeiffer P, Van Alfen NK. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Virology.* 1993;195: 81–89. doi:10.1006/viro.1993.1348

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.

Fourie G., Steenkamp E.T., Ploetz R.C., Gordon T.R., y Viljoen A. (2011). Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 533–542.

Fulbright D. W. (1984). Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. *Phytopathology.* 74, 722-724

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 Hortic.* 71:97-101.

Garibaldi A. (1978). Fungal and bacterial diseases on carnation and gerbera. proceedings of the Eucarpia meeting on carnation and gerbera. Alassio, Italia. Pp 69-88.

Garibaldi, A. (1978). Susceptibility of carnation to Italian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *F. oxysporum* var. *redolens*. Proceedings of the Eucarpia meeting on carnation and gerbera. Alassio, Italia. Pp 69-88

Garibaldi, A. (1981). Ulteriori ricerche sulla specializzazione biologica di *Fusarium oxysporum* Schlecht, f. sp. *dianthi* (Prill, et Del.) Snyd. et Hans. *Rivista di ortoflorofrutticoltura 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 ortoflorofrutticoltura 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. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes.* 16(1), 119-131. doi: 10.1023/a:1007966229595

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, 353-384.

Ghabrial SA, Nibert ML, Maiss E, Lesker T, Baker TS, Tao YJ. (2012). Partitiviridae, p 523–534. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (ed), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Ghabrial S. A., Caston J. R., Jiang D., Nibert M. L. and Suzuki N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*. 479-480, 356-368.

Ghabrial S. A., Castón J. R., Coutts R. H. A., Hillman B. I., Jiang D., Kim D.-H., Moriyama H., and Ictv Report Consortium (2018). ICTV virus taxonomy profile: chrysoviridae. *J. Gen. Virol.* 99, 19–20. doi:10.1099/jgv.0.000994.

Gilbert K. B., Holcomb E. E., Allscheid R. L., Carrington J. C. (2019). Discovery of new mycoviral genomes within publicly available fungal transcriptomic datasets; Preprint repository BioRxiv. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/510404>. (Accessed Jan 3, 2019).

Gohara D.W., Crotty S., Arnold J. J., Yoder J. D., Andino R., Cameron C. E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs A and B. *The J. of Biologic. Chemistry*. 275(33), 25523–32. doi:10.1074/jbc.M002671200

Gold S. E., Paz Z., García-Pedrajas M. D. and Glenn A. E. (2017). Rapid Deletion Production in Fungi via Agrobacterium Mediated Transformation of OSCAR Deletion Constructs. *J Vis Exp*. 124,e55239. doi: 10.3791/55239.

Gómez-Lama Cabanás C., Valverde-Corredor A., and Pérez-Artés 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 Pérez-Artés E. (2014). New evidence of intra-race diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* populations based on Vegetative Compatibility Groups. *Eur. J. Plant Pathol.* 139:445–451. doi 10.1007/s10658-014-0412-y.

Griffin G. J., and Elkins J. R. (1986). Chestnut blight. in: roan., M. K., Griffin G. J., Elkins J. R. (Eds.), Chestnut blight, other endothia diseases, and the genus *Endothia*. 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.

Hansen J. L., Long A. M., Schultz S. C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure.* 5(8), 1109–22. doi:10.1016/S0969-2126(97)00261-X.

Hao F., Ding T., Wu M., Zhang J., Yang L., Chen W., and Li G. (2018). Two Novel Hypovirulence-Associated Mycoviruses in the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*: Molecular Characterization and Suppression of Infection Cushion Formation. *Viruses.* 10. doi:10.3390/v10050254.

Harling R., Taylor G.S., Matthews P. and Arthur A.E. (1978). The effect of temperature on symptom expression and colonization in a resistant and susceptible carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianti* J. *Phytopathology* 121, 103-117.

He H., Chen X., Li P., Qiu D., and Guo L. (2018). Complete genome sequence of a *Fusarium graminearum* double-stranded RNA virus in a newly proposed family, *Alternaviridae*. *Genome Announc.* 6. doi:10.1128/genomeA.00064-18.

Heaton L., and Leslie J. (2004). Double-stranded RNAs associated with *Fusarium proliferatum* mitochondria. *Mycol Progress.* 3(3), 193-198.

Hillman B. I., Heaton L. A., Hunter B. G., Modrell B., Jackson A. O. (1990). Structure of the gene encoding the M1 protein of sonchus yellow net virus. *Virology.* 179, 201–207. doi: 10.1016/0042-6822(90)90289-4.

