

**ANA PAULA OLIVEIRA DE BARROS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE  
VÍRUS ASSOCIADOS A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B277d  
2016  
Barros, Ana Paula Oliveira de, 1978-  
Detecção e caracterização molecular e biológica de vírus  
associados a fungos fitopatogênicos / Ana Paula Oliveira de  
Barros. – Viçosa, MG, 2016.  
xii, 71f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. *Sclerotinia sclerotiorum*.  
3. Mofo (Botânica). 4. Vírus - Diversidade. 5. Vírus -  
Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 632.4

ANA PAULA OLIVEIRA DE BARROS

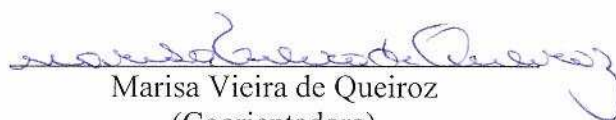
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE  
VÍRUS ASSOCIADOS A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

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

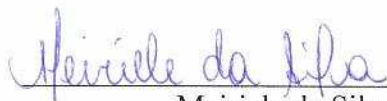
APROVADA: 15 de setembro de 2016.



Elvira Fiallo-Olivé



Marisa Vieira de Queiroz  
(Coorientadora)



Meiriele da Silva



Renan de Souza Cascardo



Poliane Alfenas Zerbini  
(Orientadora)

## **BIOGRAFIA**

ANA PAULA OLIVEIRA DE BARROS, filha de José Ramos de Barros e Maria Aparecida Oliveira de Barros, nasceu em Recife, Pernambuco, no dia 16 de março de 1978. Em 2005 iniciou o curso de Engenharia agrônômica na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Em agosto de 2010 ingressou no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia pela mesma universidade submetendo-se a defesa de dissertação em julho de 2012. Em agosto de 2012 mudou-se para cidade de Viçosa, estado de Minas Gerais onde ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola em nível de Doutorado submetendo-se a defesa de tese em 15 de setembro de 2016.

Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos. Provérbios 16:9

## AGRADECIMENTOS

Ao meu bondoso Deus, por todas as maravilhas que me tem feito.

Aos meus pais, José Ramos e Maria Aparecida, que sempre primaram pela minha educação e me apoiaram em todas as minhas decisões.

Aos meus irmãos, André e Andrea Carla, minha cunhada Vanessa e meu querido sobrinho Davi, pelo amor, companheirismo e amizade.

À toda minha família, primos, tios pelo cuidado constante, apesar de longe nunca perdemos contato.

À minha amada “família Memorial”, igreja que me acolheu em Viçosa e que me sustentou em oração, com carinho especial que só uma verdadeira família pode dar.

À minha querida amiga Luciana, muito mais que amiga, foi mãe e irmã, sempre companheira, alguém que me fez perceber que existe amizade verdadeira e que me deu forças nos momentos difíceis e mostrou que em Deus podemos tudo alcançar.

Ao Sr. Lucas, D. Ivone pelo carinho e cuidado e constante apoio em todos os momentos.

A todos dos Laboratórios de Virologia Vegetal e Molecular, pelo apoio, troca de conhecimentos, e colaboração.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Industrial, André Xavier, Fernanda Pereira, Fernanda Prieto, Flávia, Juliana, Luan, Patrícia, Rafael, Renan e Thamylyes, pelos momentos compartilhados, aprendizado, e cooperativismo.

Aos técnicos, Mara e Paulo sempre acessíveis quanto ao uso de equipamentos do laboratório de Patologia Florestal

Aos amigos que Viçosa me apresentou, Thalita Avelar, Leonardo Corrêa, Renata Oliveira, Elsa pelas experiências compartilhadas e parcerias nas pesquisas.

A todos dos colegas dos laboratórios de Genética de micro-organismos e Fisiologia pela parceria, amizade e excelente convívio.

A minha orientadora, Professora Poliane Alfenas Zerbini pela orientação, apoio e confiança e ensinamentos transmitidos durante este curso.

Aos professores, Marisa Vieira, Murilo Zerbini, Olinto, Jorge Rezende (ESALQ) , Valmir Duarte e José Eustaquio, pela valiosa colaboração, suporte material, críticas e sugestões.

Aos professores, Elliot Watanabe Kitajima e Francisco Andre Ossamu Tanaka pela realização e apoio em análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, junto ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA,ESALQ/USP).

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV pelo suporte e infraestrutura, bem como aos técnicos Nívea, Edvaldo Barros e Pedro Vidigal pela colaboração na realização de algumas análises.

Ao Núcleo de microscopia e Microanálises da UFV pela oportunidade de realização das análises de microscopia eletrônica de transmissão, especialmente aos técnicos Gilmar e Karla pela valiosa colaboração e oportunidade de aprendizado.

Às secretárias Leticia e Sandra e à ex-secretária Nilcéa sempre muito atenciosas pelas informações e serviços prestados.

Aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pelo suporte oferecido na realização deste curso.

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio institucional e oportunidade oferecida.  
Enfim agradeço a todos que foram importantes no decorrer deste curso e que direta  
ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO I.....	12
DIVERSIDADE DE MICOVÍRUS INFECTANDO DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS .....	12
INTRODUÇÃO .....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
Isolados fúngicos e condições de cultivo.....	18
Extração, quantificação e eletroforese de dsRNA.....	19
Purificação viral .....	19
Isolamento RNA viral .....	20
Espectrometria de massas de proteínas estruturais <i>de Chalara elegans</i> isolado CCF119..	21
RESULTADOS .....	21
Presença de dsRNA em fungos fitopatogênicos .....	21
Análise genômica e estrutural do micovírus presente em <i>C. elegans</i> isolado CCF119.....	22
DISCUSSÃO .....	23
AGRADECIMENTOS.....	25
REFERÊNCIAS.....	25
Tabela 1. ....	29
LEGENDA DAS FIGURAS .....	30
CAPÍTULO II.....	37
MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MITOVIRUS INFECTING <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	37
ABSTRACT .....	38
INTRODUCTION .....	39
MATERIALS AND METHODS.....	41
Obtaining fungal and culture conditions .....	41
Detection and isolation of dsRNAs .....	41
Sequencing, <i>de novo</i> assembly and bioinformatic analysis .....	42
Phylogenetic analysis .....	42
Biological properties .....	43
Cytological analysis of fungal hyphae by transmission electron microscopy (TEM).....	43

Qualitative determination of total acids production and quantification of oxalic acid.....	44
Statistical analysis .....	45
RESULTS.....	45
dsRNA banding patterns.....	45
Sequencing and virus identification .....	45
Genome organization and Sequence determination .....	46
Predicted secondary structures of the 5' and 3' UTRs .....	47
Multiple alignments of RdRps and phylogenetic analysis.....	47
Biological properties of strains Ss24 and Ss24MVF.....	48
Cytologic effect of the infection by mitovirus .....	48
Qualitative determination of total acids production and quantification of oxalic acid.....	49
DISCUSSION.....	49
ACKNOWLEDGEMENTS.....	53
REFERENCES .....	54
FIGURES LEGENDS .....	58
FIGURES .....	61
SUPPLEMENTARY INFORMATION .....	68
CONCLUSÕES .....	71

## RESUMO

BARROS, Ana Paula Oliveira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2016. **Detecção e caracterização molecular e biológica de vírus associados a fungos fitopatogênicos.** Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini. Coorientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Francisco Murilo Zerbini.

Os fungos fitopatogênicos são um grupo importante de microrganismos responsáveis por perdas significativas na agricultura em todo o mundo. A capacidade que alguns apresentam de infectar todas as partes da planta, bem como a capacidade de sobrevivência no solo os torna um importante grupo de fitopatógenos. O controle de doenças causadas por fungos geralmente requer medidas que utilizam tratamentos químicos, o que gera um impacto ambiental e à saúde humana. Micovírus são vírus que infectam fungos. Alguns micovírus apresentam capacidade de tornar seus hospedeiros hipovirulentos e ainda são capazes de transferir essa propriedade a outros isolados compatíveis. O controle de fungos fitopatogênicos com micovírus constitui uma alternativa que pode reduzir o uso do controle químico. Além disso, pode ser eficaz contra doenças para as quais não há controle químico nem plantas resistentes disponíveis. Assim o objetivo desse trabalho foi acessar a diversidade de micovírus associada a fungos fitopatogênicos e estudar o impacto desses vírus sobre a fisiologia dos hospedeiros. Foi investigada a presença de micovírus em isolados fúngicos obtidos em coleções de culturas, feira livre e também do campo em plantas sintomáticas. Dos 42 isolados fúngicos analisados, 11 (26%) continham dsRNA. Todos com distintos padrões de dsRNA, observados por eletroforese em gel de agarose. Em um isolado de *Chalara elegans*, agente causal da podridão negra em raiz, foi detectado presença de partículas icosaédricas com 33 nanômetros de diâmetro. SDS-PAGE a partir do purificado viral revelou a presença de três proteínas estruturais com massa molecular estimada em 38, 40 e 45 kDa. Também foi realizada a caracterização molecular e biológica de um micovírus obtido a partir do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* isolado Ss24, agente causal do mofo branco, doença presente em diversas espécies de plantas. O genoma possui 2.700 nucleotídeos e apresenta uma única sequência aberta de leitura (ORF) que codifica uma RNA polimerase dependente de RNA, com domínios conservados na superfamília de RdRps de mitovírus, um grupo de vírus que replica em mitocôndrias das células hospedeiras. Análises filogenéticas indicam que o vírus detectado é um novo

membro do gênero *Mitovirus*. Análise do perfil de bandas de dsRNA obtido a partir do isolado Ss24 sugere que há uma co-infecção por mais de um micovírus. Uma linhagem isogênica obtida por reprodução sexuada do isolado Ss24 revelou um padrão diferente do seu parental. Ambos, parental (Ss24) e isolado isogênico (Ss24MVF) foram comparados quanto produção de escleródios, ácidos totais, ácido oxálico, taxa de crescimento, morfologia e pigmentação das colônias e patogenicidade em plantas de *Phaseolus vulgaris*, *Capsicum annuum* e *Nicotiana benthamiana*. Os resultados revelaram que o isolado Ss24 foi severamente debilitado em todas as características fisiológicas analisadas quando comparado com o isolado Ss24MVF. Maior concentração de mitocôndrias nas hifas também foi observado no isolado Ss24. Em conjunto estes resultados confirmam que os vírus que infectam fungos estão distribuídos nas diferentes espécies de fungos. A presença de determinados segmentos de dsRNA pode conduzir o fenótipo da hipovirulência em fungos. Uma análise mais aprofundada sobre as características destes micovírus podem levar ao desenvolvimento de ferramentas para estudos sobre os mecanismos de patogenicidade dos fungos, bem como a utilização desses vírus como agentes de controle biológico.

## ABSTRACT

BARROS, Ana Paula Oliveira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2016. **Detection and molecular and biological characterization of virus associated to phytopathogenic fungi.** Adviser: Poliane Alfenas Zerbini. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Francisco Murilo Zerbini.

The phytopathogenic fungi are an important group of microorganisms responsible for significant losses in agriculture throughout the world. The ability that some have to infect all parts of the plant, as well as the ability to survive in the soil becomes an important phytopathogens group. The control of disease caused by fungi usually requires measures using chemical treatments leading an environmental impact and to human health. Mycovirus are viruses that infect fungi. Some mycovirus present ability to make their hipovirulentos hosts and are still able to transfer that property to other compatible isolated. The control of pathogenic fungi with mycovirus is an alternative that can reduce the use of chemical control. Furthermore, it may be effective against diseases for which no chemical control or resistant plants available. So the aim of this study was to access the mycovirus diversity associated with pathogenic fungi and to study the impact of these viruses on the physiology of the host. The presence of mycovirus in fungal isolates from culture collections, free fair and also the field in symptomatic plants was investigated. Of the 42 fungal isolates analyzed, 11 (26%) contained dsRNA. All isolates showed patterns different dsRNA observed by agarose gel electrophoresis. A strain *Chalara elegans*, the causal agent of black rot on root was detected the presence of icosahedral particles 33 nanometers in diameter. SDS-PAGE from purified viral revealed the presence of three structural proteins with molecular weight estimated at 38, 40 and 45 kDa. Was performed the molecular and biological characterization of a mycovirus obtained from the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* strain Ss24, causal agent of white mold, disease present in several plant species. The genome has 2.700 nucleotides and a single open reading frame sequence (ORF) encoding a RNA-dependent RNA polymerase with conserved domains of the superfamily of RdRps mitovirus, a group of viruses that replicate in mitochondria of host cells. Phylogenetic analysis indicate that the virus detected is a new member of the genus *Mitovirus*. Analysis of the profile segments dsRNA obtained from strain Ss24 suggests that there is coinfection by more than one mycovirus. An isogenic strain obtained by sexual reproduction (Ss24MVF) revealed

a different pattern of their parent strain. Both Ss24 and isogenic strains Ss24MVF were compared for sclerotia, total acid, oxalic acid production, growth rate, morphology and pigmentation of colonies and pathogenicity in plants of *Phaseolus vulgaris*, *Capsicum annuum* and *Nicotiana benthamiana*. The results revealed that the strain Ss24 was severely impaired in all analyzed physiological characteristics compared with the single Ss24MVF. Higher concentration of mitochondria in hyphae were observed on strain Ss24. Together, these results confirm that viruses that infect fungi are distributed in different species of fungi. The presence of certain segments of dsRNA can drive the phenotype of hypovirulence fungi. A detailed analysis of the characteristics this is mycovirus can lead to the development of tools for studies on fungi pathogenic mechanisms, and the use of these viruses as biological control agents.

## INTRODUÇÃO GERAL

### Importância dos micovírus

Micovírus são vírus que infectam fungos e são comumente encontrados nos principais grupos de fungos (Ghabrial and Suzuki, 2009), incluindo os fitopatogênicos. A primeira descoberta da presença de vírus infectando fungos ocorreu em 1962 (Hollings, 1962), em cogumelos cultiváveis. Desde então, diversas espécies de micovírus têm sido descritas. De acordo com a natureza e número de componentes genômicos, os micovírus estão classificados em diferentes famílias. As famílias *Totiviridae* (1 segmento, 4-7 kb), *Endornaviridae* (1 segmento, 14-18 kb), *Partitiviridae* (2 segmentos, 1,4-2,4 kb), *Chrysoviridae* (4 segmentos, 2,9-3,6 kb) e *Reoviridae* (10-12 segmentos, 19-32 kb) abrigam micovírus com genoma de RNA fita dupla (dsRNA). As famílias *Alphaflexiviridae* (6-9 kb), *Barnaviridae* (4 kb), *Gammaflexiviridae* (7 kb), *Hypoviridae* (9-13 kb), e *Narnaviridae* (2-3 kb) apresentam genoma de RNA fita simples sentido positivo (+ssRNA) monosegmentados. As famílias *Metaviridae* (4-10 kb) e *Pseudoviridae* (5-9 kb) acomodam micovírus monossegmentados com genoma de ssRNA cuja replicação ocorre por transcrição reversa (ssRNA-RT) (King et al., 2011). Há ainda micovírus com genoma de ssRNA sentido negativo (-ssRNA) (Liu et al., 2014) e DNA fita simples (ssDNA) (Yu et al., 2010). Embora recentemente tenham sido detectados centenas de novos micovírus, boa parte destes ainda não foram atribuídos a um táxon formal.

O material genético dos micovírus pode estar encapsidado em partículas, livre no citoplasma da célula hospedeira ou associados à vesículas membranosas e mitocôndrias. Grande parte dos micovírus conhecidos possuem partículas rígidas e pertencem a famílias que não infectam exclusivamente fungos, mas uma ampla gama

de hospedeiros, tais como, procariotos, plantas e metazoários (Chiba et al., 2009; Hillman et al., 2004; Horiuchi et al., 2003). Atualmente apenas cinco famílias são encontradas abrigando exclusivamente micovírus, são elas: *Barnaviridae*, *Chrysoviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae* e *Narnaviridae* (King et al., 2011). A relação que os micovírus estabelecem com seus hospedeiros raramente induz sintomas, no entanto, alguns podem alterar a capacidade do fungo em causar doenças tornando-o hipovirulento, podendo também ocasionar redução na taxa de crescimento, pigmentação anormal e alterações na reprodução (Castro et al., 2003; Darissa et al., 2012; Lee et al., 2011; Nuss, 2005; Yu et al., 2015; Yu et al., 2010; Zhang et al., 2014).

