



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

I MICOVIRUS ASSOCIATI
ALL' IPOVIRULENZA DI PATOGENI
DI PIANTE FORESTALI

Mycovirus associated to pathogen hypovirulence
of forest plants

Studente:
VALENTINA STEFANINI

Relatore:
PROF. SERGIO MUROLO

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

A i miei genitori che mi hanno dato
la possibilità di arrivare fin qui e a tutti i
miei amici, nonni e fratelli che mi hanno
accompagnato in questa parte della mia vita.

SOMMARIO

| | |
|---|----|
| SOMMARIO | 3 |
| ELENCO DELLE FIGURE | 4 |
| ACRONIMI E ABBREVIAZIONI | 6 |
| INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI | 8 |
| CAPITOLO 1: IL MONDO DEI MICOVIRUS..... | 10 |
| 1.1 La scoperta dei micovirus | 10 |
| 1.2 La tassonomia e morfologia dei micovirus | 11 |
| 1.3 Ipotesi sull'origine dei micovirus | 14 |
| 1.4 La modalità di trasmissione dei micovirus | 14 |
| 1.5 Come i micovirus influenzano il fenotipo del fungo | 16 |
| CAPITOLO 2: I MICOVIRUS IN BOSCO E L'IPOVIRULENZA DEI FUNGHI FITOPATOGENI | 19 |
| 2.1 Cancro Corticale del Castagno e <i>Cryphonectria parasitica</i> | 19 |
| 2.1.1 <i>Cryphonectria parasitica</i> e micovirus | 22 |
| 2.1.2 Organizzazione genetica di CHV-1, le funzioni e l'ecologia..... | 24 |
| 2.1.3 I fattori che regolano la virulenza di CHV-1 | 26 |
| 2.1.4 Controllo biologico del cancro corticale del castagno mediante CHV-1..... | 28 |
| 2.2 Marciumi radicali e <i>Heterobasidion spp.</i> | 31 |
| 2.2.1 Micovirus e <i>Heterobasidion</i> | 35 |
| 2.3 Cancro del fusto delle conifere e <i>Gremmeniella abietina</i> | 38 |
| 2.3.1 <i>Gremmeniella abietina</i> e micovirus | 40 |
| 2.4 Grafiosi dell'olmo e <i>Ophiostoma ulmi</i> e <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> | 42 |
| 2.4.1 <i>Ophiostoma ulmi</i> e micovirus | 46 |
| CONCLUSIONI | 48 |
| BIBLIOGRAFIA | 49 |

ELENCO DELLE FIGURE

| | |
|--|----|
| Figura 1: I micovirus divisi per famiglie e genere | 12 |
| Figura 2: Le principali caratteristiche delle famiglie a cui appartengono i micovirus | 13 |
| Figura 3: Varie forme delle particelle virali dei micovirus. | 13 |
| Figura 4: Trasmissione dei micovirus attraverso anastomosi ifale (trasmissione orizzontale) e mediante spore (trasmissione verticale). | 16 |
| Figura 5: Silenziamento a RNA in <i>Cryphonectria parasitica</i> e soppressione; interazione tra <i>CHV1</i> e <i>C. parasitica</i> | 17 |
| Figura 6: Sintomi dovuti a <i>Cryphonectria parasitica</i> : (a) ipertrofia su pollone, (b) necrosi dei tessuti sottocorticali, (c) emissione di rami epicormici. | 20 |
| Figura 7: Piante infette da <i>C. parasitica</i> con disseccamenti delle porzioni distali. | 21 |
| Figura 8: Picnidi arancioni (A), periteci maturi con evidenti colli (freccette rosse) che protrudono dalla corteccia di castagno (B). | 22 |
| Figura 9: Cancro involutivo (A); cancro cicatrizzato (B). | 23 |
| Figura 10: Ifa di <i>Cryphonectria parasitica</i> infetta da <i>CHV</i> (isolato ipovirulento) (rosso) e ifa non infetta di un isolato virulento (blu) (A); Anastomosi ifale: fusione delle ife con scambio del materiale citoplasmatico e del virus presente nelle ife di <i>C. parasitica</i> isolato ipovirulento (B). | 23 |
| Figura 11: Genoma del virus <i>CHV-1</i> | 24 |
| Figura 12: Analisi filogenetica di <i>CHV1</i> , responsabile dell'ipovirulenza di <i>Cryphonectria parasitica</i> | 25 |
| Figura 13: Distribuzione dei sottotipi di <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> in Europa. | 29 |
| Figura 14: Sintomi causati da <i>Heterobasidion</i> su un tronco di abete rosso accatastato. | 31 |
| Figura 15: Piante di abete rosso infette da <i>Heterobasidion</i> , ribaltate con la zolla di terra. | 32 |
| Figura 16: Foto dei sintomi causati da <i>Heterobasidion</i> | 33 |
| Figura 17: Foto dei carpofori di <i>Heterobasidion</i> | 34 |
| Figura 18: Dettaglio della parte inferiore di un carpoforo di <i>Heterobasidion</i> | 35 |
| Figura 19: <i>H. annosum</i> in presenza e in assenza del virus <i>HetPV13-an1</i> | 36 |

| | |
|--|----|
| Figura 20: Disegno schematico di un micovirus appartenente alla famiglia Partitiviridae..... | 36 |
| Figura 21: Disseccamenti localizzati delle gemme e degli aghi (sinistra), estesi disseccamenti dei rami e morte delle piante. | 38 |
| Figura 22: Sintomi di (a) clorosi e (b) avvizzimento; (c) tessuti brunastrini in una pianta per il controllo degli endofiti e (d) corpi fruttiferi di <i>G. abietina</i> (10x)..... | 39 |
| Figura 23: Lista dei principali micovirus riportati per <i>G. abietina</i> e Rappresentazione grafica della struttura dei loro genomi dei principali. | 41 |
| Figura 24: Colonia di <i>O. ulmi</i> (a) e <i>O. novo-ulmi</i> (b)..... | 43 |
| Figura 25: Sintomi di appassimento delle porzioni distali di piante di olmo infette da <i>O. ulmi</i> (sinistra), e piante adulte con chioma quasi completamente compromessa (destra). | 43 |
| Figura 26: Tipico imbrunimento dei vasi xilematici evidenti facendo una sezione trasversale di un ramo di olmo infetto da <i>O. novo ulmi</i> (sopra); Fasi di germinazione e moltiplicazione di <i>O. novo-ulmi</i> osservate al microscopio all'interno delle cellule xilematiche di olmo..... | 44 |
| Figura 27: Gallerie presenti a livello sottocorticale, create da insetti scolitidi su piante di olmi deperienti (sinistra); insetto scolitide adulto (destra)..... | 45 |
| Figura 28: Coltura di <i>O. novo-ulmi</i> infettata con fattori d, che mostra un tipico modello di crescita irregolare e instabile (a sinistra) e una coltura non infetta con una crescita regolare (a destra). | 46 |