Hillman B. I., Tian Y., Bedker P. J., Brown M. P. (1992). A north-american hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with european isolate-related dsRNA. *J. Gen. Virol.* 73, 681-686. doi: 10.1099/0022-1317-73-3-681.

Hillman B. I., Halpern B.T., Brown M. P. (1994). A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology*. 201, 241–250. doi:10.1006/viro.1994.1289.

Hillman B. I., Foglia R., Yuan W. (2000). Satellite and defective RNAs of Cryphonectria hypovirus 3-grand haven 2, a virus species in the family Hypoviridae with a single open reading frame. *Virology*. 276, 181–189. doi:10.1006/viro.2000.0548.

Hillman B. I., and Suzuki N. (2004). Viruses of the chestnut blight fungus, Cryphonectria parasitica. *Adv.Virus Res.* 63:, 423-472.

Hillman B.I., Esteban R., (2011). Narnaviridae. In King, A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, pp. 1055–1060.

Hillman B.I.; Cai G. (2013)The family Narnaviridae: Simplest of RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 86. 149–176.

Hollings M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*. 196, 962.

Hong Y., Cole T.E., Brasier C.M., Buck K.W. (1998). Evolutionary relationships among putative RNA-dependent RNA polymerases encoded by a mitochondrial viruslike RNA in the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*, by other viruses and virus-like RNAs and by the Arabidopsis mitochondrial genome. *Virology* 246 (1), 158–169.

Hong Y., Dover S.L., Cole T.E., Brasier C.M., Buck K.W. (1999). Multiple mitochondrial viruses in an isolate of the Dutch elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*. *Virology*. 258, 118–127.

Horn F, Linde J, Mattern DJ, Walther G, Guthke R, Brakhage AA, et al. (2015) Draft genome sequence of the fungus *Penicillium brasilianum* MG11. *Genome Announc.*3. doi:10.1128/genomeA.00724-15

Howitt R. L., Beever R. E., Pearson M. N., Forster R. L. (2001). Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like' viruses. *The J. Gen. Virol* 82, 67–78. doi:10.1099/0022-1317-82-1-67. PMID11125160.

Howitt R. L. J., Beever R. E., Pearson M. N., Forster R. L. S. (2006) Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, Botrytis virus X, reveals high amino acid identity to genes from plant “potex-like” viruses. *Arch. Virol.* 151, 563–579. doi:10.1007/s00705-005-0621-y.

Hu Z., Wu S., Cheng J., Fu Y., Jiang D., Xie J. (2014). Molecular characterization of two positive-strand RNA viruses co-infecting a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology.* 464–465. 450–459. doi:10.1016/j.virol.2014.07.007.

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.

Hulvey J, Popko JT Jr, Sang H, Berg A, Jung G.(2012). Overexpression of ShCYP51B and ShatrD in *Sclerotinia homoeocarpa* isolates exhibiting practical field resistance to a demethylation inhibitor fungicide. *Appl Environ Microbiol.* 78, 6674–6682. doi:10.1128/AEM.00417-12.

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. *J. Biol. Chem.* 264, 6716–6723.

Ikeda Y.; Shimura H.; Kitahara R.; Masuta C.; Ezawa T. (2012). A novel virus-like double-stranded RNA in an obligate biotroph arbuscular mycorrhizal fungus: A hidden player in mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1005–1012.

Jacob-Wilk D, Turina M, Van Alfen NK.(2006). Mycovirus cryphonectria hypovirus 1 element cofractionate with trans-Golgi network membranes of the fungal host *Cryphonectria parasitica*. *J Virol.* 80, 6588–6596.



doi:10.1128/JVI.02519-05

Jiménez-Fernández D., Landa B. B., Kang S., Jiménez-Díaz R. M. and Navas-Cortes J. A. (2013). Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races. *PLoS One*. 8(4), e61360.

Jiāng 姜道宏, D., Ayllón M. A., Marzano S.-Y. L., and Ictv Report Consortium (2019). ICTV virus taxonomy profile: mymonaviridae. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/jgv.0.001301.

Kanematsu S., Arakawa M., Oikawa Y., Onoue M., Osaki H., H. Nakamura H., Ikeda K., Kuga-Uetake Y., Nitta H., Sasaki A., Suzaki K., Yoshida K., Matsumoto N. (2004). A reovirus causes hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. *Phytopathology*. 94, 561-568

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.