### **Transmissão dos micovírus**

Os micovírus são transmitidos horizontalmente na natureza por anastomose de hifas entre isolados fúngicos vegetativamente compatíveis ou verticalmente por esporos. A fase intracelular no ciclo de vida é dividida basicamente em quatro fases. (1) propagação no interior da célula hospedeira; (2) movimento célula-a-célula em direção a extensão das hifas após a divisão celular; (3) distribuição lateral pela fusão das hifas dentro de uma rede micelial interconectada; (4) transmissão horizontal pela fusão de hifas entre os isolados fúngicos pertencentes ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (*vegetative compatibility group* – VCG). Já a fase extracelular no ciclo de vida dos micovírus ainda não foi elucidada (Yaegashi et al., 2013). O movimento horizontal dos micovírus para outros hospedeiros fúngicos é provavelmente um fenômeno raro de ocorrer (Buck, 1986), em parte, devido à existência de VCGs em muitos fungos. Os VCGs constituem uma barreira natural para a transmissão horizontal dos micovírus, constituindo um mecanismo de defesa

celular contra a infecção por impedir a propagação de vírus de um isolado a outro na natureza (Caten, 1972).

Uma alternativa para sobrepor a barreira de transmissão formada entre fungos que são incompatíveis vegetativamente é a fusão de protoplastos que pode ser usada para expandir a gama de hospedeiros. No gênero *Hypovirus*, o uso da técnica de fusão de protoplastos permitem o estudo das alterações mediadas por *Hypovirus* em novos hospedeiros fúngicos tornando estes capazes de transpor as barreiras formadas pela diversidade genética e pelos grupos de incompatibilidade vegetativas que impedem a transmissão (Lee et al., 2011). A transmissão de micovírus de dsRNA através da fusão de protoplastos já foi demonstrada em fungos fitopatogênicos incluindo *Aspergillus* (Van Diepeningen et al., 1998), *Fusarium poae* (Van Diepeningen et al., 2000) e *Rosellinia necatrix* (Kanematsu et al., 2010). A importância dessa técnica consiste na ampliação da gama de hospedeiros e seleção de micovírus apropriados, com potencial para uso no controle biológico.

### **Influência dos micovírus sobre processos biológicos de seus hospedeiros**

Vários micovírus têm sido isolados a partir de uma diversidade de fungos, incluindo os fungos fitopatogênicos. A maioria dos mycovirus infectam seus hospedeiros porém permanecem latentes sem induzir sintomas (Pearson et al., 2009). No entanto, em outros casos, a infecção micoviral pode estar associada a alterações nos processos biológicos dos hospedeiros. Micovírus pode induzir superexpressão de genes associados com síntese de proteínas, montagem de ribossomos, nucléolo, processamento de RNA ribossomal além de genes necessários para transcrição, transdução de sinal sugere essas alterações podem estar relacionada com a replicação

do micovírus. Isto revela uma mudança global nas vias celulares por reprogramação transcricional do fungo (Cho et al., 2012).

Micovírus também pode estabelecer uma associação mutualista entre diferentes organismos. Um exemplo é a associação estabelecida entre micovírus-fungo endofítico-planta. Foi demonstrado que um fungo infectado por micovírus conferiu à planta hospedeira tolerância ao calor. No entanto, quando o fungo foi curado do micovírus tornou-se incapaz de conferir resistência à planta a altas temperaturas do solo (Márquez et al., 2007).

Em *Metarhizium anisopliae*, um fungo entomopatogênico utilizado para controle biológico de insetos pragas, a análise de isolados infectados por micovírus revelou que a infecção interfere com o fenótipo do fungo. Uma comparação entre isolados infectados e livres de vírus mostrou uma diminuição na secreção de endoquitinases nos isolados livres de vírus, sugerindo uma possível interferência do micovírus sobre os genes codificadores de tais enzimas, o que pode representar um problema com relação à estabilidade de isolados fúngicos usados no controle biológico. Entender as interações estabelecidas entre eles têm sido o objetivo de vários pesquisadores a fim de fornecer uma visão mais detalhada sobre micovírus e seus hospedeiros (de la Paz Giménez-Pecci et al., 2002).

### **Hipovirulência mediada por micovírus**

A hipovirulência mediada por vírus é o termo utilizado para descrever o fenótipo de virulência reduzida em isolados fúngicos patogênicos (Ghabrial and Suzuki, 2009; Pearson et al., 2009; Yu et al., 2010). Esse fenótipo pode ser especificamente refletido pela diminuição da taxa de crescimento micelial, ausência de esporulação, diminuição da germinação, além de redução da invasividade hifal e

aumento substancial da pigmentação (Cardoso, 1994; Chu et al., 2002; Ihrmark et al., 2004; Moleleki et al., 2003; Suzaki et al., 2005)

A maioria dos micovírus que estão associados com a hipovirulência não codifica a proteína capsidial (CP) e não formam partícula viral. A perda da CP por alguns micovírus pode estar relacionada com a ausência da fase extracelular em seu ciclo de replicação. Logo a necessidade de formação de partículas é reduzida (Nuss, 2005; Nuss, 2011). Entre os táxons virais contendo representantes associados à hipovirulência estão gêneros *Hypovirus* e *Mitovirus* que apresentam genomas (+)ssRNA e não formam partículas. A replicação dos *Hypovirus* ocorre no citoplasma e dos *Mitovirus* na mitocôndria das células hospedeiras (Hillman and Esteban, 2011; Nuss, 2011). A utilização de micovírus que induzem hipovirulência em seus hospedeiros tem demonstrado ser uma estratégia para o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos. O potencial de micovírus para controle biológico foi primeiramente demonstrado no manejo do cancro da castanheira, doença causada pelo fungo *Chryphonectria parasitica* que quase causou a extinção da castanheira na América do Norte. As conseqüências da doença foram menos drásticas na Europa onde *C. parasitica* infectado por micovírus teve a virulência reduzida, de forma que o cancro tornou-se não letal às árvores de castanheira (Anagnostakis, 1987; Nuss, 2005).

*S. sclerotiorum* é notório fitopatógeno, causa grandes perdas em diversas culturas e é um hospedeiro natural de diversos micovírus. Têm sido encontrado micovírus com genomas de RNA fita simples sentido positivo (+ssRNA), RNA fita simples sentido negativo (-ssRNA), RNA dupla fita (ssRNA) ou DNA fita simples (ssDNA) (Khalifa and Pearson, 2014; Li et al., 2016; Liu et al., 2009; Liu et al., 2015; Liu et al., 2014; Ran et al., 2016; Wang et al., 2014; Xiao et al., 2014; Xie and

Ghabrial, 2012; Xie et al., 2006; Xie et al., 2011; Yu et al., 2010). Embora os micovírus tenham sido relacionados com infecção assintomática em seus hospedeiros, o fenótipo da hipovirulência está presente na maioria dos isolados de *S. sclerotiorum* infectados por micovírus e a incidência de infecções mistas por múltiplos micovírus relacionados ou não relacionados também é um fenômeno comum neste fungo (Hu et al., 2014; Khalifa and Pearson, 2013; Khalifa and Pearson, 2014; Liu et al., 2014; Ran et al., 2016; Xie and Ghabrial, 2012; Xie et al., 2006; Xie et al., 2011; Yu et al., 2010; Yu et al., 2013; Zhang et al., 2009).

### **Importância de micovírus como agentes de controle biológico**

O controle biológico de fungos fitopatogênicos pela aplicação de micovírus hipovirulentos é uma alternativa viável ao controle químico uma vez que há uma crescente preocupação com o uso de fungicidas para o controle de doenças de plantas.

Há mais de 40 anos os micovírus têm sido utilizados no controle do cancro da castanheira na Europa. Sua utilização no campo pode ser vantajoso, uma vez que a hipovirulência em fungos é uma característica que pode ser transmissível de um isolado fúngico a outro. Quando isolados fúngicos hipovirulentos colonizam seus hospedeiros eles são capazes de produzir padrões moleculares associados à patógenos (PMAPs) e/ou efetores que são reconhecidos pelas células do sistema imune inato do hospedeiro como sinal de invasão e assim os hospedeiros podem produzir uma resposta de defesa que visa especificamente à infecção do isolado virulento (Xie and Jiang, 2014).

Partículas de um micovírus com genoma de ssDNA, SsHADV-1, associado à hipovirulência em *S. sclerotiorum* foi aplicada extracelularmente a hifas de quatro

isolados de *S. sclerotiorum* pertencente a diferentes VCGs. Preparações das partículas virais também foram aplicadas diretamente em folhas de *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus* seguido por inoculação dos isolados fúngicos virulentos. A aplicação do micovírus foi capaz de suprimir o desenvolvimento das lesões. Se esta estratégia funcionar em outras culturas, isso pode controlar a doença e melhorar a produção das culturas no campo. Partículas virais também foram detectadas em folhas após quinze dias de inoculação, revelando ser o vírus promissor como biofungicida. Isto demonstra a atividade terapêutica do micovírus em inibir o desenvolvimento da doença (Yu et al., 2013). A exploração de medidas alternativas de controle tem atraído o interesse de muitos pesquisadores como uma forma de evitar ou diminuir o uso de fungicidas devidos aos problemas que eles podem causar não somente ao ambiente através de resíduos dos produtos na cultura, mas também a capacidade de tornar alguns fungos resistentes devido ao uso contínuo (Fravel, 2005).

## REFERÊNCIAS

- Anagnostakis, S.L., 1987. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79, 23-37.
- Buck, K.W., 1986. Fungal virology: an overview. In: Buck, K.W. (Ed.), *Fungal Virology*. CRC Press, Boca Raton.
- Cardoso, J.E., 1994. Podridões Radiculares, Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle, Brasília, pp. 151-164.
- Castro, M., Kramer, K., Valdivia, L., Ortiz, S., Castillo, A., 2003. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 228(1), 87-91.
- Caten, C.E., 1972. Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal of General Microbiology* 72(2), 221-229.

- Chiba, S., Salaipeth, L., Lin, Y.-H., Sasaki, A., Kanematsu, S., Suzuki, N., 2009. A Novel Bipartite Double-Stranded RNA Mycovirus from the White Root Rot Fungus *Rosellinia necatrix*: Molecular and Biological Characterization, Taxonomic Considerations, and Potential for Biological Control. *Journal of Virology* 83(24), 12801-12812.
- Cho, W.K., Yu, J., Lee, K.-M., Son, M., Min, K., Lee, Y.-W., Kim, K.-H., 2012. Genome-wide expression profiling shows transcriptional reprogramming in *Fusarium graminearum* by *Fusarium graminearum* virus 1-DK21 infection. *BMC Genomics* 13(1), 1-16.
- Chu, Y.-M., Jeon, J.-J., Yea, S.-J., Kim, Y.-H., Yun, S.-H., Lee, Y.-W., Kim, K.-H., 2002. Double-Stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5), 2529-2534.
- Darissa, O., Adam, G., Schäfer, W., 2012. A dsRNA mycovirus causes hypovirulence of *Fusarium graminearum* to wheat and maize. *European Journal of Plant Pathology* 134(1), 181-189.
- de la Paz Giménez-Pecci, M., Bogo, R.M., Santi, L., Moraes, d.C.K., Corrêa, T.C., Henning Vainstein, M., Schrank, A., 2002. Characterization of Mycoviruses and Analyses of Chitinase Secretion in the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology* 45(5), 334-339.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol 1. *Annual Review of Phytopathology* 43(1), 337-359.
- Ghabrial, S.A., Suzuki, N., 2009. Viruses of Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 47(1), 353-384.
- Hillman, B.I., Esteban, R., 2011. Narnaviridae: In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (Eds) *Virus taxonome: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Elsevier, 1055-1060.
- Hillman, B.I., Supyani, S., Kondo, H., Suzuki, N., 2004. A Reovirus of the Fungus *Cryphonectria parasitica* That Is Infectious as Particles and Related to the Coltivirus Genus of Animal Pathogens. *Journal of Virology* 78(2), 892-898.
- Hollings, M., 1962. Viruses Associated with A Die-Back Disease of Cultivated Mushroom. *Nature* 196(4858), 962-965.
- Horiuchi, H., Moriyama, H., Fukuhara, T., 2003. Inheritance of *Oryza sativa* endornavirus in F1 and F2 hybrids between japonica and indica rice. *Genes & Genetic Systems* 78(3), 229-234.
- 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.

- Ihrmark, K., Stenström, E., Stenlid, J., 2004. Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research* 108(02), 149-153.
- Kanematsu, S., Sasaki, A., Onoue, M., Oikawa, Y., Ito, T., 2010. Extending the Fungal Host Range of a Partitivirus and a Mycoreovirus from *Rosellinia necatrix* by Inoculation of Protoplasts with Virus Particles. *Phytopathology* 100(9), 922-930.
- Khalifa, M.E., Pearson, M.N., 2013. Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. *Virology* 441(1), 22-30.
- Khalifa, M.E., Pearson, M.N., 2014. Molecular characterisation of novel mitoviruses associated with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Archives of Virology* 159(11), 3157-3160.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2011. Part I. The Viruses, *Virus Taxonomy*. Elsevier, San Diego, pp. 10-14.
- Lee, K.M., Yu, J., Son, M., Lee, Y.W., Kim, K.H., 2011. Transmission of *Fusarium boothii* mycovirus via protoplast fusion causes hypovirulence in other phytopathogenic fungi. *PloS one* 6(6), e21629.
- 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 research* 219, 92-99.
- Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Peng, Y., Yi, X., Ghabrial, S.A., 2009. A Novel Mycovirus That Is Related to the Human Pathogen *Hepatitis E Virus* and Rubi-Like Viruses. *Journal of Virology* 83(4), 1981-1991.
- Liu, L., Wang, Q., Cheng, J., Fu, Y., Jiang, D., Xie, J., 2015. Molecular characterization of a bipartite double-stranded RNA virus and its satellite-like RNA co-infecting the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology* 6(406).
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(33), 12205-12210.
- Márquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J., Roossinck, M.J., 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315.
- Moleleki, N., van Heerden, S.W., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., Preisig, O., 2003. Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe* RNA Virus. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7), 3952-3956.
- Nuss, D.L., 2005. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3(8), 632-642.
- Nuss, D.L., 2011. Mycoviruses, RNA Silencing, and Viral RNA Recombination. *Advances in Virus Research* 80, 25-48.

- Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., Arthur, K., 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 10(1), 115-128.
- Ran, H., Liu, L., Li, B., Cheng, J., Fu, Y., Jiang, D., Xie, J., 2016. Co-infection of a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* with a new botybirnavirus and a strain of a mitovirus. *Virology Journal* 13(1), 1-10.
- Suzaki, K., Ikeda, K.-i., Sasaki, A., Kanematsu, S., Matsumoto, N., Yoshida, K., 2005. Horizontal transmission and host-virulence attenuation of totivirus in violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *Journal of General Plant Pathology* 71(3), 161-168.
- Van Diepeningen, A.D., Debets, A.J.M., Hoekstra, R.F., 1998. Intra- and Interspecies Virus Transfer in Aspergilli via Protoplast Fusion. *Fungal Genetics and Biology* 25(3), 171-180.
- Van Diepeningen, A.D., Debets, A.J.M., Slakhors, S.M., Fekete, C., Hoekstra, R.F., 2000. Interspecies virus transfer via protoplast fusions between *Fusarium poae* and *Aspergillus* strains. *Fungal Genetic* 47, 99-100.
- Wang, Y., Hou, Y., Chen, C., Zhou, M., 2014. Detection of resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* to carbendazim and dimethachlon in Jiangsu province of China. *Australasian Plant Pathology* 43(3), 307-312.
- 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. *Journal of Virology* 88(17), 10120-10133.
- 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(2), 77-85.
- Xie, J., Jiang, D., 2014. New Insights into Mycoviruses and Exploration for the Biological Control of Crop Fungal Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 52(1), 45-68.
- Xie, J., Wei, D., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., Ghabrial, S., Peng, Y., 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of General Virology* 87(1), 241-249.
- Xie, J., Xiao, X., Fu, Y., Liu, H., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Jiang, D., 2011. A novel mycovirus closely related to hypoviruses that infects the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology* 418(1), 49-56.
- Yaegashi, H., Nakamura, H., Sawahata, T., Sasaki, A., Iwanami, Y., Ito, T., Kanematsu, S., 2013. Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard, 49-62 pp, 83.
- 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. Applied and Environmental Microbiology 81(7), 2299-2310.