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

| | |
|---------------|--|
| ORF | Le finestre di lettura (ORF, Open Reading Frames) |
| CP | Proteina capside, il rivestimento/contenitore di un virus. |
| CHV1 | <i>Cryphonectria hypovirus-1</i> |
| HetPV13-an1 | <i>Heterobasidion partitivirus 13</i> |
| NAN | Biotipo Nord Americano di <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> |
| EAN | Biotipo Euroasiatico di <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> |
| C. parasitica | <i>Cryphonectria parasitica</i> |
| O. ulmi | <i>Ophiostoma ulmi</i> |
| O. novo-ulmi | <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> |
| H. annosum | <i>Heterobasidion annosum</i> |
| H. parviporum | <i>Heterobasidion parviporum</i> |
| G. abietina | <i>Gremmeniella abietina</i> |
| GaRV6 | <i>Gremmeniella abietina RNA virus 6</i> |
| ssDNA | Genoma a DNA con singolo filamento |
| dsRNA | Genoma a RNA con doppio filamento |
| + ssRNA | Genoma a RNA a singolo filamento positivo |
| VLP | Particelle simili a virus |
| m-RNA | RNA messaggero |
| siRNAi | Short interference RNA |
| RNAi | RNA interference |
| RISC | RNA-Induced Silencing Complex |
| PTGS | Post-Transcriptional Gene Silencing |

| | |
|-----------|--|
| OPV1 | <i>O. partivirus 1</i> |
| OPV2 | <i>O. quercus 2</i> |
| OnuMV3a | <i>O. novo-ulmi mitovirus 3a</i> |
| OnuMV4-Ld | <i>O. novo-ulmi mitovirus 4-Ld</i> |
| OnuMV5-Ld | <i>O. novo-ulmi mitovirus 5-Ld</i> |
| OnuMV6-Ld | <i>O. novo-ulmi mitovirus 6-Ld</i> |
| RdRp | RNA-polimerasi RNA-dipendente |
| OnuMV1a | <i>O. novo-ulmi mitovirus 1a</i> |
| OnuMV1b | <i>O. novo-ulmi mitovirus 1b</i> |
| OnuMV3b | <i>O. novo-ulmi mitovirus 3b</i> |
| OmV | <i>Ophiostoma minus totivirus</i> |
| LFIV | Virus isometrico La France |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ICTV | Comitato Internazionale sulla Tassonomia dei Virus |
| CHV2 | <i>Cryphonectria hypovirus-2</i> |
| CHV3 | <i>Cryphonectria hypovirus-3</i> |
| CHV4 | <i>Cryphonectria hypovirus-4</i> |
| VCG | Gruppi di compatibilità vegetative |
| SsHADV-1 | <i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence associated DNA virus 1</i> |
| HetRV6 | <i>Heterobasidion RNA 6</i> |
| RsRV1 | <i>Rhizoctonia solani dsRNA virus 1</i> |
| DED | Dutch elm disease (Grafiosi dell'olmo) |

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Mentre i virus delle piante sono stati a lungo riconosciuti come componenti importanti dei biosistemi vegetali, i virus dei funghi (micovirus) sono stati ampiamente ignorati e, a parte poche eccezioni degne di nota, i loro ruoli nei funghi sono in gran parte sconosciuti. Sebbene la prima registrazione definitiva di un micovirus sia stata pubblicata oltre 50 anni fa (Hollings, 1962), la nostra conoscenza e comprensione dei virus fungini è ancora agli inizi. Solo poche centinaia di articoli di ricerca sono stati pubblicati sui micovirus rispetto a decine di migliaia di pubblicazioni sui virus delle piante. Non sorprende che il numero di micovirus per i quali il genoma è stato completamente caratterizzato sia ristretto rispetto ai virus vegetali e animali. La maggior parte delle pubblicazioni si occupa di micovirus di funghi economicamente importanti, come lieviti, funghi coltivati e agenti patogeni di piante e animali (Herrero *et al.*, 2012; Hibbett *et al.*, 2007).

Per molti virus delle piante gli effetti sulla crescita e sulla salute delle piante ospiti sono ben documentati, e sebbene questi siano talvolta criptici (non sintomatici) o latenti (espressi solo in alcune condizioni), la maggior parte causa sintomi distinguibili. Mentre la nostra conoscenza della diversità e dei ruoli dei micovirus si sta lentamente ma costantemente migliorando, la nostra comprensione dell'interazione tra i micovirus e i loro ospiti è in gran parte limitata a pochi sistemi ben studiati. Fino ad oggi, le interazioni tra il virus e l'ospite e le modalità di trasmissione del virus non sono ancora state studiate. Dato che tutti i virus sono parassiti obbligati, è ragionevole supporre a priori che la maggior parte dei micovirus avrà alcuni effetti negativi sulla crescita o sulla sopravvivenza dei funghi. Coerentemente con questa ipotesi, ci sono prove che il silenziamento genico dell'RNA agisce come meccanismo di difesa antivirale nei funghi (Cogoni e Macino, 1999; Segers *et al.*, 2007). Tuttavia, tranne forse in alcune specie come *Neurospora crassa*, questo meccanismo di difesa non è completamente efficiente. Inoltre, in alcuni casi, i micovirus possono agire come agenti extra-cromosomici che conferiscono un vantaggio all'ospite (Schmitt e Breinig, 2002, 2006).

L'obiettivo principale di questa ricerca bibliografica è raccontare lo stato dell'arte sui virus che iperparassitizzano i funghi filamentosi, facendo particolare riferimento ai principali patogeni delle piante forestali.