Kamaruzzaman M., He G., Wu M., Zhang J., Yang L., Chen W., and Li G. (2019). A novel partitivirus in the hypovirulent isolate QT5-19 of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Viruses*. 11. doi:10.3390/v11010024.

Katan T., Zamir D., Sarfatti M., Katan J. (1991). Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*. 81, 255-262. doi:10.1094/Phyto-81-255v

Kellner R, Bhattacharyya A, Poppe S, Hsu TY, Brem RB, Stukenbrock EH. (2014). Expression profiling of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveals genomic patterns of transcription and host-specific regulatory programs. *Genome Biol Evol*. 6, 1353–1365. doi:10.1093/gbe/evu101

Khalifa M.E., Pearson M.N. (2014). Characterisation of a novel hypovirus from *Sclerotinia sclerotiorum* potentially representing a new genus within the Hypoviridae. *Virology*. 464–465, 441–449. doi:10.1016/j.virol.2014.07.005.

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, 249–256.

Kim J-M, Park J-A, Park S-M, Cha B-J, Yang M-S, Kim D-H. (2010) Nucleotide sequences of four segments of chrysovirus in Korean *Cryphonectria nitschkei* BS122 strain. *Virus Genes*. 41: 292–294. doi:10.1007/s11262-010-0495-2

Koloniuk I., El-Habbak M.H., Petrzik K., Ghabrial S.A. (2014). Complete genome sequence of a novel hypovirus infecting *Phomopsis longicolla*. *Arch Virol*. 159, 1861–1863. doi:10.1007/s00705-014-1992-8v.

Koonin E.V., Choi G.H., Nuss D.L., Shapira R., Carrington J.C. (1991). Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88, 10647–10651. doi:10.1073/pnas.88.23.10647.

Kozlakidis Z, Herrero N, Ozkan S, Kanhayuwa L, Jamal A, Bhatti MF, et al (2013). Sequence determination of a quadripartite dsRNA virus isolated from *Aspergillus foetidus*. *Arch Virol*. 158: 267–272. doi:10.1007/s00705-012-1362-3.

Lagopodi A. L., Ram A. F., Lamers G. E., Punt P. J., Van den Hondel C. A., Lugtenberg B. J. and Bloemberg G. V. (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol Plant Microbe Interact*. 15(2), 172-179.

Lakshman D. K.; Jian J.; 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 6425–6429. doi:10.1073/pnas.95.11.6425.

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): e100989.

Lemus-Minor C. G., Canizares 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. doi: 10.1007/s00705-015-2509-9.

Lemus-Minor C. G., Canizares 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.* 108(8): 957-963. doi: 10.1094/PHYTO-06-17-0200-R.

Lemus-Minor C. G., Cañizares M. C., García-Pedrajas M. D. and Pérez-Artés E. (2019). Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1. *Eur. J. Plant Pathol.* 153: 645-650. doi: 10.1007/s10658-018-1554-0

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.

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.

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 C., Chen S., Zuo C., Sun Q., Ye Q., Yi G., et al. (2011). The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 327–340. doi: 10.1007/s10658-011-9811-5.

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., Guo L. (2015). Molecular characterization of a novel hypovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology*. 481, 151–160. doi:10.1016/j.virol.2015.02.047.

Li K.; Zheng D.; Cheng J.; Chen T.; Fu Y.; Jiang D.; Xie J. (2016) Characterization of a novel *Sclerotinia sclerotiorum* RNA virus as the prototype of a new proposed family within the order Tymovirales. *Virus Res.* 219, 92–99, doi:10.1016/j.virusres.2015.11.019.

Li P., Chen X., He H., Qiu D., Guo L. (2017). Complete genome sequence of a novel hypovirus from the phytopathogenic fungus *Fusarium langsethiae*. *Genome Announc.* 5. doi:10.1128/genomeA.01722-16.

Li H., Bian R., Liu Q., Yang L., Pang T., Salaipeth L., et al. (2019). Identification of a novel hypovirulence-inducing hypovirus from *Alternaria alternata*. *Front Microbiol.* 10, 1076. doi:10.3389/fmicb.2019.01076

Li P.; Bhattacharjee P.; Wang S.; Zhang L.; Ahmed I.; Guo L.(2019). Mycoviruses in fusarium species: an update. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 257, doi:10.3389/fcimb.2019.00257.