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y., Xie, J., Cheng, J., Huang, J., Yi, X., 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(18), 8387-8392.

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., Jiang, D., 2013. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(4), 1452-1457.

Zhang, L., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., 2009. A novel virus that infecting hypovirulent strain XG36-1 of plant fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. gVirology Journal 6(96).

Zhang, R., Liu, S., Chiba, S., Kondo, H., Kanematsu, S., 2014. A novel single-stranded RNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*, with similarity to hypo-like viruses. Frontiers in Microbiology 5(360).

## **CAPÍTULO I**

### **DIVERSIDADE DE MICROVÍRUS INFECTANDO DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Barros, A.P.O., Xavier, A.S., Duarte, V., Dalbosco, M., Kitajima, E. W., Pereira, O. L., Queiroz, M.V., Alfenas-Zerbini, P. Diversidade de micovírus infectando diferentes espécies de fungos fitopatogênicos.

## INTRODUÇÃO

Os fungos são considerados os mais importantes agentes patogênicos de plantas, por constituir uma ameaça à produção de culturas de importância econômica. Entre as os danos causados por fungos fitopatogênicos pode-se citar perdas por reduzir germinação de sementes (Özer, 2005), por causar danos severos às plantas ou morte das células antes ou imediatamente após penetração e colonização da planta hospedeira (Gonzalez Garcia et al., 2006) e por depreciar produtos como cereais, frutas e vegetais pré e pós-colheita, durante o armazenamento ou transporte (Bergamin Filho, 1995).

A interação entre fungos-plantas-virus é um patossistema interessante que tem atraído a atenção da comunidade científica. Diversos fungos fitopatogênicos, entre eles, *Chalara elegans*, *Pseudocercospora griseola*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Geotrichum* spp. têm grande importância devido aos danos que causam em seus hospedeiros.

O gênero *Geotrichum* e espécies afins apresenta distribuição mundial e é adaptado a diferentes habitats como solo, água, ar e esgoto, produtos lácteos, tecidos de plantas e também é comumente encontrado no trato digestivo de humanos (Pottier et al., 2008). Em plantas, a doença é conhecida por podridão azeda. Os problemas mais sérios são causados em pós-colheita, quando se observa lesões encharcadas na superfície de tubérculos durante o armazenamento. Uma massa micelial branca sobre a lesão é observado quando há alta umidade. Mais tarde as lesões se estendem internamente no tecido causando uma vasta deterioração com aspecto esbranquiçado (Horita and Hatta, 2016). Varias culturas podem ser susceptíveis a infecção por este fungo, como por exemplo, frutos de tomate, laranja, limão, tangerina, melão, pimenta doce e cenoura (Suprapta et al., 1996). O controle da doença com fungicidas é uma

das medidas empregadas porém significantes perdas podem ocorrer e nem sempre a aplicação de fungicidas resulta em controle eficiente da doença no campo devido à insensibilidade que alguns isolados apresentam aos fungicidas (Wagh and Bhale, 2012).

Diversas culturas, tais como a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser afetada por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematóides. *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun [sin. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris] agente causal da mancha angular, representa um dos principais patógenos fúngicos que ataca parte aérea das plantas. As lesões, quando numerosas, podem levar a desfolha prematura. Nas vagens, as lesões podem coalescer e ocupar toda a área causando perda no rendimento da cultura e inviabilizando sua comercialização (Bianchini et al., 2005 ). O fungo é importante principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, em algumas regiões com temperaturas próximas a 24° C e períodos alternados de alta e baixa umidade relativa do ar pode provocar o surgimento de epidemias da doença ocasionando severas perdas de rendimento (Sartorato, 1988).

Uma doença fúngica que causa grandes perdas também é a podridão negra da raiz, doença causada por *Chalara elegans*, nome dado pela pigmentação dos clamidósporos que se formam nas raízes das plantas hospedeiras, dando uma aparência enegrecida à raiz. O fungo pode ser encontrado em todas as regiões do mundo e a infecção pode ocorrer a qualquer momento durante o período vegetativo. Por causa da infecção, a parte aérea das plantas pode apresentar baixa estatura e descoloração de folhas e brotos. Mudas infectadas podem também apresentar sistema radicular reduzido conduzindo à morte da planta (Alexopoulos et al., 1996).

*Sclerotinia sclerotiorum* está entre os patógenos de plantas mais destrutivos. É um fungo cosmopolita, necrotrófico, habitante do solo. Mais de 400 espécies de plantas em todo o mundo são hospedeiras do fungo (Purdy, 1979). Sobre a superfície das plantas infectadas observa-se um branqueamento que corresponde ao crescimento micelial do fungo recobrando toda a superfície de folhas e caules. Com o progresso da doença ocorre a formação de escleródios que permanecem sendo produzidos nas plantas doentes e constitui fonte de inóculo para próximas gerações (Petrofeza and Nasser, 2012). Um fator chave que governa a patogenicidade neste fungo é a secreção do ácido oxálico. O ácido contribui para a patogenicidade por potencializar a capacidade do fungo em colonizar as plantas hospedeiras. A forma como o ácido oxálico interfere na patogenicidade pode ser através da acidificação dos tecidos do hospedeiro e sequestro de cálcio da parede celular, para facilitar a ação de enzimas secretadas pelo fungo que degradam a parede celular da planta hospedeira (Dutton and Evans, 1996).

O principal controle de doenças fúngicas tem sido feito com aplicação de fungicidas que em curto prazo pode ter suas vantagens, mas em longo prazo pode causar problemas devidos os resíduos dos produtos acumulados no ambiente (Ghini and Kimati, 2000), sendo necessário buscar uma alternativa para controle dessas doenças. Diante da dificuldade de controle das doenças fúngicas surge a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças. Neste contexto, a utilização de micovírus como agentes de controle biológico pode ser uma forma viável, e ambientalmente segura de combater tais doenças. Contudo, o desenvolvimento deste tipo de ferramenta de controle biológico requer um bom conhecimento da sintomatologia e transmissão viral (Muñoz-Adalia et al., 2016).

Nos últimos anos, uma grande diversidade de vírus tem sido encontrados associados com fungos sendo prevalente em todos os principais grupos (Hollings and Stone, 1971). Apesar de sua descoberta ser relativamente recente, acredita-se que os micovírus tenham origem antiga. Esta hipótese surgiu com base no fato de os micovírus compartilhar significativa similaridade de sequências com vírus de RNA que infectam uma ampla variedade de outros organismos como vertebrados, insetos e plantas. Ainda de acordo com essa teoria é possível que um vírus de RNA ancestral tenha sido transmitido horizontalmente entre esses organismos (Ghabrial and Suzuki, 2009). Uma segunda hipótese propõe que os micovírus teriam sido originados a partir de vírus que infectam vegetais por meio da transferência horizontal para os fungos, tendo uma origem relativamente recente (Pearson et al., 2009). O micovírus *Botrytis virus F* (BVF) é um exemplo que explica essa hipótese. Ele apresenta características típicas de quatro grupos de vírus de plantas pertencentes aos gêneros *Furovirus* e *Tobravirus*. Uma das principais diferenças entre BVF e vírus de plantas é a ausência da proteína movimento (Howitt et al., 2006). Outro indício que reforça esta segunda hipótese consiste na perda da proteína capsidial (CP) por alguns micovírus. Uma das funções da proteína capsidial nos vírus de plantas é mediar a transmissão pelo vetor. Como este tipo de transmissão não é importante para a disseminação dos micovírus entre os fungos, por causa do modo de transmissão intracelular, eles então podem dispensar a função de empacotamento (Xie et al., 2006).

A presença de dsRNA, indicativo de infecção viral, bem como de micovírus propriamente dito é comum em uma ampla variedade de fungos. A incidência e a variabilidade dos micovírus tem mais comumente sido determinada com base na presença de dsRNA, com uma frequência maior em fungos filamentosos. Os perfis

de dsRNA podem ser bastante diversificados, mesmo dentro de isolados de uma mesma espécie (Pearson et al., 2009), onde essa diversificação pode estar relacionada a infecções múltiplas em um único isolado fúngico.

Co-infecção é um fenômeno comum em fungos. Vários micovírus são capazes de coexistir dentro de um mesmo fungo e esta co-infecção pode ocorrer entre micovírus que são distantemente ou proximamente relacionados. Recentemente foi relatado a descoberta de um isolado de *S. sclerotiorum* co-infectado por dois micovírus. Um com genoma de dsRNA bissegmentado (SsBRV2/AH16) e outro com genoma de ssRNA monossegmento (SsMV4/AH16) (Ran et al., 2016). Co-infecção com múltiplos micovírus é comum em *S. sclerotiorum* (Hu et al., 2014; Khalifa and Pearson, 2013; Khalifa and Pearson, 2014; Ran et al., 2016; Xie and Ghabrial, 2012). No entanto, este é o primeiro exemplo de co-infecção em *S. sclerotiorum* abrigando micovírus com diferente tipos de genoma (Ran et al., 2016). Diferentes partículas virais também podem ser encontradas em um único isolado fúngico. Um isolado de *Botrytis cinerea* foi simultaneamente infectado por dois micovírus, com tamanhos diferentes de partículas virais isométricas (23 e 32 nm) e associados com cinco moléculas de dsRNA que conferiram um fenótipo de hipovirulência ao fungo (Potgieter et al., 2013).

Tripla infecção tem sido encontrada em *Heterobasidion parviporum* (Vainio et al., 2015) e em *Gremmeniella abietina* co-infectado com micovírus putativos pertencentes a três diferentes gêneros, *Mitovirus*, *Partitivirus* e *Totivirus* (Tuomivirta and Hantula, 2005) e em diversos outros fungos (Howitt et al., 2006; Park et al., 2005; Preisig et al., 1998; Tuomivirta et al., 2009). A co-infecção dos hospedeiros fúngicos pode resultar tanto em um efeito antagônico entre os micovírus como pode

também interferir na virulência do fungo tornando-o hipovirulento (Potgieter et al., 2013). No entanto essa hipótese necessita ser melhor investigada.

Os micovírus com genoma dsRNA são mais facilmente detectados associados a infecção viral. Um número crescente de fungos fitopatogênicos hospedam esses micovírus. Do ponto de vista ecológico algumas relações estabelecidas entre os fungos e seus hospedeiros podem ser benéficas. Quando a relação micovírus-fungo resulta em hipovirulência ao hospedeiro, desperta o interesse em explorar o potencial destes para o virocontrole de doenças fúngicas (Xie and Jiang, 2014).

O objetivo deste estudo foi investigar populações de fungos fitopatogênicos pertencentes à coleções de culturas e isolados selvagens obtidos em cultivos em busca de micovírus.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolados fúngicos e condições de cultivo**

Os isolados fúngicos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de coleções de culturas dos laboratórios de Genética de Micro-organismos – UFV, Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas - UFV, Melhoramento do Feijão - UFV e da Agrônômica - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário- Porto Alegre/RS. Também foram obtidos isolados de plantas com sintomas de doenças fúngicas no campo experimental da Agronomia – UFV e feira livre de Viçosa/MG. Os hospedeiros e seus respectivos locais de origem estão listados na Tabela 1. Para o isolamento dos fungos, fragmentos de material vegetal de diferentes plantas hospedeiras com sintomas de infecção foram submetidos a desinfestação superficial em solução sequencial de álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 25% por 3 minutos, imersão em água esterilizada e secagem em papel de filtro. Todos os

isolados fúngicos foram transferidos de forma asséptica para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-Agar (BDA) e mantidos em câmara incubadora, a 22°C, com período de luminosidade alternado (12 horas claro/ 12 horas escuro). A identificação dos isolados fúngicos obtidos no campo foi realizada de acordo com as características morfológicas macroscópicas e microscópicas com auxílio de microscópio óptico.

### **Extração, quantificação e eletroforese de dsRNA**

Para extração de dsRNA, os isolados foram cultivados sobre membrana de celofane posicionada sobre meio de cultura BDA em placas de Petri por 10 dias ou até completo crescimento da colônia na superfície do celofane. O micélio foi coletado e macerado em nitrogênio líquido até formar um pó fino e sujeito a extração usando metodologia descrita por Morris & Doddis, 1978. A quantificação do RNA bem como o índices de pureza (260/280 nm e 260/230 nm) das amostras foram realizadas utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). A preparação foi submetida à digestão com enzimas S1 nuclease e DNase (Promega) para eliminação completa de ssRNA e DNA genômico, respectivamente conforme técnicas padrões. O dsRNA foi posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com Brometo de Etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

### **Purificação viral**

O isolado CCF 119 de *Chalara elegans* foi submetido à purificação viral. Aproximadamente 30 g. de micélio fresco foi macerado em nitrogênio líquido, homogeneizado em tampão fosfato 0,1M (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) acrescido de EDTA 5 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, e Dieca (ácido Dietilcarbâmico) 10 mM, pH 7,6. O

homogeneizado foi filtrado em gaze. Triton X-100 foi adicionado à uma concentração final de 4% e então mantido sob agitação lenta a 4°C durante 12 horas. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rotações por minuto (rpm) por 20 minutos em rotor Sorvall GSA. O sobrenadante resultante foi ultracentrifugado a 29.500 rpm por 3 horas sobre uma almofada de sacarose 30% em rotor Beckman T30. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi gentilmente lavado várias vezes com água livre de RNases, para remoção de qualquer pigmentos e sacarose no tubo. O pellet foi gentilmente ressuspensado a 4 °C em tampão fosfato 0,1M. Uma alíquota de 5µl foi montada em telas de cobre revestidas com formvar, corada com Acetato de Uranila 1% e observada em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM-109).

### **Isolamento RNA viral**

O ácido nucleico viral foi extraído a partir do purificado viral utilizando o seguinte protocolo: 800 µl do purificado foi homogeneizado em 2 µl de proteinase K e 0,5% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e incubados a 37 °C por 1 hora. Igual volume de fenol foi adicionado às amostras e a mistura foi agitada por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas a 3000 × g durante 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo de microcentrífuga limpo e extraída com um volume igual de fenol/clorofórmio. (1:1) e misturadas por inversão. As amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min e a extração com fenol/clorofórmio foi repetida. A fase aquosa foi transferida para um tubo de microcentrífuga limpo e adicionou-se 2 volumes de etanol seguido por incubação em gelo para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16000 x g por 20 min. e o passo da precipitação foi repetido. O ácido nucleico foi ressuspensado em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) e submetido a eletroforese em gel de

agarose 0,8%, corado com brometo de Etídio e visualizado em transiluminador de ultravioleta (UV).

### **Espectrometria de massas de proteínas estruturais de *Chalara elegans* isolado CCF119**

Preparação das proteínas foi feita de acordo com protocolo descrito por (Shevchenko et al., 2007). A preparação purificada foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Três bandas de 38, 40 e 45 kilodaltons (kDa) coradas por azul brilhante de Coomassie foram excisadas, descoloridas e tratadas. As proteínas modificadas foram sujeitas a digestão em gel com tripsina (Trypsin gold- Promega) eluídas em solução de acetonitrila-ácido trifluoracético e desalinizadas por Zip-Tips (Cleanup C18 pipette tips; Millipore). Os peptídeos foram re-dissolvidos em solução de acetonitrila-acido trifluoracético e analisados por espectrometria de massa (MS) por *Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz* (MALDI-TOF) usando um espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF UltraflexIII, Bruker Daltonics. As massas de cada peptídeos oriundos do MALDI-TOF foram submetidas à busca no programa MASCOT ([WWW.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) para identificação por mapa de peptídeos.

## **RESULTADOS**

### **Presença de dsRNA em fungos fitopatogênicos**

Todos os 42 isolados fúngicos obtidos neste estudo foram analisados quanto a presença de possíveis vírus com genoma de dsRNA. Foi detectado a presença de possíveis micovírus em 11 isolados (Tabela 1). Diversos segmentos de dsRNA foram

encontrados em representantes das espécies *S. sclerotiorum* (02 isolados infectados), *C. elegans* (3 isolados), *Geotrichum* sp. (1 isolado) e *P. griseola* (5 isolados). Todos isolados apresentaram diferentes padrões de dsRNA com tamanhos variando de 0,5 – 8,0 kb. Os três isolados de *C. elegans* apresentaram 2, 5 e 6 segmentos cada um, com tamanhos entre 4,0 – 5,5, 2,9 – 8,0 e 0,75 – 1,8 kb, respectivamente (Figura 1). Cinco isolados de *P. griseola* apresentaram 1, 3, 5, 8 e 11 segmentos com tamanhos variáveis (Figura 2). Dois isolados de *S. sclerotiorum* apresentaram 1 e 7 segmentos com tamanhos de 0,85 e 0,9 - 2,7 kb, respectivamente (Figura 3). O isolado de *Geotrichum* sp. apresentou um único segmento de 5 kb (Figura 4).

