

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Micovírus de RNA dupla fita em fungos fitopatogênicos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides* isolados de cana-de-açúcar

Maressa de Oliveira Henrique

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Programa: Internacional Biologia Celular e Molecular vegetal

Piracicaba
2024

Maressa de Oliveira Henrique
Bacharel em Biotecnologia

**Micovírus de RNA dupla fita em fungos fitopatogênicos *Colletotrichum falcatum* e
Fusarium verticillioides isolados de cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Programa: Internacional Biologia Celular e
Molecular vegetal

Piracicaba
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Henrique, Maressa de Oliveira

Micovírus de RNA dupla fita em fungos fitopatogênicos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides* isolados de cana-de-açúcar / Maressa de Oliveira Henrique. - - Piracicaba, 2024.

87 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Micovírus 2. Complexo broca-podridão 3. *Colletotrichum falcatum* 4. *Fusarium verticillioides* . I. Título

AGRADECIMENTOS

Nada seria impossível sem o incondicional apoio do meu Pai, Osmar Henrique, e da minha mãe, Amália Henrique e o suporte do meu irmão, Abimael Henrique, da minha irmã Karina Pimentel e dos meus cunhados Gabriel Pimentel e Fernanda Henrique. A família continua sendo a minha fortaleza, que sem ela nada faria sentido para mim. Ao meu parceiro-amigo Bruno Carneiro que me incentivou e tornou os dias pesados em leves e o choro em riso, transformações que a cumplicidade é capaz. Agradeço a imensa alegria que meu amado sobrinho Joaquim Henrique mostra a cada sorriso que transforma qualquer tristeza em alegria. Nessa história continua tendo o valor de outras mãos, as quais contribuíram para que eu avançasse até aqui, às quais sempre serei grata. Ao meu estimado professor Dr. Anderson de Sá Nunes que me guiou nos primeiros passos para o caminho das virtudes da ciência. Aos professores Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara e Dra. Ioly Kotta-Loizou por me inspirarem a ser cientista. Aos meus queridos professores Dr. Daniel Scherer de Moura e Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello que compatilharam a paixão pela docência.

Minha gratidão às minhas amigas que estiveram sempre comigo Gabriele Katagui, Tais Orlandini, Cíntia Gabriela, Leila Santos e Michele Barros. Aos amigos que conheci, Camila Moro, Priscila Auler e Gabriel Salgado. Á minha eterna pupila Maria Camila Rodriguez. Nessa etapa que se encerra os agradecimentos se devem ao Professor Marcio de Castro Siva Filho, orientador, pelo amparo, suporte, compreensão e incentivo. Aos professores da ESALQ, em especial, ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende e á professora Dra. Maria Carolina Quecine Verdi pela ajuda na extração da partícula viral e isolamento dos fungos, respectivamente. Ao Rodinei de Jesus Graciani, técnico do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas. Aos colegas de trabalho Augusto Penteriche, Camila Moro, Diego Gallan, Flávia Franco, Gabriel Salgado, Giovanna Veronez, Karina Lopes, Marcelo Santos, Marcia Mondin, Maria Camila, Pedro Alexander e Thais Souza, pela paciência e amizade e por tornar o trabalho menos cansativo. Agradeço á professora Dra. Ioly Kotta-Loizou da Imperial College London uma cientista ímpar e admirável. Em Londres conheci pessoas, às quais chamo de amigos: Christian Nielsen e Qitong Lin, que me ajudaram com os experimentos e tornaram a saudade suportável. Em Piracicaba conheci a Lais Malvezzi que tornou a vida acadêmica mais doce e repleta de brigadeiro de pistachio.

Não posso deixar de agradecer outros envolvidos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço á professora Dra. Renata de Oliveira Dias pelo auxílio nas análises de bioinformática e utilização do servidor de Bioinformática do Laboratório de Genética e Biodiversidade da UFG. Agradeço aos servidores públicos da USP, em especial a equipe técnica do PrInt. Este trabalho não poderia ser realizado sem os insetos fornecidos pelo Professor Dr. José Roberto Postali Parra responsável pelo Laboratório de Biologia dos Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP e da técnica de laboratório Neide Graciano Zério.

Agradeço aos professores Dr. Augusto Schrank da UFRGS, Dr. Fernando Dini Andreote da ESALQ e Dr. Flavio Henrique da Silva da UFSCar que compuseram o comitê de acompanhamento e a Dra. Flavia Pereira Franco e novamente aos professores Dr. Fernando Dini Andreote e Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello, membros da banca de qualificação, que dispuseram tempo e esforços para lerem e contribuir para o presente trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação Internacional Biologia Celular e Molecular Vegetal (ESALQ/USP).

Por fim agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

**Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho
Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

“Be curious, not judgmental”.

Margarite e Marshall Shearer

RESUMO

Micovírus de RNA dupla fita em fungos fitopatogênicos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides* isolados de cana-de-açúcar