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*. *Arch. of virology*. 158(5), 1093-1098.

Linder P., Lasko P.F., Ashburner M., Leroy P., Nielsen P.J., Nishi K., Schnier J., Slonimski P.P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature*. 337, 121-2.

Linder-Basso D., Dynek J. N., Hillman B. I. (2005). Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common hypovirus species in North America. *Virology*. 337, 192–203. doi:10.1016/j.virol.2005.03.038.

Lindergren C.C., Bang Y.N., Hirano T. (1962). Progress report in the Zymopbage. *Tran. N.Y. Acad. Sci.* 24: 540-566.

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.

Liu L., Xie J., Cheng J., Fu Y., Li G., Yi X., Jiang D.(2014). Fungal negative-stranded RNA virus that is related to bornaviruses and nyaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111, 12205–12210, doi:10.1073/pnas.1401786111.

Liu S., Xie J., Cheng J., Li B., Chen T., Fu Y., Li G., Wang M., Jin H., Wan H. and Jiang D. (2016). Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(45), 12803-12808. doi: 10.1073/pnas.1608013113.

Lü G., Guo S., Zhang H., Geng L., Martyn R. D., and Xu Y. (2013). Colonization of Fusarium wilt-resistant and susceptible watermelon roots by a green-fluorescent-protein-tagged isolate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *J. Phytopathol.*162, 228–237. doi: 10.1111/jph.12174

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.

Nuss D. L. (1996). Using hypoviruses to probe and perturb signal transduction processes underlying fungal pathogenesis. *Plant Cell*. 8, 1845–1853. doi:10.1105/tpc.8.10.1845.

Martínez-Álvarez P, Vainio EJ, Botella L, Hantula J, Diez JJ (2014) Three mitovirus strains infecting a single isolate of *Fusarium circinatum* comprise the first putative members of Narnaviridae among species of *Fusarium*. *Arch Virol* 159:2153–2155.

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. *Arch Virol.* 159(2):349-352.

Marzano S-Y. L., Hobbs H. A., Nelson B. D., Hartman G. L., Eastburn D. M., McCoppin N. K., et al. (2015). Transfection of *Sclerotinia sclerotiorum* with in vitro transcripts of a naturally occurring interspecific recombinant of *Sclerotinia sclerotiorum* hypovirus 2 significantly reduces virulence of the fungus. *J Virol.* 89, 5060–5071. doi:10.1128/JVI.03199-14.

Marzano S.-Y. L., Domier L. L. (2016) Novel mycoviruses discovered from metatranscriptomics survey of soybean phyllosphere phytobiomes. *Virus Res.* 213, 332–342, doi:10.1016/j.virusres.2015.11.002.

Marzano S. L., Nelson B. D., Ajayi-Oyetunde O., Bradley C. A., Hughes T. J., Hartman G. L., Eastburn D. M. and Domier L. L. (2016). Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. *J Virol.* 90(15), 6846-6863. doi: 10.1128/JVI.00357-16.

Melero-Vara J. M., López-Herrera C. J., Prados-Ligero A. M., Vela-Delgado M. D., Navas-Becerra J. A., 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. doi: 10.1016/j.cropro.2011.03.022.

Teresa Mier (1994) Los micovirus: partículas extracromosómicas de los hongos. un enfoque novedoso dentro de la micología. *Revista Mexicana de Micología.* 10, 161-179.

Milgroom M. G., Cortesi P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu Rev Phytopathol.* 42, 311–338. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140325.

Mizutani Y.; Abraham A.; Uesaka K.; Kondo H.; Suga H.; Suzuki N.; Chiba S. (2018). Novel mitoviruses and a unique Tymo-Like virus in hypovirulent and virulent strains of the fusarium head blight fungus, *Fusarium boothii*. *Viruses.*10, doi:10.3390/v10110584.

Moleleki N., van Heerden S.W., Wingfield M.J., Wingfield B.D. y Preisig O. (2003) Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe* RNA virus *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3952-3956.

Moriyama H, Horiuchi H, Koga R, Fukuhara T. (1999). Molecular characterization of two endogenous double-stranded RNAs in rice and their inheritance by interspecific hybrids. *J Biol Chem.* 274: 6882–6888. doi:10.1074/jbc.274.11.6882

Mu F., Xie J., Cheng S., You M. P., Barbetti M. J., Jia J., Wang Q., Cheng J., Fu Y., Chen T., et al. (2017). Virome Characterization of a Collection of *S. sclerotiorum* from Australia. *Front. Microbiol.* 8, 2540. doi:10.3389/fmicb.2017.02540.