### **Análise genômica e estrutural do micovírus presente em *C. elegans* isolado**

#### **CCF119**

Os dsRNAs extraídos a partir do purificado viral bem como do micélio do isolado CCF119 apresentaram intensidade semelhantes na eletroforese em gel de agarose (Figura 5A) sugerindo que ambos ocorrem em proporções semelhantes.

Partículas virais foram observadas em microscopia eletrônica de transmissão. As partículas exibiram um formato icosaédrico com aproximadamente 33 nm em diâmetro (Figura 5B). O perfil de proteínas obtidas a partir do purificado viral do isolado CCF-119 e visualizados em gel de poliacrilamida a 12%, revelou três componentes protéicos com tamanhos aproximados de 45 kDa, 40 kDa e 38 kDa, os quais foram designados p45, p40 e p38 (Figura. 5C). A análise das sequências dos peptídeos apresentou similaridade com proteínas capsidiais encontradas em *Penicillium stoloniferum* virus S (PsV-S) – membro da família *Partitiviridae*, *Gremmeniella abietina* RNA virus MS2 (GaRV-MS2), *Gremmeniella abietina* RNA virus MS1 e com uma peptidase putativa presente em *Azospirillum lipoferum*.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, mais de 26% dos isolados fúngicos analisados estavam infectados por micovírus. O estudo revelou que todos os isolados fúngicos apresentaram diferentes padrões de segmentos dsRNA. Foi observado que na maioria dos fungos infectados, os padrões de segmentos de genoma foram diferentes em termos de tamanho e número quando comparados com os micovírus descritos, sugerindo a existência de uma grande diversidade viral ainda não explorada.

A ocorrência de micovírus em *P. griseola* foi anteriormente demonstrado (Lima et al., 2010), onde aproximadamente 69% dos isolados analisados apresentaram dsRNA. No presente estudo foi detectado a presença de micovírus em 5 dos 6 isolados de *P. griseola* analisados. O isolado 63-47 apresentou um padrão de dsRNA contendo 11 segmentos totalizando aproximadamente um genoma com 24 kb. Similar tamanho de genoma também foi encontrado no isolado PG158 (26 Kpb), essas descobertas revelam a similaridade destes segmentos com membros da família *Reoviridae*. Segundo o ICTV o critério de demarcação da família *Reoviridae*, gênero *Mycoreovirus* baseia-se no tamanho do genoma, bem como no número de segmentos, que é de 11 a 12 segmentos de dsRNA e tamanho entre 19 e 32 Kbp. Contudo novas análises serão realizadas no sentido de encontrar a real identidade destes micovírus.

Não somente o número de segmentos do genoma, mas também a gama de hospedeiros e estrutura do capsídio são indicadores importantes que ajudam identificação dos micovírus dentro da família *Reoviridae* (King et al., 2011a), desta forma partículas virais serão purificadas e os ácidos nucléicos sequenciados para podermos determinar com precisão a classificação taxonômica destes micovírus.

O perfil dos dsRNA em gel de agarose da extração de dsRNA a partir do fungo *Geotrichum* sp. isolado CCF329 revelou um segmento com 5,0 kbp. A

presença de um único segmento com tamanho semelhante ao tamanho proposto para a família *Totiviridae* sugere que este possa estar infectado por um membro desta família a qual se caracteriza por abrigar membros contendo genoma monossegmentado com tamanho de genoma variando entre 4 e 7 kpb.

A semelhança entre os micovírus aqui apresentados com algumas famílias virais será futuramente investigada. O sequenciamento destes RNAs permitirão a correta identificação e posicionamento filogenético dos micovírus aqui detectados. As características biológicas dos fungos também serão analisadas para assim determinar os fatores que são afetados no fungo devido à infecção pelo micovírus.

A maioria das publicações descrevendo a presença de micovírus em fungos são de micovírus com genoma de dsRNA, e eles são classificados nas famílias *Endornaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae* e *Chrysoviridae* de acordo com o seu tamanho e número de segmentos (Ghabrial and Suzuki, 2009; King et al., 2011b), no entanto neste estudo encontramos micovírus com perfis de dsRNA diferentes dos apresentados nessas famílias, bem como em outros micovírus descritos e propostos em novas famílias até o momento.

Apesar de em grande parte das relações entre vírus e seus hospedeiros corresponder a infecções simples, ou seja, apenas um micovírus infectando seu hospedeiro, infecções múltiplas ou co-infecção em fungos filamentosos é passível de acontecer (Potgieter et al., 2013). Os micovírus estão presentes nos principais grupos de fungos filamentosos e um aumento em número de novos micovírus tem sido relatado (Ghabrial and Suzuki, 2009; Pearson et al., 2009). A busca por micovírus em diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos revelou uma diversidade de micovírus.

Esses achados contribuem para aprofundamento dos conhecimentos sobre micovírus e sua interação com o hospedeiro, visto que, há uma rica diversidade de micovírus infectando os diferentes gêneros de fungos aqui analisados. O presente trabalho fornece oportunidade de identificar os micovírus adequados para controle de doenças de plantas causadas por fungos, bem como expandir nosso conhecimento sobre os micovírus aqui detectados.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## **REFERÊNCIAS**

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., 1996. *Introductory Mycology*. 4 ed, New York.
- Bergamin Filho, A., 1995. Avaliação de danos e perdas. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Eds.), *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. Vol. 1. Agronômica Ceres, São Paulo pp. 672-690.
- Bianchini, A., Maringoni, A.C., M.T.P.G., C.S., 2005 Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (Eds.), *Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas*. . Vol. 4th. Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 333-349. .
- Dutton, M.V., Evans, C.S., 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* 42(9), 881-895.
- Ghabrial, S.A., Suzuki, N., 2009. Viruses of Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 47(1), 353-384.
- Ghini, R., Kimati, H., 2000. Resistência de fungos a fungicidas, 78 pp. 2 ed. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.

Gonzalez Garcia, V., Portal Onco, M.A., Rubio Susan, V., 2006. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research 4(1).

Hollings, M., Stone, O.M., 1971. Viruses that Infect Fungi. Annual Review of Phytopathology 9(1), 93-118.

Horita, H., Hatta, Y., 2016. Sour rot of carrot caused by *Geotrichum candidum* in Japan. Journal of General Plant Pathology 82(1), 65-68.

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. Archives of Virology 151(3), 563-579.

Hu, Z., Wu, S., Cheng, J., Fu, Y., Jiang, D., 2014. Molecular characterization of two positive-strand RNA viruses co-infecting a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. Virology 464-465.

Khalifa, M.E., Pearson, M.N., 2013. Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. Virology 441.

Khalifa, M.E., Pearson, M.N., 2014. Molecular characterisation of novel mitoviruses associated with *Sclerotinia sclerotiorum*. Archives of Virology 159(11), 3157-3160.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2011a. Family - Reoviridae, Virus Taxonomy. Elsevier, San Diego, pp. 541-637.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2011b. Part I. The Viruses, Virus Taxonomy. Elsevier, San Diego, pp. 10-14.

Lima, S.S., Abadio, A.K.R., Araujo, E.F., Kitajima, E.W., Sartorato, A., Queiroz, M.V., 2010. Mycovirus in *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of angular leaf spot in common bean. Canadian Journal of Microbiology 56(5), 359-365.

Muñoz-Adalia, E.J., Fernández, M.M., Diez, J.J., 2016. The use of mycoviruses in the control of forest diseases. Biocontrol Science and Technology 26(5), 577-604.

Özer, N., 2005. Determination of the fungi responsible for black point in bread wheat and effects of the diseases on emergence and seedling vigour. Trakya University Journal of Natural Sciences 6(1), 35-40.

Park, Y., James, D., Punja, Z.K., 2005. Co-infection by two distinct totivirus-like double-stranded RNA elements in *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*). Virus research 109(1), 71-85.

Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., Arthur, K., 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. Molecular Plant Pathology 10(1), 115-128.

Petrofeza, S., Nasser, L.C.B., 2012. Case Study : *Sclerotinia sclerotiorum*: Genetic Diversity and Disease Control. In: Caliskan, M. (Ed.), The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity, pp. 374.

Potgieter, C.A., Castillo, A., Castro, M., Cottet, L., Morales, A., 2013. A wild-type *Botrytis cinerea* strain co-infected by double-stranded RNA mycoviruses presents hypovirulence-associated traits. *Virology Journal* 10(1), 1-9.

Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J.-P., Guéguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *International Journal of Food Microbiology* 126(3), 327-332.

Preisig, O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., 1998. Coinfection of a Fungal Pathogen by Two Distinct Double-Stranded RNA Viruses. *Virology* 252(2), 399-406.

Purdy, L.H., 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. *Phytopathology* 69(8), 875-880.

Ran, H., Liu, L., Li, B., Cheng, J., Fu, Y., Jiang, D., Xie, J., 2016. Co-infection of a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* with a new botybirnavirus and a strain of a mitovirus. *Virology Journal* 13(1), 1-10.

Sartorato, A., 1988. Mancha angular. In: Zimmerman, M.J.d.O., Rocha, M., Yamada, T. (Eds.), *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato,, Piracicaba, Brazil, pp. 491-501.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1(6), 2856-2860.

Suprpta, D.N., Arai, K., Iwai, H., 1996. Parasitic specialization of *Geotrichum candidum* citrus race. *Mycoscience* 37(1), 105-107.

Tuomivirta, T.T., Hantula, J., 2005. Three unrelated viruses occur in a single isolate of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. *Virus research* 110(1-2), 31-39.

Tuomivirta, T.T., Kaitera, J., Hantula, J., 2009. A novel putative virus of *Gremmeniella abietina* type B (Ascomycota: Helotiaceae) has a composite genome with endornavirus affinities. *Journal of General Virology* 90(9), 2299-2305.

Vainio, E.J., Müller, M.M., Korhonen, K., Piri, T., Hantula, J., 2015. Viruses accumulate in aging infection centers of a fungal forest pathogen. *The ISME Journal* 9(2), 497-507.

Wagh, P.M., Bhale, U.N., 2012. Efficacy of chemical control against *Geotrichum candidum* Link ex fries on post-harvest *Manilkara achras* Mill. *Science Research Reporter* 2(1), 91-93.

Xie, J., Ghabrial, S.A., 2012. Molecular characterizations of two mitoviruses co-infecting a hyovirulent isolate of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology* 428(2), 77-85.

Xie, J., Jiang, D., 2014. New Insights into Mycoviruses and Exploration for the Biological Control of Crop Fungal Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 52(1), 45-68.

Xie, J., Wei, D., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., Ghabrial, S., Peng, Y., 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of General Virology* 87(1), 241-249.

**Tabela 1.** Isolados fúngicos procedentes de diferentes regiões do Brasil com suas respectivas plantas hospedeiras. Detecção de micovírus em 11 isolados (numerados de 1 a 11).

	<b>Isolado</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Estado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Fungo</b>	<b>Obtenção/Laboratórios</b>
1)	<b>Ss 24</b>	<b>Viçosa</b>	<b>MG</b>	<b>Pimentão</b>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<b>Genética de Micro-organismos - UFV</b>
	SSA 06A	Bom Jesus do Piauí	PI	Soja	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SSA 09A	Iraí de Minas	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SSA 09C	Iraí de Minas	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SSA 12A	Santa Tereza do Oeste	PR	Feijão Guandú	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SSA 12C	Santa Tereza do Oeste	PR	Feijão Guandú	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SSA 14C	Viçosa	MG	Repolho	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SSA 15A	São Desidério	BA	Soja	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
2)	<b>Ss 44</b>	<b>Viçosa</b>	<b>MG</b>	<b>Feijão</b>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<b>Genética de Micro-organismos - UFV</b>
	SSA 18B	Viçosa	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SS 9B	Canaã	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SS 35B	Coimbra	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SS 45B	Paracatu	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SS 61	Unai	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SS 62	Unai	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
	SS 62B	Unai	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV
SS 71B	Unai	MG	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Genética de Micro-organismos - UFV	
3)	<b>PG 01</b>	<b>Campo da Agronomia - UFV</b>	<b>MG</b>	<b>Feijão</b>	<i>Pseudocercospora griseola</i>	<b>Campo experimental da agronomia - UFV</b>
4)	<b>Pr 02</b>	<b>Campo da Agronomia - UFV</b>	<b>MG</b>	<b>Feijão</b>	<i>Pseudocercospora griseola</i>	<b>Campo experimental da agronomia - UFV</b>
	CM 12	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Feijão	<i>Pseudocercospora griseola</i>	Melhoramento do feijão - UFV
5)	<b>Pa2</b>	<b>Campo da Agronomia - UFV</b>	<b>MG</b>	<b>Feijão</b>	<i>Pseudocercospora griseola</i>	<b>Campo experimental da agronomia - UFV</b>
6)	<b>63-47</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Feijão</b>	<i>Pseudocercospora griseola</i>	<b>Melhoramento do feijão - UFV</b>
7)	<b>PG158</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Feijão</b>	<i>Pseudocercospora griseola</i>	<b>Melhoramento do feijão</b>
	CCF 52	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Orquídea	<i>Phytophthora</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 117	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Morango	<i>Pestalotia longisetula</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
8)	<b>CCF 119</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Cenoura</b>	<i>Chalara elegans</i>	<b>Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas</b>
	CCF 132	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Manga	<i>Dothiorella</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 239	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Alface	<i>Sclerotinia minor</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 246	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Maça	<i>Fusarium</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 285	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Maracujá	<i>Fusarium</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 286	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Mamão	<i>Fusarium</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 289	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Melão	<i>Fusarium alaranjado</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 296	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Abacate	<i>Lasiodiplodia</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 297	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Abacate	<i>Colletotrichum</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 303	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Maracujá	<i>Lasiodiplodia</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
	CCF 316	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Banana	<i>Fusarium oxysporum</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
CCF 321	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Abóbora	<i>Acrostalagnus</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas	
CCF 327	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Tomate	<i>Fusarium</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas	
9)	<b>CCF 329</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>Batata-doce</b>	<i>Geotrichum sp.</i>	<b>Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas</b>
	CCF 338	Dados não obtidos	Dados não obtidos	Mamão	<i>Fusarium</i>	Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de plantas
10	<b>Ce 01</b>	<b>Feira livre Viçosa/MG</b>	<b>MG</b>	<b>Cenoura</b>	<i>Chalara elegans</i>	<b>Feira livre em Viçosa/MG</b>
11	<b>CeRS 01</b>	<b>Dados não obtidos</b>	<b>RS</b>	-	<i>Chalara elegans</i>	<b>Agrônômica – Lab. de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria/RS</b>

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de dsRNA de amostras extraídas de isolados de *C. elegans*. Todas as amostras foram tratadas com DNase e S1 Nuclease (Promega). Tamanhos dos dsRNAs (direita) e marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) (Linha M) são expressos em Kilobases (kb). (A) Isolado CCF 119. (B) Isolado Ce 01. (C) Isolado CeRS 01.

**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de dsRNA de amostras extraídas de isolados de *P. griseola*. Todas as amostras foram tratadas com DNase e S1 Nuclease (Promega). Tamanhos dos dsRNAs (direita) e marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) (Linha M) são expressos em Kilobases (kb). (A) Isolado PG 01. (B) Isolado PG 158. (C) Isolado Pa 02. (D) Isolado Pr 02. (E) Isolado 63-47.

**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de dsRNA de amostras extraídas de isolados de *S. sclerotiorum*. Todas as amostras foram tratadas com DNase e S1 Nuclease (Promega). Tamanhos dos dsRNAs (direita) e marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) (Linha M) são expressos em Kilobases (kb). (A) Isolado Ss 24. (B) Isolado Ss 44.

**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de dsRNA de uma amostra extraída de *Geotrichum* sp. A amostra foi tratada com DNase e S1 Nuclease (Promega). Tamanhos do dsRNA (direita) e marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) (Linha M) são expressos em Kilobases (kb).