O presente trabalho explora a interação vírus-fungo-inseto-plantas no contexto do complexo broca-podridão em cana-de-açúcar. Neste complexo, a associação entre o inseto *Diatraea saccharalis* e os fungos fitopatogênicos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* impactam negativamente a produção de açúcar e álcool. A tolerância desses fitopatógenos por fungicidas torna imperativo a busca de estratégias para o seu controle. Assim, a virologia moderna, explora os benefícios da hipovirulência mediada por micovírus nos fungos patogênicos nas relações multitróficas como estratégias de biocontrole. Neste cenário, o presente trabalho procura responder a seguinte questão: os micovírus estão presentes e envolvidos na interação multitrófica do complexo broca-podridão? Foram isolados o fungo fitopatogênico *F. verticillioides* de cana-de-açúcar infectada e os dsRNAs dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum* pelo método de celulose. As proteínas relacionadas a patogênese de plantas, SUGARWINs, e os compostos orgânicos voláteis (VOCs) dos fungos estão envolvidos na patogênese do complexo broca-podridão. Assim, hipotetizamos se a SUGARWIN1, além de afetar o fungo, seria capaz de degradar micovírus. Também realizamos um ensaio de escolha para avaliar se os micovírus alteram o efeito dos VOCs dos fungos sobre os insetos. Os resultados revelam dois novos vírus com genoma de dsRNA, *Fusarium verticillioides* partitivirus 1 (FvPV1) e *Colletotrichum falcatum* victorivirus 1 (CfVV1) isolados do *F. verticillioides* e do *C. falcatum*, respectivamente. O genoma FvPV1 consiste em dois fragmentos de dsRNA com aproximadamente 1,9 kbp (dsRNA1) e 1,7 kbp (dsRNA2) de comprimento. O dsRNA1 codifica uma proteína de 65,09 kDa com identidade significativa as proteínas RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) dos partitivirus. Análise filogenética da sequência de aminoácidos da proteína RdRp mostra que o FvPV1 está relacionado com outros membros da novo gênero *Epsilonpartitivirus* proposto para a família Partitiviridae. O genoma CfVV1 consiste em um único fragmentos de dsRNA com aproximadamente 5,4 kbp de comprimento com duas fases de leitura aberta (ORFs). A ORF1 e ORF2 codificam para uma proteína de 72,81 kDa e 89,35 kDa, respectivamente. A ORF1 possui identidade com as proteínas do capsídeo (CP) e a ORF2 às proteínas RdRp dos totivirus. A partícula viral esférica de aproximadamente 50 nm de diâmetro com o genoma do CfVV1 foi identificada via microscopia eletrônica de varredura. Análise filogenética da sequência de aminoácidos da RdRp mostra que o CfVV1 está relacionada com outros membros gênero *Victorivirus* da família Totiviridae. A pesquisa enfatiza que o CfVV1 não é sensível às proteínas SUGARWIN e os FvPV1 diminuem a preferência da *D. saccharalis* aos voláteis do fungo e a extensão da doença nas plantas. As implicações desse estudo incluem o isolamento e identificação de dois novos micovírus e o provável efeito fenotípico no hospedeiro. Em conclusão, essa tese contribui para os primeiros conhecimentos do papel dos micovírus nos patógenos envolvidos na interação multitrófica complexo broca-podridão. Este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias de biocontrole.

Palavras-chave: Micovírus, Complexo broca-podridão, *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium verticillioides*

ABSTRACT

Double-strand RNA mycovirus in *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium verticillioides* phytopathogenic fungi isolated from sugarcane

This thesis addresses the virus–fungus–plant interaction in the sugarcane borer-rot complex context. In this complex, the insect *Diatraea saccharalis* and the fungi *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum falcatum* interact to impact negatively the sugar and ethanol productions. The tolerance of fungi to chemical fungicides has led to the search for novel control strategies. Thus, modern virology regarding biocontrol focuses on mycovirus-mediated hypovirulence in multitrophic interactions. Against this backdrop, this research sought to answer a pressing question: are the mycoviruses participating in the multitrophic borer-rot complex? The phytopathogenic fungus *F. verticillioides* were isolated from sugarcane and the dsRNA genome was extracted from fungi *F. verticillioides* and *C. falcatum* by using cellulose chromatography. Pathogenesis-related proteins, such as SUGARWIN, and fungi volatile organic compounds (VOCs) are involved in the pathogenesis of the borer-rot complex. Thus, we hypothesized if the SUGARWIN possesses the ability to degrade the dsRNA. The dual-choice bioassay allows testing the potential effect of mycovirus in fungi VOCs. Findings revealed two novel dsRNA mycovirus, termed *Fusarium verticillioides* partitivirus 1 (FvPV1) and *Colletotrichum falcatum* victorivirus 1 (CfVV1), isolated from plant pathogenic fungi *F. verticillioides* and *C. falcatum*, respectively. The genome of FvPV1 has two dsRNA segments, 1.9 kbp (dsRNA1) and 1.7 kbp (dsRNA2) in length. dsRNA1 contains a single open reading frame (ORF) encoding a 65.09 kDa protein and has similarity to other partitivirus RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Phylogenetic analysis based on multiple alignments of FvPV1 RdRp protein indicated that it belongs to the newly proposed genus *Epsilonpartitivirus* in the Partitiviridae family. The genome of CfVV1 has only one dsRNA segment, ~5.4 kbp in length, containing two ORFs, ORF1 and ORF2, encoding 72.81 kDa and 89.35 kDa proteins, respectively. ORF1 encodes a capsid protein (CP), while ORF2 an RdRp, both proteins have an identity to another totivirus. Transmission electron microscopy image identified an isometric mycovirus particle with a diameter of 50 nm. Sequence alignment and phylogenetic analysis showed that CfVV1 is related to members of the genus *Victorivirus* in the Totiviridae family. The research underscores that the dsRNA genome of the CfVV1 is not sensitive to the SUGARWIN protein and the mycovirus FvPV1 reduces the preference of *D. saccharalis* to the fungus volatile and the plant fungal disease. The implications of this study include the isolation and characterization of two novel dsRNA mycoviruses and the potential phenotype changes of their host. In conclusion, this thesis contributes to the first knowledge of the mycovirus's role in the borer-rot complex. As we move forward, this research will serve for the development of biocontrol strategies.

Keywords: Mycovirus, Borer-rot complex, *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium verticillioides*