Nahalkova J., Fatehi J., Olivain C. and Alabouvette C. (2008). Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. *FEMS Microbiol Lett.* 286(2), 152-157. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01241.x.

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.

Nelson P.E. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. p. 51-80. En M.E. Mace, A.A. Bell and e.H. Beckman (eds.). Fungal wilt diseases of plants. Academic Press. New York.

Nerva L, Silvestri A, Ciuffo M, Palmano S, Varese GC, Turina M. (2017). Transmission of *Penicillium aurantiogriseum* partiti-like virus 1 to a new fungal host (*Cryphonectria parasitica*) confers higher resistance to salinity and reveals adaptive genomic changes. *Environ Microbiol.* ;19: 4480–4492. doi:10.1111/1462-2920.13894

Nerva L.; Vigani G.; Di Silvestre D.; Ciuffo M.; Forgia M.; Chitarra W.; Turina

- M. (2019). Biological and molecular characterization of *Chenopodium quinoa* mitovirus 1 reveals a distinct sRNA response compared to cytoplasmic RNA viruses. *J. Virol.* 93.
- Nesterova G.F., Kyamer J., Soon Y.D. (1973). Virus-like particles in *Candida Iropica/is*. *Mikrobiologiya.* 43, 162-165.
- Neth J., Path P.L. (1989). Histology of roots of resistant and susceptible carnation cultivars from soil infested with *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* Baayen R.P., Van Eijk .C. and Elgersma D.M. 95, 3-13.
- Nibert M. L., Ghabrial S. A., Maiss E., Lesker T., Vainio E. J., Jiang D., and Suzuki N. (2014). Taxonomic reorganization of family Partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. *Virus Res.* 188, 128–141. doi:10.1016/j.virusres.2014.04.007.
- Nibert M.L. (2017). Mitovirus UGA(Trp) codon usage parallels that of host mitochondria. *Virology.* 507, 96–100.
- Nibert M.L., Vong M., Fugate K.K., Debat H.J. (2018). Evidence for contemporary plant mitoviruses. *Virolog.* 518, 14–24.
- Nibert M. L., Debat H. J., Manny A. R., Grigoriev I. V., De Fine Licht H. H. (2019). Mitovirus and Mitochondrial Coding Sequences from Basal Fungus *Entomophthora muscae*. *Viruses.* 11, doi:10.3390/v11040351.
- Niño-Sánchez J., Tello V., Casado-Del Castillo V., Thon M. R., Benito E. P. and Díaz-Mínguez J. M. (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front Microbiol* 6, 234. doi:10.3389/fmicb.2015.00234
- Nogawa M., Kageyama T., Nakatani A., Taguchi G., Shimosaka M., and Okazaki M. (1996). Cloning and characterization of mycovirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *Robiniae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (5), 784-788.



Nuss D. L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat Rev Microbiol.* 3, 632–642. doi:10.1038/nrmicro1206.

Oh C. S., and Hillman B. I. (1995). Genome organization of a partitivirus from the filamentous ascomycete *Atkinsonella hypoxylon*. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 6), 1461–1470. doi:10.1099/0022-1317-76-6-1461.

O'Reilly E. K., Kao C. C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology.* 252(2), 287–303. doi:10.1006/viro.1998.9463.

Osaki H.; Sasaki A.; Nomiya K.; Sekiguchi H.; Tomioka K.; Takehara T. (2015). Isolation and characterization of two mitoviruses and a putative alphapartitivirus from *Fusarium* spp. *Virus Genes.* 50, 466–473, doi:10.1007/s11262-015-1182-0.

Osaki H., Sasaki A., Nomiya K., Tomioka K. (2016). Multiple virus infection in a single strain of *Fusarium poae* shown by deep sequencing. *Virus Genes.* 52, 835–847. doi:10.1007/s11262-016-1379-x.

Osawa S., Jukes T. H., Watanabe K., and Muto A. (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* 56, 229–264.

Paquin B., Laforest M.J., Forget L., Roewer I., Wang Z., Longcore J., Lang B.F., (1997). The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* 31, 380–395.

Paz Z., García-Pedrajas M. D., Andrews D. L., Klosterman S. J., Baeza-Montanez L. and Gold S. E. (2011). One step construction of *Agrobacterium*-Recombination-ready-plasmids (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi. *Fungal Genet Biol* 48(7), 677-684. doi: 10.1016/j.fgb.2011.02.003.