**Figura 5.** Características genômicas e morfologia de partículas do isolado CCF 119 de *C. elegans*. (A) Perfil de ácidos nucleicos extraídos a partir da purificação viral (Linha 1) em comparação com perfil de dsRNA extraído diretamente do micélio (Linha 2). Tamanho dos segmentos e marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) (Linha M) são expressos em Kilobases (kb). (B) Micrografia Eletrônica das partículas virais purificadas por centrifugação diferencial em gradiente de densidade de sacarose, coradas negativamente com Acetato de Uranila 1% e observada em microscópio eletrônico de transmissão modelo EM 109. A barra de escala indica 100 nm. (C) análise em SDS/PAGE das partículas virais purificada apresentando três componentes protéicos com 38, 40 e 45 kDa. O tamanho das proteínas coradas em Coomassie blue foi estimada por comparação com o marcador de proteína (Linha M) (Precision Plus protein<sup>TM</sup> ; Promega). Os números na figura indicam os tamanhos moleculares expressos em Kilodalton (kDa).

Figura 1.

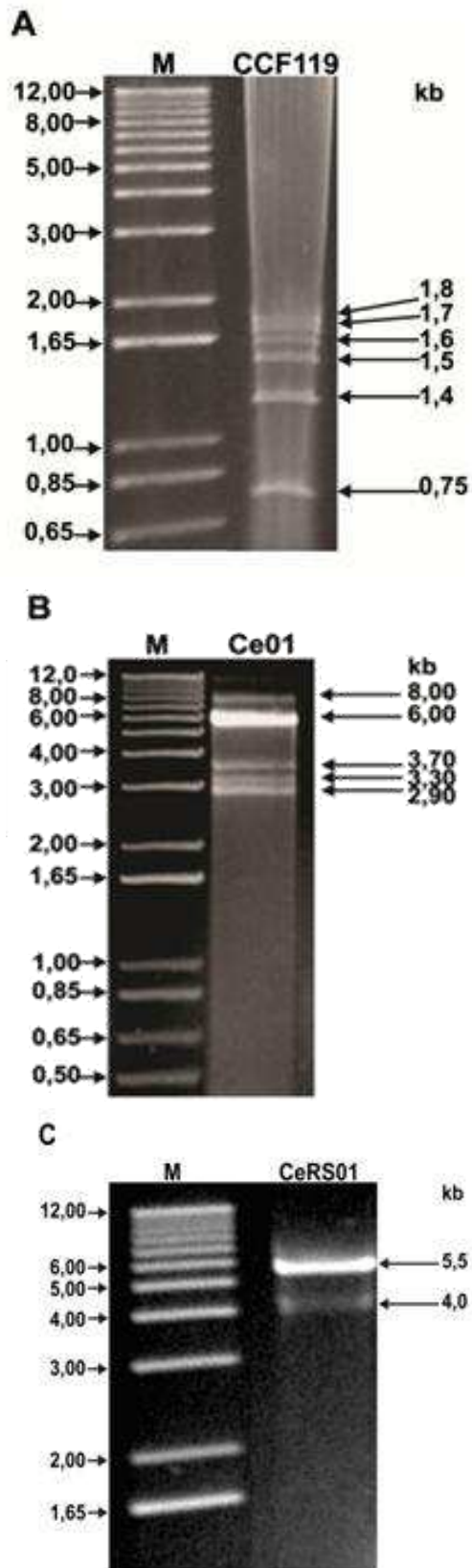


Figura 2.

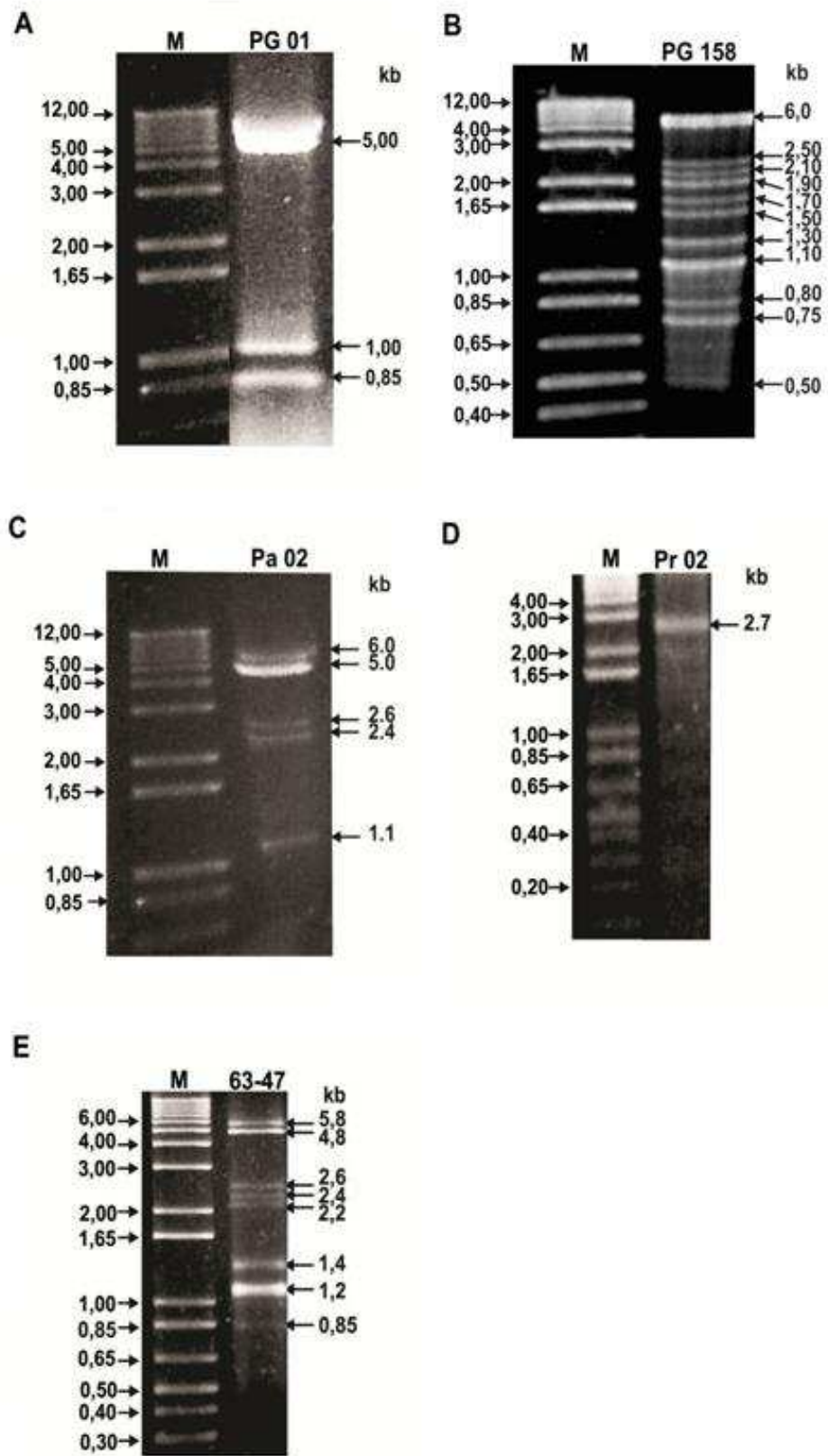
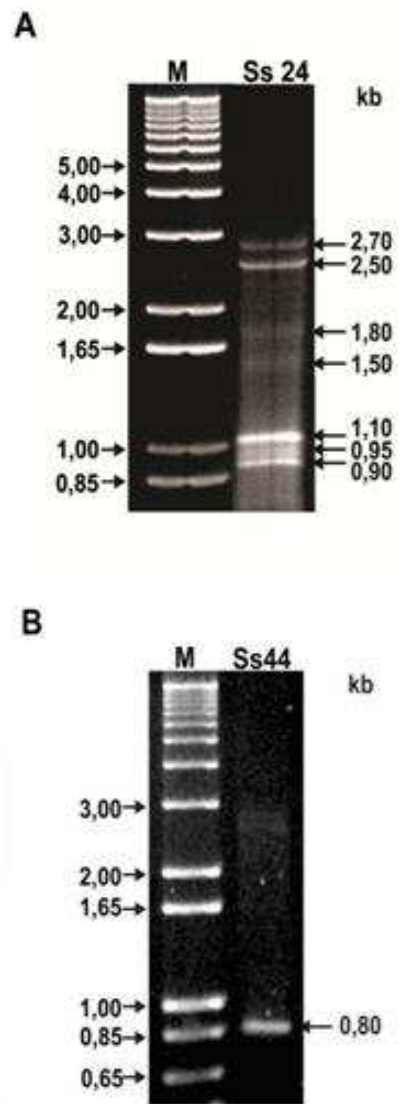


Figura 3.



**Figura 4.**

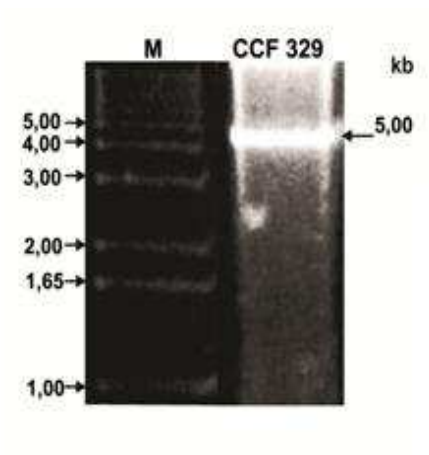
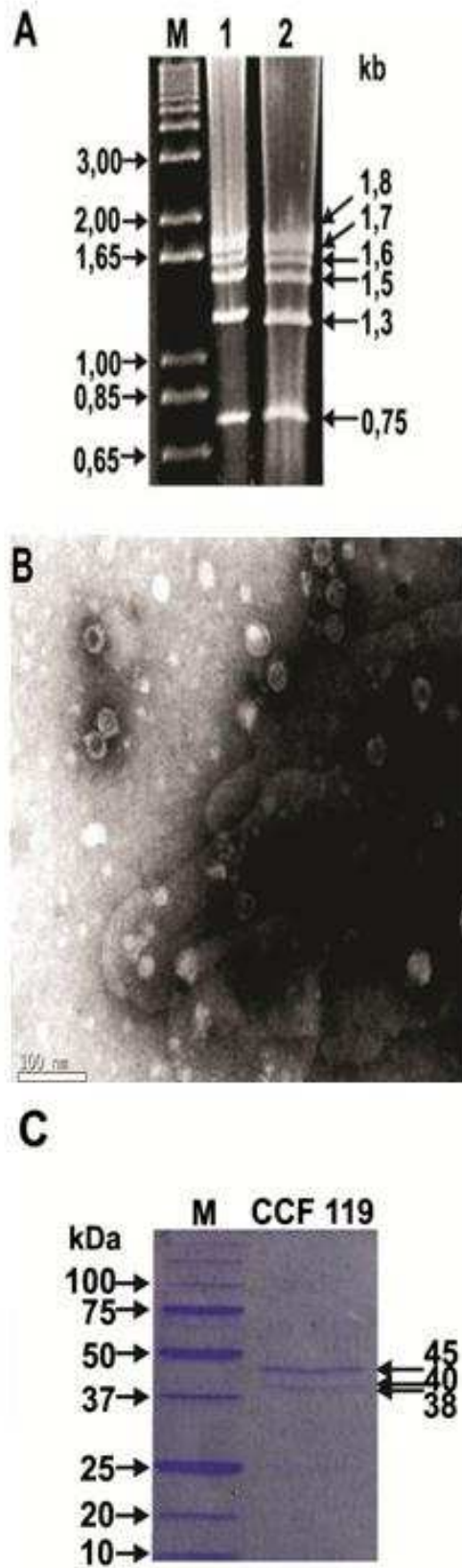


Figura 5.



## CAPÍTULO II

### MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A MITOVIRUS INFECTING *Sclerotinia sclerotiorum*

Barros, A.P.O., Xavier, A.S. Lima, T.T.M., Vidigal, P.M.P., Queiroz, M.V. Alfenas-Zerbini, P. Molecular and biological characterization of a mitovirus infecting *Sclerotinia sclerotiorum*. In preparation for submission.

**MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A  
MITOVIRUS INFECTING *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM***

Ana P. O. de Barros<sup>1</sup>, André da S. Xavier<sup>2</sup>, Thamylles Thuany Mayrink Lima<sup>1</sup>, Pedro M. P. Vidigal<sup>3</sup>, Marisa V. de Queiroz<sup>1</sup>, Poliane A. Zerbini<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Análises de Biomoléculas, Universidade Federal de Viçosa, MG 36570-900, Brazil,

# Corresponding author: Poliane Alfenas Zerbini

Phone: (+55-31) 3899-2955; Fax: (+55-31) 3899-2553;

E-mail: [palfenas@ufv.br](mailto:palfenas@ufv.br)

**KEYWORDS:** *Mycovirus*, *Mitovirus*, *Hypovirulence*, *White mold*, *biological control*

**ABSTRACT**

The mycovirus are distributed in the major taxonomic groups of fungi. In some associations, the presence of viral infection produces hypovirulence of the host. It is the subject of studies as potential agents for biocontrol of plant pathogenic fungi. *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of white mold has caused great losses in crops economic importance. In this context, the aim of this study was to detect the

presence and characterize double-stranded RNAs in *S. sclerotiorum* and investigate the relationship between the mycovirus presence and virulence of the fungus. Was detected a 2.7 kb double-stranded RNA (dsRNA) element in a strain of *S. sclerotiorum* corresponding to the genome of a *Mitovirus*, family *Narnaviridae*. The strain infected showed pronounced changes in the phenotype such as, alterations in growth rate, morphology and colony pigmentation, drastic reduction in the number of sclerotia, low production of oxalic acid (OA), as well as reduced aggressiveness in plants. This distinctive pattern observed in the infected host suggests that mycovirus it is responsible for modulating features physiological characteristics of the host. These findings offer potential for use of this mycovirus as tools for studies on the mechanisms of pathogenicity as well as the use of these viruses as biocontrol agents.

## **INTRODUCTION**

The mycovirus (viruses that infect fungi) can establish associations with their hosts latently or some may alter host phenotype causing hypervirulence (Ahn and Lee, 2001; Khalifa and Pearson, 2013; Khalifa and Pearson, 2014a; Ran et al., 2016; Xie and Ghabrial, 2012) or hypovirulence, which is a promising phenomenon and stands out for mycovirus's ability to attenuate the virulence of the host fungus (McCabe and Van Alfen, 1999). The hypovirulence can be transmitted from a strain to another (Nuss, 1992), a feature that can be exploited in the biological control of fungal diseases (Xie and Jiang, 2014).

The mycovirus are present in the major taxonomic groups of fungi. They are distributed in seven families with genome dsRNA, five families with single-stranded RNA genome (ssRNA) ([www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)) and a single mycovirus with ssDNA genome (Yu et al., 2013) as well as new taxa are being proposed. The family

*Narnaviridae* comprise two genera, *Narnavirus* and *Mitovirus*, which show genome positive-sense single-stranded RNA, unencapsidated consist of only a single open reading frame (ORF) coding for a putative RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

Genetics and biochemical evidence shows that mitovirus are located in fungal mitochondria and can be transmitted to uninfected strains by hyphal fusion or through asexual spores (King et al., 2011). *Sclerotinia sclerotiorum* is a fungus necrotrophic with broad host range. Over 400 species of plants worldwide, including economically important crops and weeds are infected by this pathogen, both dicotyledons as monocots (Boland, 2004). Formation of a white mycelium on the host is a major sign. With the progress of the disease occurs the wilting of the tissue and sclerotia formation in high humidity conditions (Bolton et al., 2006), which remain be produced in diseased tissues even after separating from the living plant thereby increasing the amount of inoculum in soil (Petrofeza and Nasser, 2012). The oxalic acid has proven to be a determinant of pathogenicity of *S. sclerotiorum* and other pathogenic fungi (Rollins and Dickman, 2001). However, the infection by mycovirus can lead to alterations in the production of the oxalic acid, as well as changes in diverse biological processes of the fungus host and wide range of mycoviruses has been described to infect *S. sclerotiorum*. Some of the described mycoviruses confer hypovirulence which may result in pronounced changes including reduction in mycelial growth, increased pigmentation, reduced virulence, cytological alterations (Hu et al., 2014; Khalifa and Pearson, 2013; Khalifa and Pearson, 2014b; Li et al., 2016; Liu et al., 2009; Liu et al., 2015; Liu et al.; Ran et al., 2016; Xiao et al., 2014; Xie et al., 2006; Xie et al., 2011; Xu et al., 2015; Yu et al., 2010; Zhang et al., 2009)

In this study we present a mycovirus infecting a strain *S. sclerotiorum* obtained from the collection of phytopathogenic fungal cultures of laboratory of Genetics laboratory of Micro-organisms of Universidade Federal de Viçosa. Our aim is to characterize biological and molecular properties of mycovirus infecting the strain Ss24 e to contrast the physiology of fungal isogenic genetically lines but different in terms of viral presence of mycovirus. To study their impact on the physiology of the host considering the growth rate, pigmentation mycelia, aggressiveness, sclerotia production and the production of oxalic acid.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Obtaining fungal and culture conditions**

*Sclerotinia sclerotiorum* strain Ss-24 was obtained from the collection of the fungal cultures of the Genetics laboratory of Micro-organisms of the Universidade Federal de Vicoso. The strains was maintained on potato dextrose agar (PDA), incubated at 22 ° C in the dark for 5 days. For the extraction of nucleic acids, the strain Ss-24 was grown on cellophane membranes on top of PDA plates under the same conditions described above.