Gli agenti patogeni fungini, componenti integrali di ecosistemi forestali naturali, svolgono un importante ruolo ecologico (Manion, 1981; Burdon, 1991; Castello *et al.* 1995) di selezione degli individui nonché di mantenimento della diversità e della distribuzione delle specie vegetali (Augspurger e Kelly, 1984; Bever *et al.* 1997; Mills e Bever, 1998; Packer e Clay, 2000). L'epidemiologia e l'impatto visivo dei patogeni autoctoni negli ecosistemi delle foreste naturali sono notevolmente ridotti al minimo dalla diversità genetica degli ospiti. All'interno di tale ecosistema gli alberi e i loro agenti patogeni si sono co-evoluti e la struttura del popolamento dell'ospite è in genere caratterizzata dalla diversità genetica e dalla diversa età (Manion, 1981). Di conseguenza, gli individui in un popolamento maturo varieranno nella loro suscettibilità a un particolare patogeno. Di solito, l'albero non è suscettibile durante tutto il suo ciclo di vita, di conseguenza, alcuni individui in alcune classi di età possono essere sensibili, ma non l'intero popolamento. Estesi popolamenti di alberi sensibili non si sviluppano e quindi non possono verificarsi epidemie di malattie diffuse. Questa immunità degli ecosistemi naturali a malattie epidemiche può però essere superata in due modi. In primo luogo, un disturbo naturale o umano potrebbe provocare la crescita di un popolamento specializzato che può quindi essere suscettibile a un agente patogeno autoctono. In secondo luogo, agenti patogeni virulenti verso cui gli alberi non hanno resistenza potrebbero essere introdotti in un ecosistema naturale. Esempi di malattie, che si sono sviluppate in modo epidemico e in alcuni casi pandemico nei boschi, sono il cancro corticale del castagno causato da *Cryphonectria parasitica* (Anagnostakis, 1987), la grafiosi dell'olmo (Dutch Elm Disease) causata da *Ophiostoma ulmi* e *O. novo-ulmi* in Europa e Nord America (Brasier, 1991; Hubbes, 1999) e il cancro corticale del cipresso in Europa causato da *Seiridium cardinale* (Graniti, 1998).

Capitolo 1

IL MONDO DEI MICOVIRUS

1.1 La scoperta dei micovirus

I micovirus sono virus che sono in grado di infettare e replicarsi solo all'interno di funghi, oomiceti e lieviti (Ghabrial *et al.*, 2009). La maggior parte dei generi fungini, che vanno dai lieviti microscopici ai funghi commestibili più evoluti, sono stati descritti come possibili ospiti di micovirus (Hammond *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2005; Magae, 2012; Ro *et al.*, 2007; Schmitt e Breinig, 2006; Stielow *et al.*, 2011; Strauss *et al.*, 2000). I virus dei funghi sono stati scoperti molto più tardi rispetto ai virus delle piante e animali. Rimangono i virus meno studiati, con poche eccezioni. Questo può essere spiegato in quanto non si è ancora a pieno compresa la loro importanza economica (Ghabrial *et al.*, 2009; Wiebols *et al.*, 1936), a causa della latenza della maggior parte delle infezioni determinate da micovirus.

Tuttavia, l'interesse per i micovirus è aumentato negli ultimi decenni e si osserva quindi una considerevole accelerazione nel loro studio, anche grazie all'avvento di nuove tecniche molecolari, al fatto che molti micovirus possano indurre cambiamenti fenotipici nei loro funghi ospiti, e alla potenzialità di poterli applicare per il biocontrollo.

La prima segnalazione di un micovirus avvenne in un lievito nel 1936 (Wiebols *et al.*, 1936), successivamente in un basidiomicete (*Agaricus bisporus*) nel 1950 (Sinden e Hauser, 1950). I corpi fruttiferi dei funghi infetti erano deformati, avevano macchie marroni, crescevano lentamente e maturavano presto, comportando una grave perdita di raccolto. La malattia fu chiamata "malattia della France" e la sua origine virale era rivelato nel 1962 (Hollings, 1962), successivamente su segnalata su coltivazioni industriali di champignon (Romaine e Schlagnhauser, 1995; Borodynko *et al.*, 2010).

Cinquantacinque diversi micovirus erano stati identificati nel 1972 (Bozarth, 1972), oggi i micovirus sono noti essere ampiamente diffuso in tutti i principali gruppi tassonomici di funghi (Ghabrial *et al.*, 2009; Nuss, 2005; Xie, e Jiang, 2014). Oltre 300 genomi di micovirus sono stati sequenziati e registrati nei database del NCBI.

L'interesse suscitato dalla scoperta dei micovirus è dovuto essenzialmente a tre fattori: il loro intervento sulla genetica dell'ospite che influenza molte caratteristiche del fungo, ereditate per via citoplasmatica; il loro probabile intervento sul metabolismo della cellula fungina, caratterizzato dalla produzione di metaboliti secondari tra cui alcuni antibiotici da parte del fungo; il loro rinvenimento in un certo numero di funghi patogeni per piante importanti dal punto di vista economico e quindi il loro possibile interesse nella fitopatologia.

I micovirus sono ampiamente usati come strumento biologico controllo degli agenti patogeni fungini, che infettano piante economicamente significative e, soprattutto importante, per il trattamento di esseri umani invasivi micosi (Xie, e Jiang, 2014; Van de Sande *et al.*, 2010).

1.2 La tassonomia e morfologia dei micovirus

È possibile differenziare i micovirus in base alle caratteristiche del genoma. Sono state identificate e sequenziate più di 250 sequenze nucleotidiche virali depositate presso la banca dati NCBI (Xie & Jiang, 2014), che risultano raggruppabili in 22 generi appartenenti a 15 famiglie secondo l'elenco pubblicato dal Comitato Internazionale sulla Tassonomia dei Virus (ICTV, 2014) (**Fig. 1**). Tuttavia, il 20% dei micovirus non è stato ancora classificato (Pearson, 2009; Van Regenmortel *et al.*, 2010). In base alla struttura molecolare del genoma, sono stati descritti micovirus che possiedono genomi a RNA a doppio filamento (dsRNA) (*Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadriviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae*, *Totiviridae*), e a RNA a filamento singolo (ssRNA) (*Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Gammapflexiviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Mycomononegaviridae*). Questi ultimi sono ulteriormente suddivisi in due sottocategorie: genomi a RNA ss (+) e genoma a RNA ss (-) (**Fig. 1**). I micovirus appartenenti alle famiglie di RNA ss (+) possiedono RNA virale con la stessa sequenza di basi dell'mRNA. Le funzioni dell'RNA sono simili