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),

115-128. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x.

Pearson M. N.; Bailey A. M. (2013). Viruses of botrytis. *Adv. Virus Res.* 86, 249–272, doi:10.1016/B978-0-12-394315-6.00009-X.

Pennypacker B.W. and Nelson P.E.(1997). Histopathology of camation infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology.* 62, 1318-1326. 1972.

Polashock J.J., Bedker P.J., Hillman B.I. (1997). Movement of a small mitochondrial double-stranded RNA element of *Cryphonectria parasitica*: Ascospore inheritance and implications for mitochondrial recombination. *Mol. Gen. Genet.* 256, 566–571.

Pouralibaba H. R., Pérez-de-Luque A. and Rubiales D. (2017). Histopathology of the infection on resistant and susceptible lentil accessions by two contrasting pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. *Eur. J. Plant Pathol.* 148, 53–63.

Preisig O, Wingfield BD, Wingfield MJ. (1998). Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. *Virology.* 252, 399–406. doi:10.1006/viro.1998.9480

Prieto P., Moore G. and Shaw P. (2007) Fluorescence in situ hybridization on vibratome sections of plant tissues. *Nature Protocols.* 2, 1831–1838.

Prilleux E., y Delacroix g. (1899). La maladie des oeilletts á Antibes. *Comptes Rendus hebdomadaires des séances de l'Academie des Sieces.* 129, 744-755.

Ramos B., Alves-Santos F. M., García-Sánchez M. A., Martin-Rodrigues N., Eslava A. P. and Díaz-Mínguez J. M. (2007). The gene coding for a new transcription factor (ftf1) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet Biol.* 44(9), 864-876.

Rallo Romero L.; Fernández Escobar L., ed. (1998). *Diccionario de ciencias hortícolas.* Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. p.115. ISBN 84, 7114-818-8.

Revill P. A.; Davidson A. D.; Wright P. J. (1994). The nucleotide sequence and genome organization of mushroom bacilliform virus: a single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Virology.* 202, 904–911,

doi:10.1006/viro.1994.1412.

Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Sarmiento-Villamil J. L., Prieto P., Klosterman S. J. and García-Pedrajas M. D. (2018). Characterization of two homeodomain transcription factors with critical but distinct roles in virulence in the vascular pathogen *Verticillium dahliae*. *Mol Plant Pathol.* 19(4), 986-1004. doi: 10.1111/mpp.12584.

Sato Y., Miyazaki N., Kanematsu S., Xie J., Ghabrial S. A., Hillman B. I., Suzuki N., and Ictv Report Consortium (2019). ICTV virus taxonomy profile: megabirnaviridae. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/jgv.0.001297.

Shah U. A., Kotta-Loizou I., Fitt B. D. L., and Coutts R. H. A. (2018). Identification, molecular characterization, and biology of a novel quadrivirus infecting the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria biglobosa*. *Viruses.* 11. doi:10.3390/v11010009.

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.

Shapira R., Choi G. H., Nuss D. L. (1991). Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *EMBO J.* 10, 731–739.

Shamsi W., Sato Y., Jamal A., Shahi S., Kondo H., Suzuki N., and Bhatti M. F. (2019). Molecular and biological characterization of a novel botybirnavirus identified from a Pakistani isolate of *Alternaria alternata*. *Virus Res.* 263, 119–128. doi:10.1016/j.virusres.2019.01.006.

Sharma M., Guleria S., Singh K., Chauhan A., and Kulshrestha S. (2018). Mycovirus associated hypovirulence, a potential method for biological control of *Fusarium* species. *Virus disease.* 29, 134–140. doi: 10.1007/s13337-018-0438-4

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.* 43, 9-26.

Shi M., Lin X.D., Tian J.H., Chen L.J., Chen X., Li C.X., Qin X.C., Li J., Cao J.P., Eden J.S., et al.(2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 540, 539–543.

Shope R.E. (1953). An antiviral substance from *Penicilliumfuniculosum*. *J. Exp. Med.* 97: 601-605.

Sinden J.W., and Hauser E. (1950). Report of two new mushroom diseases. *Mushroom Sci.* 1, 96–100.

Smart C. D., Yuan W., Foglia R., Nuss D. L., Fulbright D. W., Hillman B. I. (1999). *Cryphonectria hypovirus 3*, a virus species in the family hypoviridae with a single open reading frame. *Virology*. 265, 66–73. doi:10.1006/viro.1999.0039.