### **Detection and isolation of dsRNAs**

The extraction of dsRNA was performed as described by (Morris and Dodds 1979). After extraction, the dsRNA was treated with DNase (Promega) and S1 nuclease (Promega) to remove residual DNA and ssRNA. dsRNA was separated by electrophoresis on an agarose gel (0.8 %, w/v). The gel was stained with ethidium bromide.

### **Sequencing, *de novo* assembly and bioinformatic analysis**

The sequencing of dsRNA molecules was done using Illumina HiSeq 2000 platform (Macrogen Inc. Seoul, Soul Korea). The sequences of reads were analyzed using CLC Genomics Workbench software version 6.5.1 (CLCbio). The reads were trimmed using the criterion of Q30, the ambiguous nucleotides were removed and the smaller 75 nt sequences were excluded from the data set. After this processing, sequences were selected, aligned and mapped in the reference genome *Sclerotinia sclerotiorum* 1980 (GenBank: NW\_001820797 - NW\_001820835). The sequences of reads not lined up the genome of the fungus were selected and assembled into contigs using the *de novo* assembly from algorithm CLC Genomics Workbench.

### **Phylogenetic analysis**

The 5' and 3' untranslated regions (UTRs) were examined for the potential formation of secondary structures using the MFOLD program version 2.3 (<http://mfold.rna.albany.edu/>).

Multiple alignments of the RdRps amino acid sequences of Ss24 strain and other members of the family *Narnaviridae* were constructed using the Clustal W and multiple alignment were performed in MEGA version 6 (Tamura et al., 2013). The phylogenetic tree was generated by neighbor-joining method with 1000 re-samplings, conducted in MEGA version 6. Full-length aminoacids (aa) sequences of RdRps of Ss24 and members of the of the members of family *Narnaviridae* were used. *Saccharomyces 23S RNA narnavirus* was used as an outgroup.

## **Biological properties**

A isogenic strain (*Sclerotinia sclerotiorum* strain 24 mitovirus-free - Ss24MVF), obtained by sexual reproduction, different from its parent only for the loss of three segments of dsRNA was gentily given by master's student Aline Duarte Batista. This strain was used in biological assays to compare the physiological characteristics with its parental, the strain Ss24. For determining the biological properties of strain Ss24 and Ss24MVF, mycelial agar discs with 5 mm diameter cut from the margin of actively growing colony were carefully placed individually in Petri plates containing PDA and incubated at 22°C under dark conditions. The mycelial growth was measured daily for 10 days. Pigmentation, colony morphology and formation of sclerotia was measured after 10 days. The pathogenicity and aggressiveness of each strain was determined under laboratory conditions by inoculating mycelial agar discs in detached leaves of bean, nicotiana and pepper (*Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum*, respectively). The pathogenicity and aggressiveness evolution was also evaluated under greenhouse conditions by inoculation of plant *P. vulgaris* with mycelial agar discs at the leaves and stems. Subsequently, the plants were incubated at 22° C ± 2° C, high humidity (100%) and evaluated for 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation (hpi). The tests was repeated four times.

## **Cytological analysis of fungal hyphae by transmission electron microscopy**

### **(TEM)**

Mycelium samples (02 mm<sup>3</sup>) of Ss24 and 24MVF were excised from the cultures with four days growth and processed for comparing the cytological effect of viral infection. The methodology used in this study was the same used by (Benhamou et

al., 1999). Ultrathin sections of both strain were collected on Formvar-coated nickel grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for direct examination with a Transmission Electron Microscope, Zeiss Model EM 109. For each sample, 12 ultrathin sections were examined.

### **Qualitative determination of total acids production and quantification of oxalic acid**

The quantification of OA present in each strain fungal used in this study was determined by incubation statically at room temperature of the mycelium discs (5 mm of diameter), removed from margin of colonies with active growth and individually transferred to flasks containing 100 ml potato dextrose broth (PD) by 15 days. The pH was measured and the supernatant was used for quantification of oxalic acid through a liquid chromatography system of ultra efficiency (UPLC Agilent series 1290) coupled to the mass spectrometer triple quadrupole (UPLC / MS / MS). Chromatographic separations were performed using an analytical C18 Agilent Zorbax Eclipse (1.8  $\mu$ m, 2.1 mm x 50 mm) column temperature controlled at 35 °C. We used an isocratic flow at 97% water and 3 % acetonitrile at a flow rate of 0.4 ml min<sup>-1</sup>. The sample injection volume was 5 or 10  $\mu$ L according to the acid concentration in each sample. The eluate was introduced into mass spectrometer through an ESI source in negative mode. The acids were identified at a time analysis 1.5 minutes using SIM mode (single ion monitoring).

The production of total acids was qualitatively estimated by inoculation of strains in Petri dishes containing PDA + Bromophenol blue (0.05% w/v) and incubated at 22 °C in the dark for 5 days. The determination of acid production was

observed by the color change from blue to yellow culture medium. The experiment was repeated four times.

### **Statistical analysis**

Data on mycelial growth rate, sclerotia production were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the Sisvar program. The average of the treatments were compared to the least significant difference test (LSD) at  $p \leq 0.05$  level.

## **RESULTS**

### **dsRNA banding patterns**

Agarose gel electrophoresis revealed the presence of seven segments dsRNAs in Ss24 strain with sizes ranging between 0.9 and 2.7 kb (Figure 1) which was verified to be dsRNA given its resistance to digestion with DNase I and S1nuclease suggesting infection by mycovirus.

### **Sequencing and virus identification**

The dsRNAs present in the strain Ss24 were sequenced and from the total number of sequencing data, 97,43% of bases had the minimum quality score of 20(Q20) and 95,47% of 30(Q30), with a GC content of 48,43%. Illumina paired-end sequencing of the cDNAs of the strain Ss24 generated 13,329,052 reads, containing sequences of 101 nt. The reads were trimmed using the criterion of Q30 and sequences smaller than 50 nt were excluded from the data set. After this processing, 9,647,604 (72.38%) sequences were selected. The sequences were then aligned in the reference genome of *Sclerotinia sclerotiorum* 1980 (GenBank: NW\_001820797 - NW\_001820835). In this alignment, 77.13% of the reads were mapped in the

reference genome. The sequences of 2,394,795 reads that not lined up the genome of the fungus *S. sclerotiorum* were selected and assembled generating 363 contigs using the De Novo Assembly algorithm, CLC Genomics Workbench software version 6.5.1 (CLCbio). Among the sequences obtained, one contig with 2.700 nt, with a coverage 20.232X, showed 89% identity with the genome *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 6 (KJ462512). The remaining contigs show no similarity to mycovirus sequences deposited in GenBank database.

### **Genome organization and Sequence determination**

The complete nucleotide sequences of the dsRNA segment with 2,7 kb shown in Figura 1 was determined and the genetic organization observed (Figura 2). One single large ORF in the positions nucleotide 355-2502, predicted to encode a protein of 715 aa with a molecular mass of 80,27 kDa was detected on the positive strand of the dsRNA when mitochondrial codon usage was applied. The expression of this protein codes for a RdRp that is required for RNA replication (Figura 2).

Was detected the dsRNA replicative form of a mitovirus. A BLAST search using the deduced amino acid sequence of the ORF indicated that it shared similarity significant to known mitoviral-RdRps. The amino acid sequence of the RdRp detected in this study showed 95% similarity to the previously described *S. sclerotiorum* mitovirus 6 (GenBank accession no. AHX84133). Interestingly, we found that SsMV6/24 also shares the highest sequence similarity with a *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 14 (GenBank accession no. AHF48630) and *Macrophomina phaseolina* mitovirus 1 (GenBank accession no. ALD89100) with percent identity of these proteins of 96%, 95%, respectively. Based in the criterion of species demarcation within the genus *Mitovirus* are considered the same species strains that

have RdRp amino acid sequence identities greater than 90%. So the mycovirus characterized in this study, as well as *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 6 isolate 14563, *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 14 and *Macrophomina phaseolina* mitovirus 1 are strain from the same species and tentatively assigned the acronym SsMV6/24. The complete nucleotide sequence of SsMV6/24 will in future be deposited in the Genbank database.

### **Predicted secondary structures of the 5' and 3' UTRs**

The ORF of SsMV6/24 genome is flanked by 354-nt long 5' (UTR) and 198-nt long 3' UTR with no polyadenylated tail. The potential secondary structures of the 5' and 3' UTRs were predicted using MFOLD program (<http://unafold.rna.albany.edu/>). The results revealed that the terminal sequence of 3' and 5' of SsMV6/24 could be folded into potential stable stem-loop structures. The free energy ( $\Delta G$ ) values of the stem-loop structures at the 5' UTR at nucleotide position 1-50 and 3' UTRs at position 2633-2700 were -15.10 kcal/mol and -14.00 kcal/mol, respectively (Figura 3).

### **Multiple alignments of RdRps and phylogenetic analysis**

Multiple alignments of RdRps amino acid sequences of the mycoviruses were constructed using the MEGA version 6 program. The analyses revealed six conserved motifs (I- VI) characteristic of mitovirus RdRps, including the highly conserved GDD motif typical of RdRp (Figura 4).

Phylogenetic analysis of the RdRps sequences of SsMV6/24 and 24 other members of the family *Narnaviridae* showed that the putative RdRp of SsMV6/24 was clusters with mycovirus that infect same (*S. sclerotiorum*) and different host

species and (*Macrophomina phaseolina*). Though SsMV6/24 group with a member of the same family (*Sclerotiniaceae*) also grouped with member of a family distantly related (*Botryosphaeriaceae*) (Figura 5), an unusual phenomenon in which a mycovirus infects species which are distantly related (Wu et al., 2010).

### **Biological properties of strains Ss24 and Ss24MVF**

We observed significantly difference in strain Ss24, which exhibited a phenotype debilitating in relation to its isogenic Ss24MVF. It was possible to observe alterations in the morphology and colony pigmentation (Figura 6A). Lower sclerotia production (Figura 6B). Aggressiveness on detached leaves of bean, nicotiana, and pepper (*P. vulgaris*, *N. benthamiana* and *C. annuum*, respectively) (Figura 6C). Reduced growth rate (Figura 6D). Significant reduction of oxalic acid production (Figura 6E). Aggressiveness on detached plants of bean bean inoculated in leaves and stem (*P. vulgaris*) (Figura 6F).

### **Cytologic effect of the infection by mitovirus**

Micrographs electronic transmission of Ss24 strains were evaluated with emphasis on cell structure in terms of morphology and abundance of mitochondria. The strain Ss24MVF, that is not infected with mitovirus, was used as control. Analyze from hyphae of Ss24 strain revealed greater abundance of mitochondrias and normal mitochondrial morphology, oblong in shape containing abundant cristae whereas the strain Ss24MVF used as control showed normal morphology but low number of mitochondria (Figura 7).

## **Qualitative determination of total acids production and quantification of oxalic acid**

Qualitative determination of production acids by Ss24 and Ss24MVF strains was demonstrated by color change from blue to yellow, resulting from reduction pH due to acidification of the medium. Ss24MVF secretes a larger amount of acids in the medium, while Ss24 under the same conditions, showed a less pronounced color change, indicating lower amount of acids secreted (Supplementary figure S2). To validate these results and to evaluate ratio of oxalic acid secreted by the fungus, An aliquot of growth medium from both strains was recovered and subjected to quantification by Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC). The OA was successfully quantified and the concentration in the strain Ss24MVF was 35 times more abundant than in strain Ss24 (Figura 6E).

## **DISCUSSION**

In the study, the complete sequence of the 2.7 kb dsRNA extracted from the hypovirulent strain of *S. sclerotiorum* (Ss24) was determined. Sequence analysis revealed that this genome codes for RdRp only when the mitochondrial codon usages were utilized suggesting that this dsRNA belongs to the genus *Mitovirus* of the family *Narnaviridae*. An initial analysis using the Blast revealed that the RdRp encoded by Ss24MV6/24 is more closely related to *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 14 (GenBank accession: AHF48630.1), *Macrophomina phaseolina* mitovirus 1 (GenBank accession: ALD89100.1) and *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 6 (GenBank accession: AHX84134.1), with higher sequence identity (96%, 95% and 95% respectively). The phylogenetic tree generated based on RdRp sequence alignment divided mitoviruses in six clusters. SsMV6/24 group with

SsMV6, SsMV14 in a clade with high bootstrap value. The mitovirus that infects the genus *Sclerotinia* grouped separately in different clades. Similar observations also were made in *Botrytis cinerea*, *Ophiostoma novo-ulmi* and *Rhizoctonia solani* (Hintz et al., 2013) that were distributed discontinuously in the phylogenetic tree, suggesting a complex origins and evolutionary relationships between mitoviruses. Identical mitovirus have been reported in distinct species and genus, suggesting that the transmission of mycovirus can occurs in nature (Hillman and Esteban, 2011). Additionally a classification of sequences viral RdRPs based on sequence pairwise identity using Sequence Demarcation Tool Version 1.2 showed that RdRp of SsMV6 shares more 98% identity with SsMV14 and 94% with SsMV6/24 (Supplementary Figure S1). According to the International Committee of viral taxonomy (ICTV) which considers members of a same species those whose amino acid sequence identities of putative RdRp proteins are greater than 90% (Hillman and Esteban, 2011), these mitovirus then are members of the same species.

The result of sequencing of all dsRNAs segments found in strain Ss24 revealed 362 contigs that showed no similarity with sequences in the database. Due to this unavailability of representative viral genomic sequences, many new viruses have not yet been revealed. Future analyzes will be conducted to unravel the nature of dsRNAs found in *S. sclerotiorum* strain Ss24.

The presence of stem-loop structures at both 5' and 3' ends is a characteristic feature of the fungal mitochondrial mycovirus RNAs (Hong et al., 1998). We show that the 5' and 3' UTRs ends of SsMV6/24 could be folded into stem-loop structures with a  $\Delta G$  value of  $-15.1$  kcal/mol and  $-14.0$  kcal/mol, respectively. It has been suggested that the presence of stem-loop structures in mitoviruses, may play an important role in replication, transcription and protection of naked single stranded

RNA from degradation (Hong et al., 1998; Hong et al., 1999) Analysis of the amino acid sequence of SsMV6/24 showed the typical RdRps motifs (I-VI) including conserved GDD motifs of the superfamilies of RNAs polymerases found in other mitovirus (Khalifa and Pearson, 2013; Khalifa and Pearson, 2014b; Park et al., 2006; Ran et al., 2016; Wu et al., 2010; Xie and Ghabrial, 2012; Xu et al., 2015) confirming that SsMV6/24 is closely related to previously described mitoviruses.

Most mitovirus described so far are associated with hypovirulence phenomenon in their hosts (Deng and Boland, 2006; Deng et al., 2003; Hong et al., 1999; Khalifa and Pearson, 2013; Polashock and Hillman, 1994; Ran et al., 2016; Wu et al., 2012; Wu et al., 2010; Xu et al., 2015). In *S. sclerotiorum*, the hypovirulence is usually associated with fungi that show mixed infections (Khalifa and Pearson, 2013; Khalifa and Pearson, 2014b; Ran et al., 2016; Xie and Ghabrial, 2012). However, this study, it is still not clear whether the mitovirus are responsible for hypovirulence.