all'mRNA durante la replicazione, e funge stampo per la sintesi dell'RNA-polimerasi RNA-dipendente (RdRp) e il capsid. D'altra parte, i micovirus a RNA ss (-) richiedono la partecipazione dell'enzima RNA replicasi affinché il loro genoma venga trascritto in RNA di senso +. Solo pochi micovirus sono formati da singole molecole circolari di DNA (ssDNA) (Ghabrial *et al.*, 2015; Pearson *et al.*, 2009). Inoltre, ci sono alcuni ssRNA di senso negativo lineare e micovirus con DNA a singolo filamento (ssDNA) circolare, non classificati. Di seguito si riporta in tabella i micovirus ad oggi registrati nei principali ospiti fungini (King *et al.*, 2011).

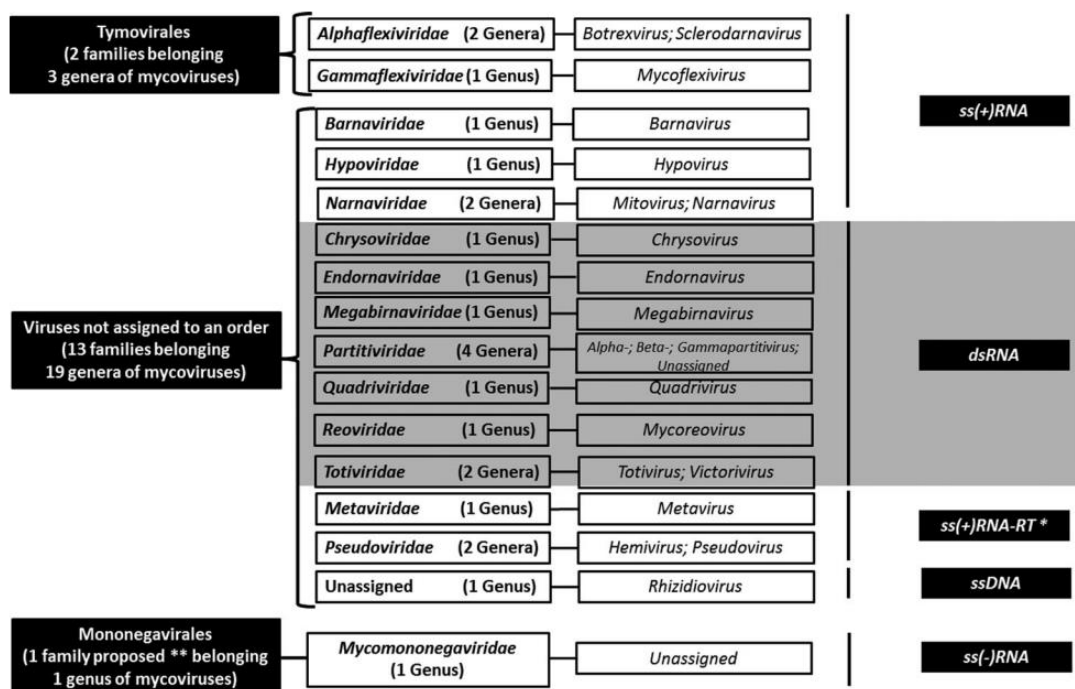


Figura 1: I micovirus divisi per famiglie e genere.

(Fonte: Jordán *et al.*, 2016)

Il genoma dei micovirus può variare in dimensioni (0,7 – 17 kb) e può essere costituito da un'unica ORF o da più ORFs che codificano per diversi geni (**Fig. 2**).

| Family | Genome | Genome size, kb | Number of segments | Virion | Morphology of particles (size, nm) |
|----------------------------|----------|-----------------|--------------------|--------|------------------------------------|
| <i>Totiviridae</i> | dsRNA | 4.6–7 | 1 | + | Icosahedral (40) |
| <i>Partitiviridae</i> | dsRNA | 1.4–2.2 | 2 | + | Icosahedral (30–35) |
| <i>Crysoviridae</i> | dsRNA | 2.4–3.6 | 4 | + | Icosahedral (30–35) |
| <i>Reoviridae</i> | dsRNA | 0.7–4.1 | 11 or 12 | + | Isometric (55–80) |
| <i>Megabirnaviridae</i> | dsRNA | 7 | 4 | + | Icosahedral (50) |
| <i>Quadriviridae</i> | dsRNA | 6.8 | 4 | + | Isometric (48) |
| <i>Endornaviridae</i> | ds/ssRNA | 9.8–17.6 | 1 | – | Ribonucleoprotein complex |
| <i>Narnaviridae</i> | ss(+)RNA | 2.3–2.7 | 1 | – | Ribonucleoprotein complex |
| <i>Hypoviridae</i> | ss(+)RNA | 9–13 | 1 | – | Pleomorphic membrane vesicles |
| <i>Alphaflexiviridae</i> | ss(+)RNA | 5.4–9 | 1–6 | + | Elongated particles |
| <i>Gammapflexiviridae</i> | ss(+)RNA | 6.8 | 2 | + | Filamentous (720) |
| <i>Barnaviridae</i> | ss(+)RNA | 4 | 1 | + | Icosahedral (50 × 20) |
| <i>Fusariviridae</i> | ss(+)RNA | 7.5 | 1 | – | Pleomorphic membrane vesicles |
| <i>Mycomononegaviridae</i> | ss(–)RNA | 8.9–19 | 1 | + | Filamentous (200–200) |
| <i>Genomoviridae</i> | ssDNA | 2.2–2.4 | 1 | + | Isometric (20–22) |

Figura 2: Le principali caratteristiche delle famiglie a cui appartengono i micovirus.
(Fonte: Kyrychenko et al., 2018)

Inoltre, i micovirus possono essere differenziati sulla base della struttura morfologica. In particolare sono stati individuati particelle virali isodiametriche (*Quadriviridae*, *Genomoviridae*), icosaedriche (nelle famiglie *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Crysoviridae*), ma anche filamentose (*Gamma Flexiviridae*, *Mycomononegaviridae*) e allungate (*Alpha Flexiviridae*) (Fig. 3). Infine, nella famiglia *Hypoviridae*, le particelle virali sono pleomorfe perché non incapsidate, ma avvolte in vescicole.