Son M., Yu J., Kim K. H. (2015). *Five Questions about Mycoviruses*. *PLoS Pathog.* 11, e1005172. doi:10.1371/journal.ppat.1005172.

Suzaki K., Ikeda K., Sasaki A., Kanematsu S., Matsumoto N. y Yoshida K. (2005). *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 161-168

Suzuki N., Ghabrial S. A., Kim K-H. , Pearson M., Marzano S-Y. L., Yaegashi H., et al. (2018). ICTV virus taxonomy profile: hypoviridae. *J Gen Virol.* 99, 615–616. doi:10.1099/jgv.0.001055

Tello J. C. y Lacasa, A. (1990). *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitarias (*Fusariosis* vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Boletín Sanidad Vegetal*. Fuera de serie nº 19, 190 pp.

Upasani M. L., Gurjar G. S., Kadoo N. Y. and Gupta V. S. (2016). Dynamics of colonization and expression of pathogenicity related genes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* during chickpea vascular wilt disease progression. *PLoS One*. 11(5), e0156490. doi: 10.1371/journal.pone.0156490.

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.

Vainio E. J.; Martínez-Álvarez P.; Bezos D.; Hantula J.; Diez J. J. (2015). *Fusarium circinatum* isolates from northern Spain are commonly infected by three distinct mitoviruses. *Arch. Virol.* 160, 2093–2098, doi:10.1007/s00705-015-2462-7.

Vainio E. J., Chiba S., Ghabrial S. A., Maiss E., Roossinck M., Sabanadzovic S., Suzuki N., Xie J., Nibert M., and Ictv Report Consortium (2018). ICTV virus taxonomy profile: partitiviridae. *J. Gen. Virol.* 99, 17–18. doi:10.1099/jgv.0.000985.

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. A., Khalifa M. E., Okada R., Fukuhara T., Sabanadzovic S., and Ictv Report Consortium (2019). ICTV virus taxonomy profile: endornaviridae. *J. Gen. Virol.* 100, 1204–1205. doi:10.1099/jgv.0.00127

Velasco L., Arjona-Girona I., Ariza-Fernández M. T., Cretazzo E., López-Herrera C. (2018). A novel hypovirus species from xylariaceae fungi infecting avocado. *Front Microbiol.* 9, 778. doi:10.3389/fmicb.2018.00778.

Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The 9th Report of the ICTV (2011).

Virus Taxonomy: 2018b Release EC 50, Washington, DC, July 2018

Wang S., Kondo H., Liu L., Guo L., Qiu D. (2013). A novel virus in the family Hypoviridae from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virus Res.* 174, 69–77. doi:10.1016/j.virusres.2013.03.002.

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 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.

Wan, H., Li C., Cai L., Fang S., Zheng L., Yan F., Zhang S., and Liu Y. (2018). The complete genomic sequence of a novel botybirnavirus isolated from a phytopathogenic *Bipolaris maydis*. *Virus Genes* 54, 733–736. doi:10.1007/s11262-018-1584-x.

Wang L., He H., Wang S., Chen X., Qiu D., Kondo H., and Guo L. (2018). Evidence for a novel negative-stranded RNA mycovirus isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology.* 518, 232–240. doi:10.1016/j.virol.2018.03.008.

Wang Q., Cheng S., Xiao X., Cheng J., Fu Y., Chen T., Jiang D., and Xie J. (2019). Discovery of two mycoviruses by high-throughput sequencing and assembly of mycovirus-derived small silencing RNAs from a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Microbiol.* 10, 1415. doi:10.3389/fmicb.2019.01415.

Warnecke D., Erdmann R., Fahl A., Hube B., Muller F., Zank T., Zahringer U., Heinz E. (1999). Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 274, 13048 – 13059. doi: 10.1074/jbc.274.19.13048.

Wei 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. *Arch. Virol.* 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.

Wu M.D., Zhang L., Li G.Q., Jiang D.H., Hou M.S., Huang H.C.(2007). Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 97, 1590–1599.

Wu M., Zhang L., Li G., Jiang D., Ghabrial S.A.(200). Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology.* 406, 117–126

Wu M., Jin F., Zhang J., Yang L., Jiang D., Li, G.(2012). Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Botrytis porri*. *J. Virol.* 86, 6605–6619, doi:10.1128/JVI.00292-12.