The mitochondria play important functions to cells providing energy which help in maintenance of the cellular processes. Previous studies showed that the loss of mitochondrial genes detracted the germination and production of ascospores. On the other hand, a moderate increase in the expression of these genes may be sufficient to improve ascospore production significantly, influencing the development of the fungus, an important factor for sexual reproduction of fungi (Déquard-Chablat et al., 2011). The virus in turn, create strategies to establish complex relationships with the host with the aim of preserve its existence. A strategies is alter the intracellular distribution of mitochondria and modulate their functions in favor own inducing or inhibiting some processes allowing replication and generation of viral progeny (Anand and Tikoo, 2013).

Since mitochondria replication site of mitovirus, an increased number of these may be beneficial for the mitovirus. Numerous mitochondria with oblong and oval shapes, and normal appearance containing abundant cristae intact in hyphae were observed in the strain Ss24, while in the strain Ss24MVF few mitochondria but with similar shape and size were observed.

It was observed that the accumulation of oxalic acid is much higher in free strain mitovirus free (Ss24MVF) while the strain hypovirulent Ss24 what showed reduced levels of OA. The strain Ss24 weakened of their biological functions, could not overcome the defenses of plants. Once the plants have effective mechanisms to address and adapt to different types of stress, including microbial infection. When the pathogen is detected, the signaling pathways are quickly activated in an attempt to prevent entry of the pathogen. We observed that the strain Ss24 showed debilitating characteristics, including low secretion of oxalic acid, the major pathogenic factor. This weakening may have given the advantage the plant to defend itself from infection by activating defense mechanisms. The generation of ROS (e.g., hydrogen peroxide and superoxide) is a plant responses to biotic stress and results in the programmed cell death (PCD) in the pathogen entry site. The appearance of small lesions in the inoculated plants with the strain Ss24 only 72 hours after inoculation led us to hypothesize that those observed symptoms could be a plant defense response and not a lesion caused by the pathogen. We conduct then an assay using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) to assess whether the observed lesion corresponded to the pathogen or be a plant defense response. Being a defense response, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> would be detected because the DAB form brownish insoluble polymer when reacts with hydrogen peroxide. This precipitation becomes visible after chlorophyll removing with 96% EtOH. It was then made DAB infiltration of leaves and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

was detected in leaves infiltrated showing the release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pathogen entry site (data not shown). This result showed that the lesions observed corresponded to the plant defense response and no injury caused by the pathogen.

Addition to alterations in the mitochondria and production of oxalic acid we observe that the other biochemical processes of strain Ss24 were affected as reduction of oxalic acid production, changes in pigmentation of the colony and alterations in the morphology of the strain. Different correlations were observed between isogenic strain, Ss24 and Ss24MVF. While the virulent strain (Ss24MVF) showed normal development, the strain hypovirulent (Ss 24) was severely weakened presenting low production of sclerotia, slow growth, changes in pigmentation of the colony, deficient in the production of oxalic acid and loss of pathogenicity. These strains differ only by the loss of three segments of dsRNA. The hypovirulence strain Ss24 may be related to dsRNA segments which are absent in strain Ss24MVF. However, sequencing revealed the nature only a single segment of dsRNA to 2.7 kb. Future analyzes will be conducted to determine the nature of the other segments and to improve our understanding of the mechanisms used by viruses that affect the virulence of the host fungus. One approach also be made in order to identify the potential of these hypovirulent fungi as biological control agents virus.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## REFERENCES

- Ahn, I.I.P., Lee, Y.-H., 2001. A Viral Double-Stranded RNA Up Regulates the Fungal Virulence of *Nectria radicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(4), 496-507.
- Anand, S.K., Tikoo, S.K., 2013. Viruses as Modulators of Mitochondrial Functions. Vol. 2013, pp. 17.
- Benhamou, N., Rey, P., Picard, K., Tirilly, Y., 1999. Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction Between the Mycoparasite *Pythium oligandrum* and Soilborne Plant Pathogens. *Phytopathology* 89(6), 506-517.
- Boland, G.J., 2004. Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26(1), 6-18.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J., Nelson, B.D., 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7(1), 1-16.
- Deng, F., Boland, G.J., 2006. Attenuation of Virulence in *Sclerotinia homoeocarpa* during Storage is Associated with Latent Infection by *Ophiostoma mitovirus 3a*. Vol. 114, pp. 127-137.
- 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*. *Phytopathology* 93(11), 1407-1414.
- Déquard-Chablat, M., Sellem, C.H., Golik, P., Bidard, F., Martos, A., Bietenhader, M., di Rago, J.-P., Sainsard-Chanet, A., Hermann-Le Denmat, S., Contamine, V., 2011. hTwo Nuclear Life Cycle-Regulated Genes Encode Interchangeable Subunits c of Mitochondrial ATP Synthase in *Podospira anserina*. In: Evolution, M.B.a. (Ed.). Vol. 28, pp. 2063-2075.
- Hillman, B.I., Esteban, R., 2011. Narnaviridae: In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (Eds) *Virus taxonomie: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Elsevier, 1055-1060.
- Hintz, W.E., Carneiro, J.S., Kassatenko, I., Varga, A., James, D., 2013. Two novel mitoviruses from a Canadian isolate of the Dutch elm pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* (93â€“1224). *Virology Journal* 10, 252-252.
- Hong, Y., Cole, T.E., Brasier, C.M., Buck, K.W., 1998. Evolutionary Relationships among Putative RNA-Dependent RNA Polymerases Encoded by a Mitochondrial Virus-like 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(1), 118-127.
- Hu, Z., Wu, S., Cheng, J., Fu, Y., Jiang, D., 2014. Molecular characterization of two positive-strand RNA viruses co-infecting a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology* 464–465.
- Khalifa, M.E., Pearson, M.N., 2013. Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. *Virology* 441(1), 22-30.
- Khalifa, M.E., Pearson, M.N., 2014a. Characterisation of a novel hypovirus from *Sclerotinia sclerotiorum* potentially representing a new genus within the *Hypoviridae*. *Virology* 464-465(0), 441-449.
- Khalifa, M.E., Pearson, M.N., 2014b. Molecular characterisation of novel mitoviruses associated with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Archives of Virology* 159(11), 3157-3160.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2011. Family - Narnaviridae, *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, . Elsevier, San Diego, pp. 1055-1060.
- 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 research* 219, 92-99.
- Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Peng, Y., Yi, X., Ghabrial, S.A., 2009. A novel mycovirus that is related to the human pathogen Hepatitis E virus and rubi-like viruses. *Journal of Virology* 83.
- Liu, L., Wang, Q., Cheng, J., Fu, Y., Jiang, D., Xie, J., 2015. Molecular characterization of a bipartite double-stranded RNA virus and its satellite-like RNA co-infecting the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology* 6(406).
- Liu, L., Xie, J., Cheng, J., Fu, Y., Li, G., Yi, X., Jiang, D., Fungal negative-stranded RNA virus that is related to bornaviruses and nyaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(33), 12205-12210.
- McCabe, P.M., Van Alfen, N.K., 1999. Secretion of Cryparin, a Fungal Hydrophobin. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12), 5431-5435.
- Nuss, D.L., 1992. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews* 56(4), 561-576.

Park, Y., Chen, X., Punja, Z.K., 2006. Molecular and biological characterization of a mitovirus in *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*). *Phytopathology* 96.

Petrofeza, S., Nasser, L.C.B., 2012. Case Study : *Sclerotinia sclerotiorum*: Genetic Diversity and Disease Control. In: Caliskan, M. (Ed.), *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*, pp. 374.

Polashock, J.J., Hillman, B.I., 1994. A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(18), 8680-8684.

Ran, H., Liu, L., Li, B., Cheng, J., Fu, Y., Jiang, D., Xie, J., 2016. Co-infection of a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* with a new botybirnavirus and a strain of a mitovirus. *Virology Journal* 13(1), 1-10.

Rollins, J.A., Dickman, M.B., 2001. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a pacC/RIM1 Homolog. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1), 75-81.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30.

Wu, M., Jin, F., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D., 2012. Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Botrytis porri*. *J Virol* 86.

Wu, M., Zhang, L., Li, G., Jiang, D., Ghabrial, S.A., 2010. Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology* 406(1), 117-126.

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. *Journal of Virology* 88(17), 10120-10133.

Xie, J., Ghabrial, S.A., 2012. Molecular characterizations of two mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology* 428(2), 77-85.

Xie, J., Jiang, D., 2014. New Insights into Mycoviruses and Exploration for the Biological Control of Crop Fungal Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 52(1), 45-68.

Xie, J., Wei, D., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., Ghabrial, S., Peng, Y., 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of General Virology* 87(1), 241-249.

Xie, J., Xiao, X., Fu, Y., Liu, H., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Jiang, D., 2011. A novel mycovirus closely related to hypoviruses that infects the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology* 418(1), 49-56.

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 research* 197, 127-136.

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y., Xie, J., Cheng, J., Huang, J., Yi, X., 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(18), 8387-8392.

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., Jiang, D., 2013. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(4), 1452-1457.

Zhang, L., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., 2009. A novel virus that infecting hypovirulent strain XG36-1 of plant fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology Journal* 6(1), 1-9.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of dsRNA from the mycelium of *S. sclerotiorum* strain 24 (Ss24) and isogenic, free dsRNA mitoviral (Ss24MVF). Total nucleic acid was purified by digestion with DNase I and S1 nuclease prior to electrophoresis on a 0,8 % agarose gel. The size of the dsRNA was estimated using DNA size markers 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (lane M). Stars indicate segments absent in strain isogenic. Numbers on the left and right indicate sizes in kilobases.

**Figure 2.** Schematic representation of the genomic organization of the mitovirus SsMV6/24. O genome contain a long single ORF encoding RdRp protein and 5' e and 3' -UTRs of varying size.

**Figure 3.** Predicted secondary structures of the terminal sequences. The 5' and 3'terminal sequences of the positive-strand of SsMV6/24 dsRNAs could be folded into potential stable stem-loop structures. The MFOLD program was used for predicting the secondary structures of the terminal sequences and for estimate the free energy.

**Figure 4.** Multiple alignment of conserved amino acid motifs in RdRps regions of SsMV6 (SsMV6/24), and corresponding regions in other mitoviruses. The positions of motifs I–VI are indicated by lines above the sequences. Identical residues are shaded and indicated by asterisks; conserved and semi-conserved amino acid residues are indicated by colons and dots, respectively. Numbers in square brackets correspond to the number of amino acid residues separating the motifs.

Abbreviations: SsMV6/24 *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 6 (characterized in this study); SsMV5, *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 5 (AHX84131); SsMV6 *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus (AHX84133); SsMV3, *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 3 (AGC24232); ShMV *Sclerotinia homeocarpa* mitovirus (AAO21337); BcMV1, *Botrytis cinerea* mitovirus 1 (ABQ65153); CpMV1, *Chryphonectria parasitica* mitovirus 1-NP631 (NP\_660174); MpMV1, *Macrophomina phaseolina* mitovirus 1 (ALD89121); RsMV2, *Rhizoctonia solani* mitovirus 2 (ALD89121); OMV1a, *Ophiostoma* mitovirus 1a (CAJ32466); OMV3a, *Ophiostoma* mitovirus 3a (NP\_660176); OMV6, *Ophiostoma* mitovirus 6 (CAB42654).

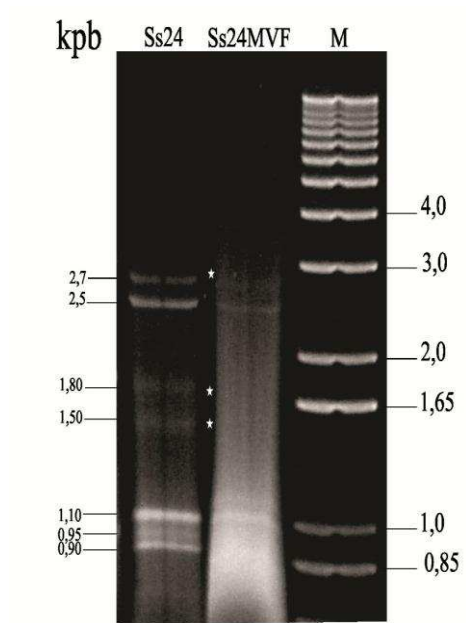
**Figure 5.** An Neighbor-joining phylogenetic tree constructed based an alignment of the respective RdRp amino acid sequences of SsMV6 (SsMV1/24) and other mitoviruses available in GenBank. Bootstrap values (%) obtained with 1000 replicates are indicated on branches and branch lengths correspond to genetic distance; scale bar at lower left corresponds to a genetic distance of 0.2. Virus names and sequence accession numbers are indicated in branches.

**Figure 6.** Biological characteristics of *S. sclerotiorum* strain Ss24 and their parental obtained by sexual reproduction (carpogenic germination), mitovirus-free, Ss24MVF. A) Colony morphology and pigmentation. B) Sclerotia production. C) Virulence test in laboratory conditions on detached leaves of bean, *nicotiana* and pepper. D) Growth rate in centimeters per day. E) Comparative analysis of oxalic acid production between strain Ss24 and Ss24MVF determined by UPLC liquid chromatography system. F) Test virulence *in vivo* in leaves and bean plant stem. The abbreviation hpi = hours postinoculation.

**Figure 7.** Ultrathin sections of *S. sclerotiorum* strains Ss24 and Ss24MVF observed under transmission electron microscopes (TEM). Mycelium of Ss24 containing several mitochondria well-distributed, while in strain Ss24MVF only a few mitochondria existed. Scale bars = 1  $\mu$ m.

# FIGURES

## Figure 1



**Figure 2**

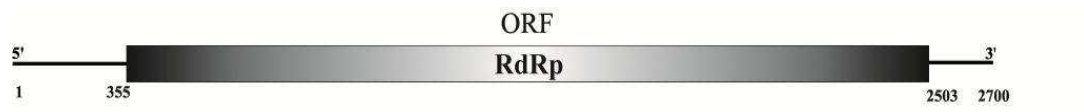
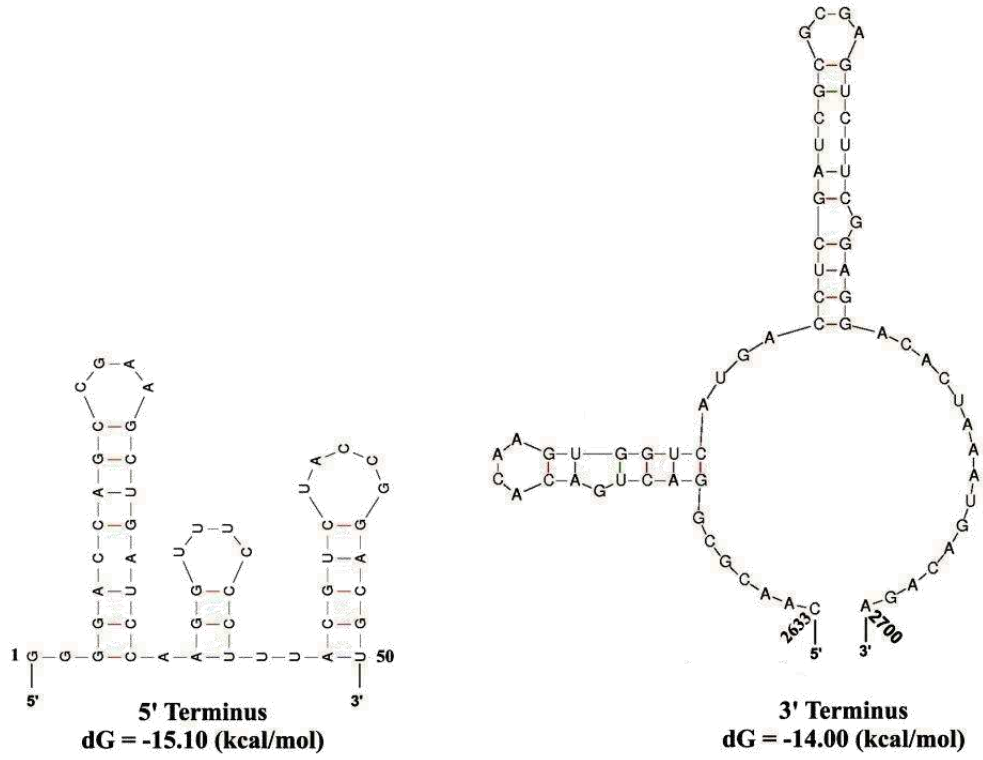