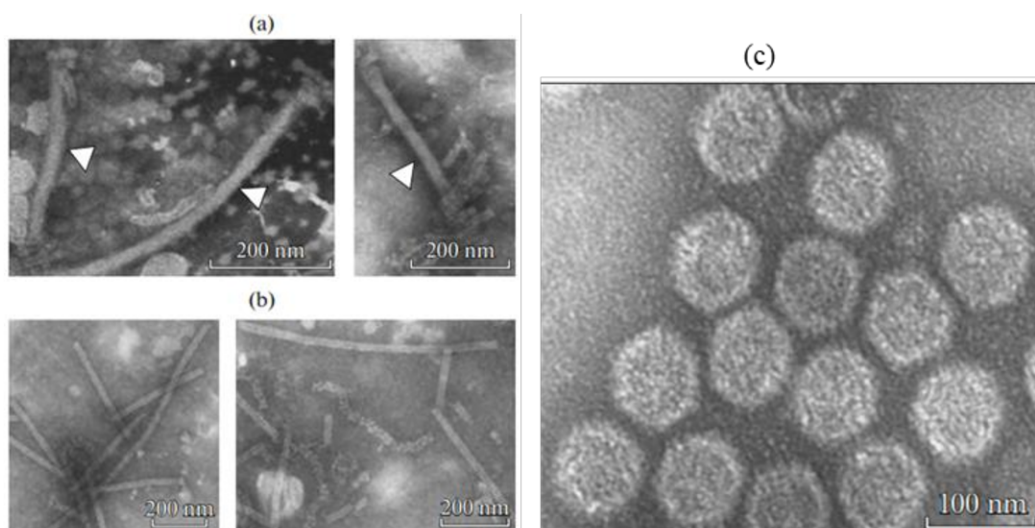


Figura 3: Varie forme delle particelle virali dei micovirus.
(Fonte: Kyrychenko et al., 2018)

1.3 Ipotesi sull'origine dei micovirus

La stragrande maggioranza dei micovirus scoperti finora ha genomi a RNA. I virus a RNA in generale sono inclini a errori durante il processo di replicazione, con un tasso di mutazione calcolato a 10^{-3} - 10^{-5} errori per nucleotide per ciclo di replicazione (Domingo e Holland, 1997). Di conseguenza, le popolazioni di virus a RNA consistono in una "popolazione di sequenze" e per questo non si parla di specie ma di "quasi specie" (Domingo e Holland, 1997; Van Regenmortel, 2007). Ciò può essere un evento vantaggioso per la sopravvivenza dei virus in quanto hanno un'elevata capacità di adattamento. Al momento non ci sono informazioni sufficienti per affrontare adeguatamente questo problema per i micovirus a RNA.

Per spiegare le origini e l'evoluzione dei micovirus sono state proposte due ipotesi principali (Ghabrial, 1998). La prima ipotesi è che i micovirus abbiano infettato gli antenati dei loro attuali ospiti fungini e in questa relazione coevolutiva ci siano state influenze reciproche tra l'ospite e il micovirus nel corso di questo periodo (Voth *et al.*, 2006). Tale ipotesi, che riflette un lungo periodo di coevoluzione, può anche spiegare il fatto che i micovirus in molti casi il fenotipo dell'ospite almeno apparentemente non si modifica. Tuttavia, non tutte le associazioni di micovirus sono coerenti con questa ipotesi. Alcuni, come *Cryphonectria parasitica hypovirus 1 (CHV1)*, hanno un significativo impatto sul fungo ospite.

La seconda ipotesi è che il micovirus originariamente fosse un virus in grado di attaccare le piante, e successivamente abbia acquisito la capacità di infettare il fungo (Yu *et al.*, 2010). A sostegno di questa ipotesi ci sono le similarità tra i genomi e la vicinanza filogenetica di alcuni micovirus (*CHV1*, *CHV2*, *CHV3* e *CHV4*), associati all'ipovirulenza di *Cryphonectria parasitica*, con diverse specie virali del genere *Potyvirus*, che attaccano le piante. Tre micovirus ssRNA recentemente descritti sono stati classificati all'interno della famiglia *Flexiviridae*, a cui appartengono diversi fitovirus (Pearson *et al.*, 2009).

1.4 La modalità di trasmissione dei micovirus

Analogamente a virus di animali e piante, i micovirus richiedono cellule dell'ospite per la loro replicazione. Allo stesso tempo, i micovirus possiedono anche alcune caratteristiche

uniche che riguardano la modalità di trasmissione e la mancanza di geni che codificano proteine di movimento.

Per quanto riguarda la trasmissione virale, i micovirus possono essere trasmessi in tre modi: per trasferimento orizzontale, verticale o extracellulare.

La trasmissione orizzontale avviene attraverso la fusione del micelio (anastomosi) tra due individui durante la formazione dell'eterocarione (mediata da un sistema di riconoscimento del sé / non auto-riconoscimento), uno dei quali è già iperparassitizzato da un micovirus (**Fig. 4**). Tuttavia, gli isolati della stessa specie non sono sempre compatibili, anche nella stessa popolazione. In questo tipo di trasferimento, diversi gruppi di compatibilità vegetativa (tipi vc o VCG) svolgono un ruolo speciale, a volte limitando il movimento del virus (Leslie, 1993). La formazione dell'eterokaryon è geneticamente controllata da specifici geni (het o vic). La compatibilità vegetativa tra due funghi avviene nel momento in cui nello stesso locus ci sono gli stessi alleli.

Nella trasmissione verticale, i micovirus comunemente infettano le spore asessuate (**Fig. 4**). Tuttavia, i tassi di trasmissione possono variare in modo significativo tra le specie, ad es. in *Heterobasidion annosum* solo il 3% dei conidi è infetto (Ihrmark *et al.*, 2002) in contrasto al 100% di infezione in *Cryphonectria parasitica* (Ding *et al.*, 2007). I virus fungini possono anche colonizzare le spore sessuali, infettando una nuova generazione dell'ospite: 8-13% di ascospore infette da dsRNA in *Magnaporthe grisea* (Chun e Lee, 2009), mentre 10-84% di basidiospore infette da dsRNA in *H. annosum* (Ihrmark *et al.*, 2004). Tuttavia, in uno studio più recente, è stata osservata una trasmissione verticale inferiore di *Heterobasidion parviporum* alle basidiospore (8,3%) in una foresta di abeti rossi (Vainio, *et al.*, 2014).