Xiao X., Cheng J., Tang J., Fu Y., Jiang D., Baker T. S., Ghabrial S. A., Xie J. (2014). A novel partitivirus that confers hypovirulence on plant pathogenic fungi. *J. Virol.* 88, 10120–10133, doi:10.1128/JVI.01036-14.

Xie J., Wei D., Jiang D., Fu Y., Li G., Ghabrial S., et al. (2006). Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Gen Virol.* 87, 241–249. doi:10.1099/vir.0.81522-0.

Xie J., Xiao X., Fu Y., Liu H., Cheng J., Ghabrial S. A., et al. (2011). A novel mycovirus closely related to hypoviruses that infects the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology.* 418, 49–56. doi:10.1016/j.virol.2011.07.008

Xie,J., Ghabrial S.A. (2012). Molecular characterization of two mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology.* 428, 77–85.

Xie J. and Jiang D. (2014). New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annu Rev Phytopathol.* 52, 45-68.

doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-050222.

Xie J., Havens W. M., Lin Y.-H., Suzuki N., Ghabrial S. A. (2016). Reprint of “The victorivirus *Helminthosporium victoriae* virus 190S is the primary cause of disease/hypovirulence in its natural host and a heterologous host”. *Virus Res.* 219, 100–107, doi:10.1016/j.virusres.2016.05.010.

Xu Z., Wu S., Liu L., Cheng J., Fu Y., Jiang D., Xie J. (2015). A mitovirus related to plant mitochondrial gene confers hypovirulence on the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Res.* 197, 127–136.

Yaegashi H., Kanematsu S., Ito T. (2012). Molecular characterization of a new hypovirus infecting a phytopathogenic fungus, *Valsa ceratosperma*. *Virus Res.* 165, 143–150. doi:10.1016/j.virusres.2012.02.008.

Yang L., Xie L., Xue B., Goodwin PH, Quan X, Zheng C, et al. (2015). Comparative transcriptome profiling of the early infection of wheat roots by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *PLoS One.* 10, e0120691. doi:10.1371/journal.pone.0120691

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. *Arch Virol.* 154(11), 1855-1858.

Yu X., , Li B., , Fu Y., Xie J., , Cheng J., , Ghabrial S. A., Li G., , Yi X., and Jiang D. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(4), 1452-7. doi: 10.1073/pnas.1213755110.

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.

Yu X., Li B., Fu Y., Jiang D., Ghabrial S. A., Li G., Peng Y., Xie J., Cheng J., Huang J. and Yi X. (2010). A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(18), 8387-8392. doi: 10.1073/pnas.0913535107.

Yu L., Sang W., Wu M.-D., Zhang J., Yang L., Zhou Y.-J., Chen W.-D., Li G.-Q.



(2015). Novel hypovirulence-associated RNA mycovirus in the plant-pathogenic fungus *Botrytis cinerea*: molecular and biological characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2299–2310, doi:10.1128/AEM.03992-14.

Yuan W., Hillman B. I. (2001). In vitro translational analysis of genomic, defective, and satellite RNAs of Cryphonectria hypovirus 3-GH2. *Virology.* 281, 117–123. doi:10.1006/viro.2000.0806.

Zamora P., Martín A. B., Dueñas M., San Martín R., and Diez J. J. (2015). Cryphonectria parasitica Isolates of the same vegetative compatibility type display different rates of transfer of CHV1 hypovirus. *Eur. J. Plant Pathol.* doi:10.1007/s10658-015-0727-3.

Zhai L., Yang M., Zhang M., Hong N., Wang G. (2019). Characterization of a botybirnavirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*. *Viruses.* 11, doi:10.3390/v11030266.

Zheng L., Zhang M., Chen Q., Zhu M., and Zhou E. (2014). A novel mycovirus closely related to viruses in the genus Alphapartitivirus confers hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Virology.* 456–457, 220–226. doi:10.1016/j.virol.2014.03.029.

Zheng L., Shu C., Zhang M., Yang M., and Zhou E. (2019). Molecular characterization of a novel endornavirus conferring hypovirulence in rice sheath blight fungus *Rhizoctonia solani* AG-1 IA strain GD-2. *Viruses.* 11. doi:10.3390/v11020178.

Zvirin T., Herman R., Brotman Y., Denisov Y., Belausov E., Freeman S., et al. (2010). Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1·2. *Plant Pathol.* 59, 576–585. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02225.x.