Figure 3





**Figure 5**

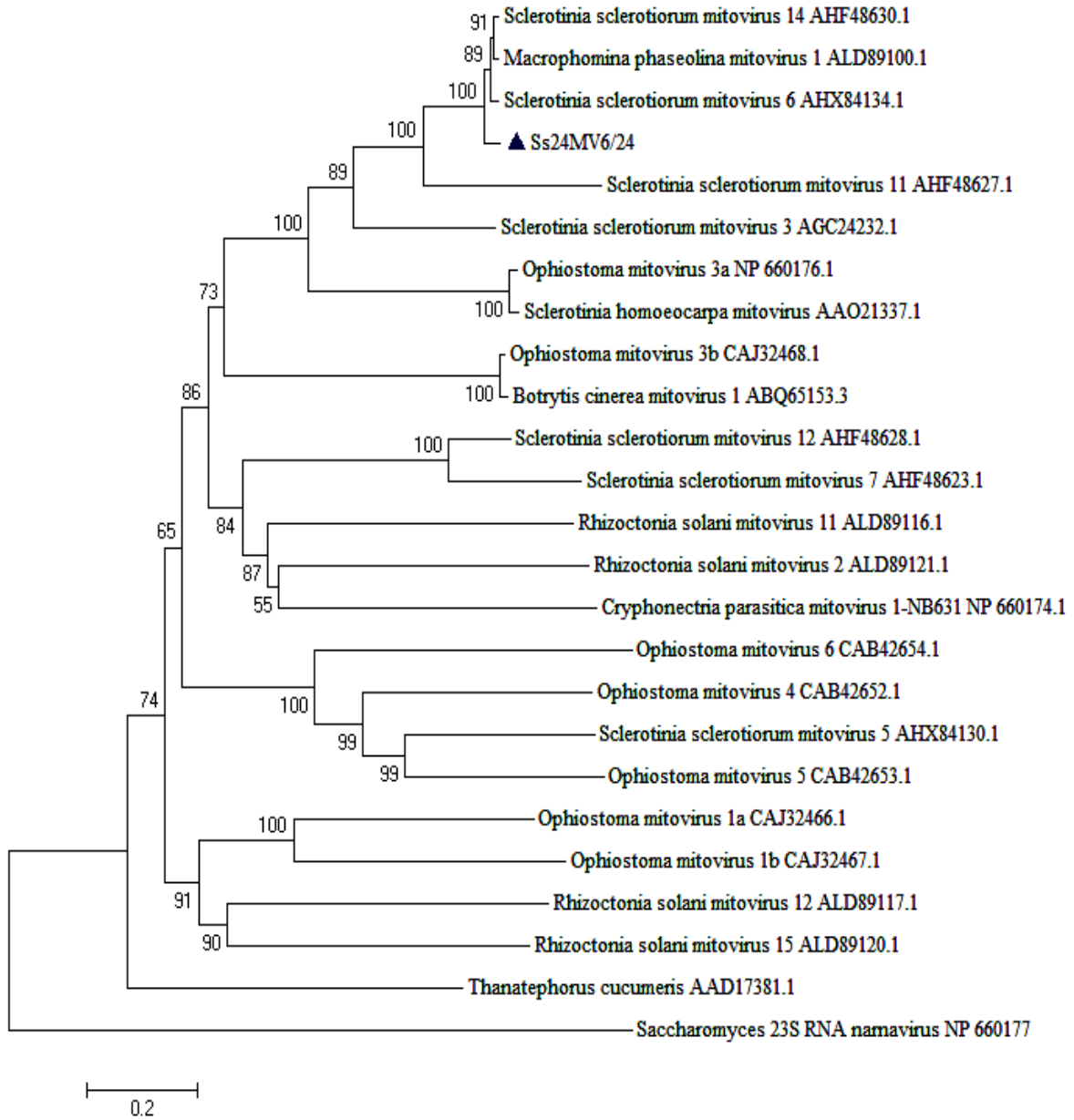
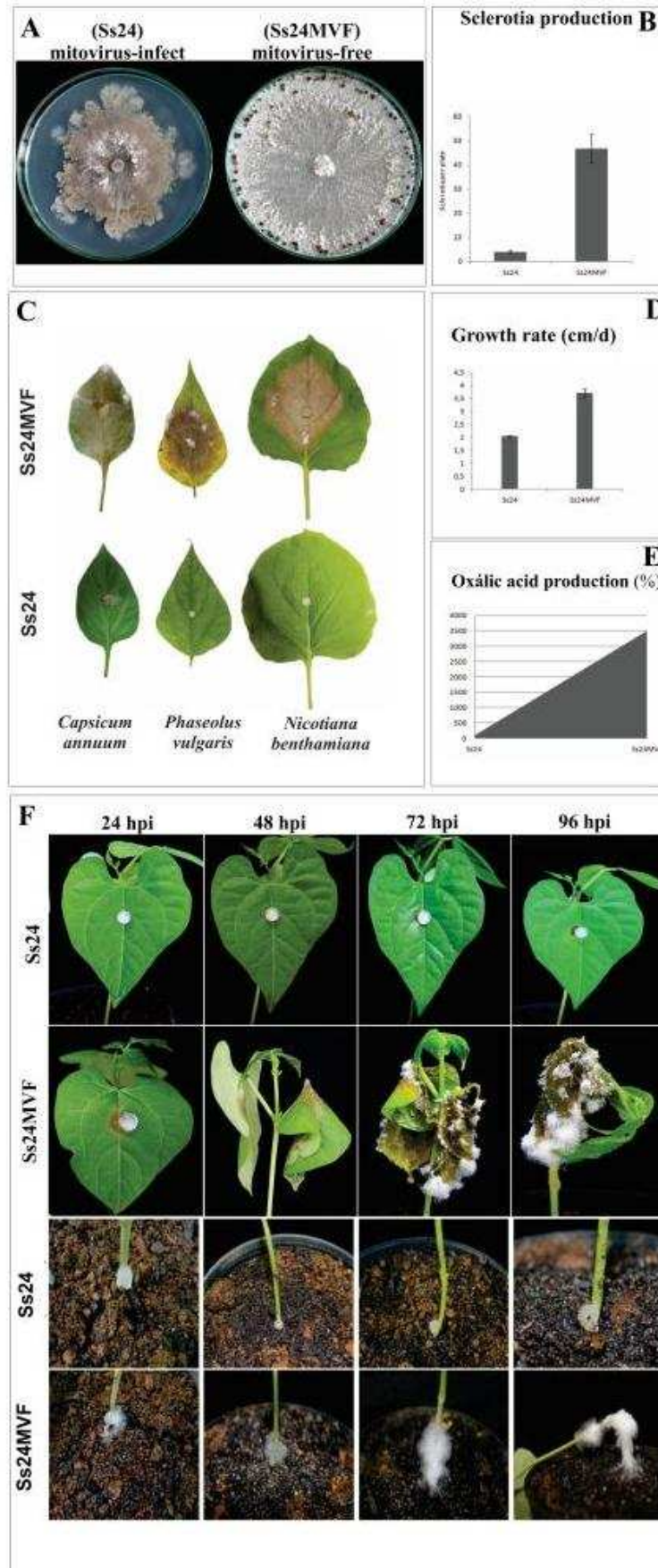
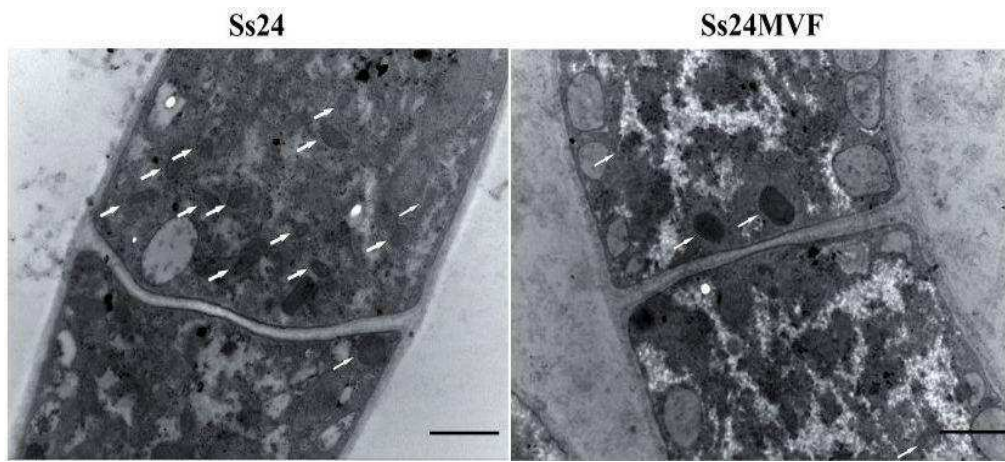


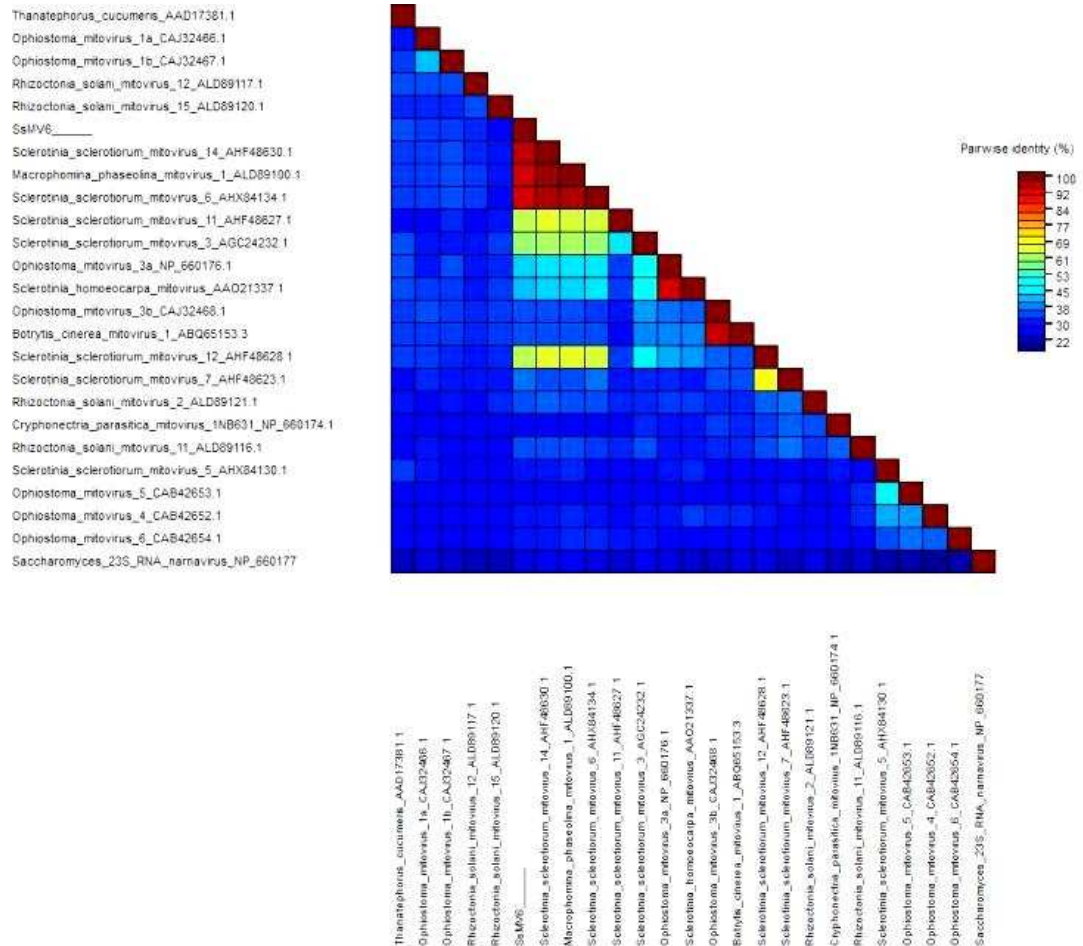
Figure 6



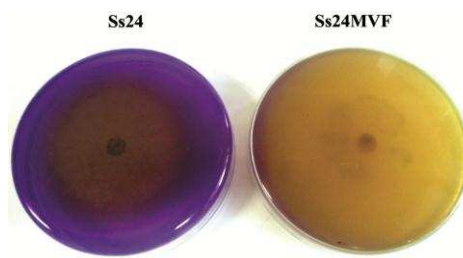
**Figure 7**



## SUPPLEMENTARY INFORMATION



**Figure S1. Relationship between the putative RdRps proteins of family *Narnaviridae* and SsMV6 obtained in this work.** Pairwise identity plot of RdRps proteins of mitovirus were performed using a SDT program. Sequence accession numbers are indicated on the side of identification of mycovirus.



**Figure S2. Qualitative analysis of the production of total acids by colorimetry.**

Growth strain Ss24 and Ss24MVF in PDA containing a pH indicator (Bromophenol Blue  $0.05 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) for 5 days at  $22^\circ\text{C}$ . Change color from blue to yellow indicates that the pH significantly reduced by acidifying the medium.

**Table S1.** Mycovirus selected for phylogenetic analysis of RdRPs. Comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 6 (SsMV6/24) with related mycovirus in genome size and RdRp with respective access codes in date bank GenBank.

<b>Mycovirus</b>	<b>RdRp length (aa)</b>	<b>Genome length (nt)</b>	<b>GenBank Genome Accession no.</b>	<b>GenBank RdRp Accession no.</b>
<i>Botrytis cinerea</i> mitovirus 1	738	2804	EF580100.3	ABQ65153.3
<i>Cryphonectria parasitica</i> mitovirus 1-NB631	809	2728	NC_004046.1	NP_660174.1
<i>Macrophomina phaseolina</i> mitovirus 1	715	2572	KP900894.1	ALD89100.1
<i>Ophiostoma</i> mitovirus 1a	782	3147	AM087548.1	CAJ32466.1
<i>Ophiostoma</i> mitovirus 1b	776	2572	AM087549.1	CAJ32467.1
<i>Ophiostoma</i> mitovirus 3a	718	2617	NC_004049.1	NP_660176.1
<i>Ophiostoma</i> mitovirus 3b	738	2332	AM087550.1	CAJ32468.1
<i>Ophiostoma</i> mitovirus 4	783	2599	AJ132754.1	CAB42652.1
<i>Ophiostoma</i> mitovirus 5	729	2474	AJ132755.1	CAB42653.1
<i>Ophiostoma</i> mitovirus 6	695	2343	AJ132756.1	CAB42654.1
<i>Rhizoctonia solani</i> mitovirus 11	905	3283	KP900906.1	ALD89116.1
<i>Rhizoctonia solani</i> mitovirus 12	746	3378	KP900907.1	ALD89117.1
<i>Rhizoctonia solani</i> mitovirus 15	961	3901	KP900910.1	ALD89120.1
<i>Rhizoctonia solani</i> mitovirus 2	716	2865	KP900911.1	ALD89121.1
<i>Saccharomyces</i> 23S RNA namavirus	941	2891	NC_004050.1	NP_660177.1
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i> mitovirus	720	2632	AY172454.1	AAO21337.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 14	715	2564	KF913889.1	AHF48630.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 11	683	2708	KF913886.1	AHF48627.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 12	693	2593	KF913887.1	AHF48628.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 3	712	2588	JX401537.1	AGC24232.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 5	718	2498	KJ462509.1	AHX84130.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 6	742	2586	KJ462513	AHX84134.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 7	703	2648	KF913882.1	AHF48623.1
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	754	3570	U51331.2	AAD17381.1

## CONCLUSÕES

- Há uma grande diversidade de micovirus infectando fungos fitopatogênicos.
- Um único isolado fúngicos pode está coinfestado com dois ou mais micovirus, essa hipótese é baseada nos diferentes padrões de segmentos observados nos isolados analisados neste estudo.
- Este estudo proveu evidências que o fenótipo da hipovirulência pode ou não existir em isolados que são idênticos geneticamente, mas que diferem apenas pela ausência de segmentos de origem viral. O fungo *S. sclerotiorum* isolado Ss24 apresentou fenótipo hipovirulento revelando ter a patogenicidade perdida, alterações na morfologia e pigmentação das colônias, baixa produção de ácido oxálico, reduzida taxa de crescimento e baixa produção de escleródios. Enquanto o isolado Ss24MVF, que por um mecanismo ainda desconhecido perdeu três segmentos viral durante a reprodução sexuada não teve seu fenótipo afetado.