La trasmissione extracellulare è stata verificata sperimentalmente per *SsHADV-1*, virus associato all'ipovirulenza di *Sclerotinia sclerotiorum*, un fungo particolarmente aggressivo su un numero elevato di piante coltivate. Yu *et al.* (2013), hanno isolato il virus e lo hanno introdotto nei protoplasti di *S. sclerotiorum*, verificando la migrazione delle particelle virali tra cellule fungine limitrofe. Inoltre, inoculando solo l'acido nucleico del micovirus a DNA non è stato raggiunto lo stesso risultato, dimostrando che per la trasmissione extracellulare è necessaria la particella virale completa.

E' stata anche segnalata la trasmissione di micovirus tra le specie fungine diverse (Lee *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2003; Vainio *et al.*, 2011), aprendo nuove linee di ricerca incentrate sulla genetica, fattori evolutivi ed ecologici coinvolti nella trasmissione. La trasmissione interspecifica è stata segnalata anche tra il *Fusarium poae* e isolati di *Aspergillus* (Van Diepeningen *et al.*, 2000). Tuttavia, non si sa come i funghi facciano a superare le barriere

genetiche, se vi è una qualche forma di meccanismo di riconoscimento durante il contatto o altri fattori che possano favorire questo scambio.

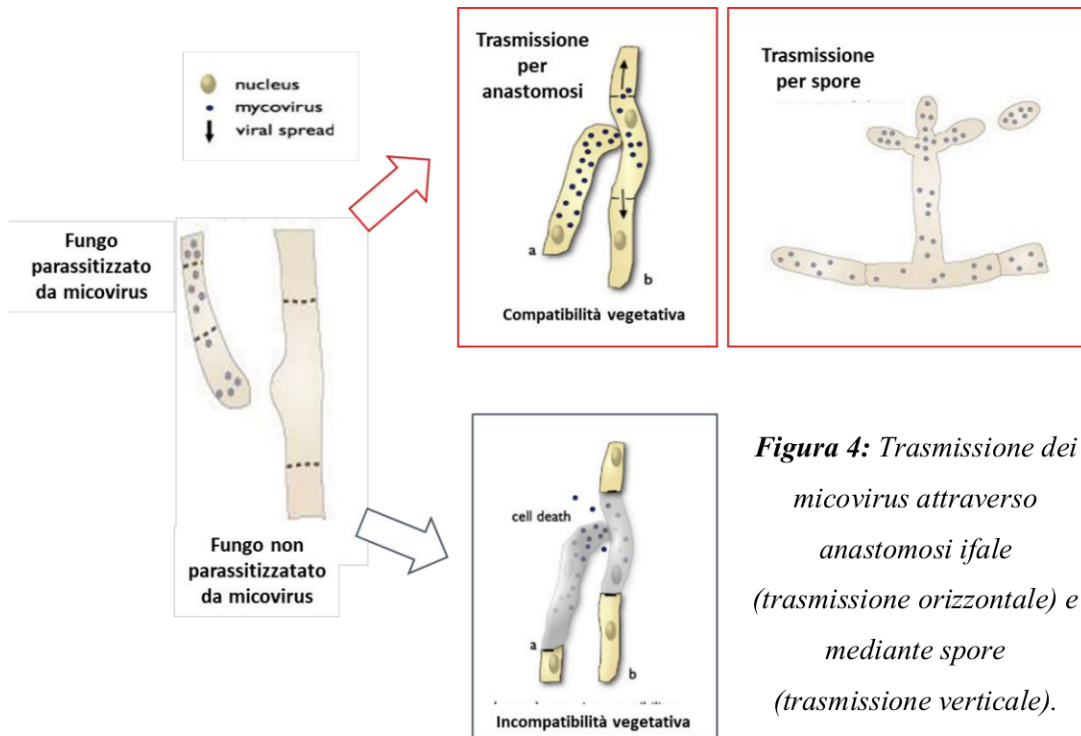


Figura 4: *Trasmissione dei micovirus attraverso anastomosi ifale (trasmissione orizzontale) e mediante spore (trasmissione verticale).*

1.5 Come i micovirus influenzano il fenotipo del fungo

Solitamente le infezioni causate da micovirus non causano sintomi visibili sull'ospite, per questo non è facile capire se un fungo sia infettato o meno. Le infezioni asintomatiche dei micovirus, ha portato a ritenere in passato che questi non abbiano alcun impatto sulla biologia del fungo ospite (Buck, 1998). Una coesistenza neutrale potrebbe essere solo il risultato di un lungo processo coevolutivo (May *et al.*, 1995), in un sistema complesso a quattro vie che vede interagire la pianta, il fungo, il micovirus e l'ambiente. Di conseguenza, i sintomi possono comparire solo quando determinate condizioni del sistema cambiano e si squilibrano e potrebbero dipendere da cambiamenti esterni (ambientali) e/o interni a livello citoplasmatico. Per esempio, uno stress abiotico potrebbe modificare la relazione tra micovirus e fungo, facendo scomparire un effetto simbiotico e facendo insorgere una relazione parassitaria

(Morsy *et al.*, 2010). Un micovirus può modulare l'aggressività del fungo attraverso alterazioni del fenotipo o dell'espressione genica del fungo (Segers *et al.*, 2007). Queste alterazioni possono essere ereditabili, e ciò è stato dimostrato per i micovirus che sono in grado di sopprimere i meccanismi di silenziamento genico del fungo-ospite, attraverso cambiamenti epigenetici (Hammond *et al.*, 2008). In particolare, il silenziamento genico è un meccanismo di difesa che gli organismi mettono in atto per preservarsi dall'attacco di organismi esterni, attraverso l'RNA interference (RNAi), riscontrato sia nelle piante, negli animali e recentemente anche nei funghi (Shabalina *et al.*, 2008). RNAi vengono riconosciuti e tagliati dalla endonucleasi dicer che producono short interference RNA (siRNAi), molecole effettrici lunghe 21÷25 nucleotidi (Meng *et al.*, 2017). In seguito, i siRNA sono incorporati in un complesso multiproteico chiamato RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) che guida il legame tra il siRNA e lo specifico mRNA con conseguente degradazione dell'mRNA target. L'effetto finale di tale processo è il silenziamento dell'espressione di un determinato gene. In questo caso si parla di silenziamento post-trascrizionale (PTGS, *Post-Transcriptional Gene Silencing*). In alcuni casi i siRNA possono regolare l'espressione genica attraverso l'inibizione della trascrizione (Fig. 5).

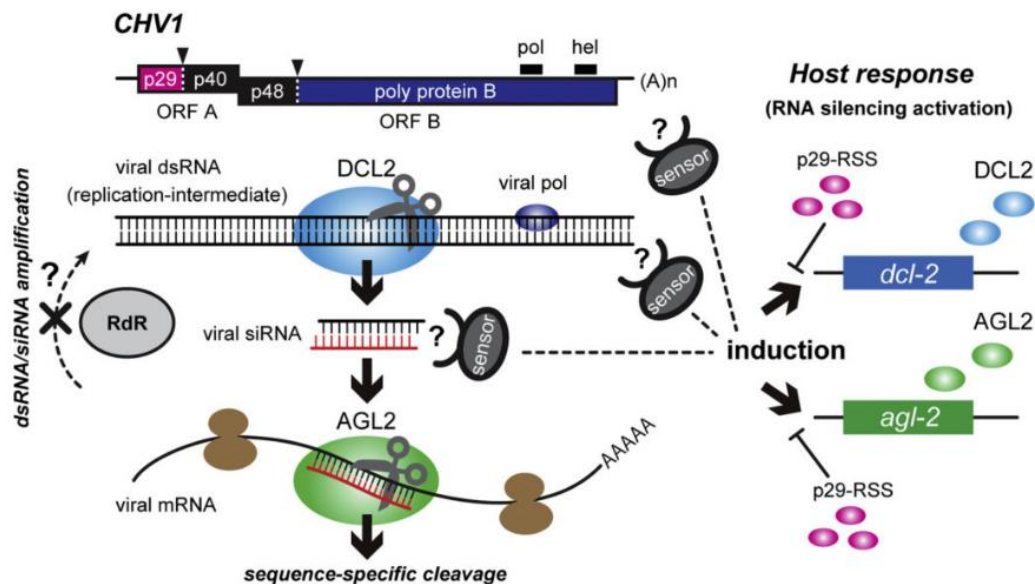


Figura 5: Silenziamento a RNA in *Cryphonectria parasitica* e soppressione; interazione tra CHV1 e *C. parasitica*.

Tale meccanismo è stato studiato in dettaglio per *Cryphonectria parasitica* e *Aspergillus nidulans* (Chang *et al.*, 2012). I geni coinvolti in questo meccanismo sono *dcl2* e *agl2* essenziali per l'induzione del silenziamento genico dell'RNA hanno dimostrato di essere indotti in risposta a infezione da *Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1)* (Zhnag *et al.*, 2014) (**Fig. 5**). I mycovirus, in modo simile ad altri virus di piante e animali, producono soppressori del silenziamento dell'RNA in modo da bloccare la difesa antivirale attivata dal fungo ospite. Per esempio, la proteina p29 del micovirus *CHV1* è in grado di inibire il meccanismo RNAi (Yaegashi *et al.*, 2013).

I micovirus oltre ad interferire sul sistema di difesa del fungo ospite, sono in grado di esercitare effetti anche su aspetti biologici ed ecologici (Choi *et al.*, 2012). È stato dimostrato che i micovirus hanno la capacità di diminuire notevolmente la virulenza dei funghi patogeni. La connessione tra ipovirulenza dei ceppi fungini e infezione virale è stata stabilita per la prima volta all'inizio degli anni '50 (Biraghi, 1954). È stato dimostrato che piante di castagno che presentavano cancri atipici, raramente causavano un'infezione letale. Infatti il ceppo di *C. parasitica* rinvenuto possedeva una ridotta capacità di formazione di spore e una scarsa produzione di laccasi. Successivamente è stato verificato che tali caratteristiche del fungo erano legate alla presenza di un micovirus a dsRNA (Kang, *et al.*, 2001), per cui ceppi ipovirulenti del fungo sono stati successivamente utilizzati per mitigare l'impatto che il cancro corticale del castagno ha avuto in America e successivamente in Europa all'inizio del XX secolo (Anagnostakis *et al.*, S.L., 1982). Altri esempi di effetti negativi dei micovirus sulla biologia ed ecologia dei funghi soprattutto fitopatogeni sono diminuzione del tasso di crescita, mancanza di sporulazione ridotta germinazione di spore, aumento/diminuzione della pigmentazione delle colonie fungine, una riduzione produzione di tossine (Moleleki *et al.*, 2003; Suzaki *et al.*, 2005; Ihrmark *et al.*, 2004; Siddique, 2020).

Capitolo 2

I MICOVIRUS IN BOSCO E L'IPOVIRULENZA DEI FUNGHI FITOPATOGENI

Negli ultimi anni la ricerca sugli agenti di biocontrollo e la loro applicazione in campo è stata ampiamente approfondita in diverse pubblicazioni, maggiormente rivolte a problematiche fitosanitarie di piante coltivate. Recentemente, si è registrato un forte interesse rispetto ai micovirus che parassitizzano funghi patogeni di piante forestali. Di seguito sono stati presi in considerazione alcune malattie forestali che hanno fatto la storia, per le quali sono stati identificati micovirus in grado incidere in modo significativo sul fenotipo del fungo e in modo particolare sulla virulenza. Sicuramente il binomio più studiato è “*Cryphonectria parasitica* e micovirus”, ma ormai sono presenti in letteratura anche esempi di micovirus associati all'ipovirulenza di *Heterobasidion annosum*, *Gremmeniella abietina*, *Ophiostoma ulmi* e *O. novo-ulmi*.

2.1 Cancro Corticale del Castagno e *Cryphonectria parasitica*.

Cryphonectria parasitica (Murr) Barr (sin. *Endothia parasitica* Murr. And) è il fungo Ascomycota agente eziologico del cancro corticale del castagno (*Castanea* spp). Questo fungo è stato segnalato anche sui generi *Quercus* (Turchetti e Maresi, 1990) ed *Eucalyptus* spp. (Old e Kobayashi, 1988), sebbene tali ospiti sono di norma colonizzati da specie appartenenti allo stesso genere o generi affini come *C. cubensis* (Brun.), *C. havenensis* (Brun.) Barr ed *Endothia gyrosa* (Schw. Ex Fries).

C. parasitica fu riscontrata per la prima volta in un giardino zoologico del Bronx a New York all'inizio dello scorso secolo, ma si ritiene che la sua presenza nel Nord America derivi dall'introduzione accidentale di materiale vegetale infetto proveniente dal Giappone (Milgroom *et al.*, 1996). Da allora il patogeno si è rapidamente diffuso, causando la completa distruzione delle foreste di castagno americano costituite dalla specie *C. dentata*

(Anagnostakis, 1987). Oltre a *C. dentata*, risulta particolarmente suscettibile all'infezione anche *C. pumila*, di origine americana. *C. sativa* (europea), ha una minore suscettibilità, mentre abbastanza resistente risulta *C. crenata* (giapponese) e la più resistente *C. mollissima* (cinese).

In Italia, questa malattia è stata segnalata per la prima volta nel 1938 nell'entroterra ligure e da qui, in pochi anni, si è diffusa in tutte le principali aree castanicole del Paese (Baldacci e Orsenigo, 1952). Comunque, sia in Italia che nel resto dell'Europa, gli attacchi si sono mostrati meno gravi rispetto a quelli verificatisi nel continente americano sia per la comparsa di individui del patogeno ipovirulenti che causano lesioni non letali per la pianta (Grente, 1965; Bisiach *et al.*, 1988; Heiniger e Rigling, 1994), sia per una maggiore resistenza naturale del castagno europeo alla malattia (Graves, 1950).



Figura 6: Sintomi dovuti a *Cryphonectria parasitica*: (a) ipertrofia su pollone, (b) necrosi dei tessuti sottocorticali, (c) emissione di rami epicormici.

L'infezione interessa i rami e i tronchi. I primi stadi della malattia evidenziano, in corrispondenza del punto di penetrazione, delle aree rosso-rugginose dal contorno ellittico più o meno irregolare, leggermente depresse (ipertrofia) e col margine leggermente rilevato (**Fig. 6a**). Queste necrosi possono interessare i tessuti floematici e cambiali, con conseguente interruzione del trasporto di linfa elaborata. Nel tempo la necrosi progredisce fino ad interessare l'intera circonferenza della parte colpita (**Fig. 6b**). Inoltre, la disidratazione della corteccia provoca il suo progressivo distacco e fessurazione. Al di sotto del cancro in seguito alla soppressione della dominanza apicale vengono prodotti numerosi rami epicormici (**Fig.**

6c). L'andamento della malattia prosegue dall'alto verso il basso quindi anche questi ricacci saranno devitalizzati man mano che questa si diffonderà verso i tessuti inferiori; solo i ricacci che si svilupperanno alla base del colletto resteranno vitali. La pianta assume così un aspetto arbustivo.



Figura 7: Piante infette da C. parasitica con disseccamenti delle porzioni distali.

Gli organi di riproduzione agamica (picnidi) e gamica (periteci) del fungo si riscontrano fra le fessurazioni dei cancri (**Fig. 8**). I picnidi, di colore rosso ruggine, si formano in primavera e in autunno all'interno di strutture stromatiche sui tessuti colpiti. Quando i picnidi giungono a maturità liberano attraverso l'ostiolo i conidi, spore asessuali unicellulari di forma cilindrica, inglobati in un materiale vischioso che fuoriesce a forma di cirro spiralato.

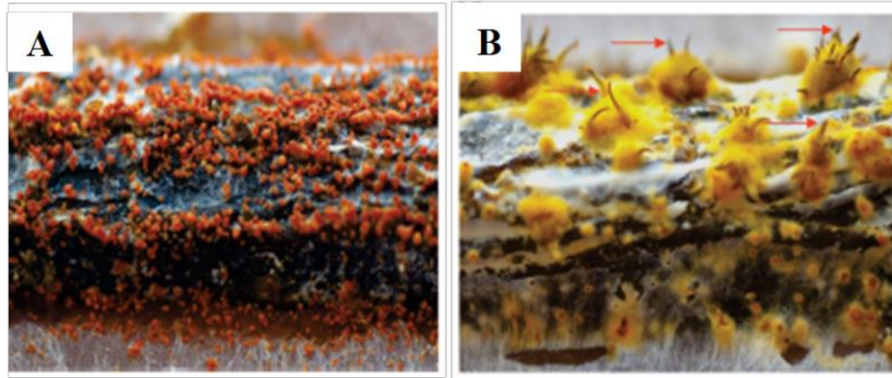


Figura 8: Picnidi arancioni (A), periteci maturi con evidenti colli (frecce rosse) che protrudono dalla corteccia di castagno (B).

(Fonte: Sun et al., 2009).

2.1.1 *Cryphonectria parasitica* e micovirus

L'ipovirulenza in *Cryphonectria parasitica* fu scoperta negli anni '50 da uno studioso italiano Biraghi che osservò dei cancri che tendevano a cicatrizzare e non manifestavano un decorso letale per l'organo colpito. In particolare, possiamo distinguere due tipologie di "cancro corticali anomali": (a) *cancro involutivo* in cui la corteccia palesa lesioni superficiali che tendono a sfaldarsi sotto forma di piccole scaglie e, la presenza di fruttificazioni picnidiche e di rami epicormici è in genere rara; (b) *cancro cicatrizzato* in cui le lesioni sono in parte o completamente risanate da un callo di cicatrizzazione (**Fig. 9**). Successivamente, due studiosi francesi, Grente e Sauret (1969) riuscirono a isolare da cancri cicatrizzati di piante sopravvissute alla malattia, alcuni ceppi di *C. parasitica*. Tali ceppi mostravano in coltura delle anomalie morfologiche rispetto a quei ceppi che causavano cancri letali. Essi infatti mostravano scarsa pigmentazione del micelio, ridotta capacità riproduttiva e ridotta virulenza, quando inoculati su piante sane di castagno. I ceppi che presentavano queste caratteristiche furono denominati ipovirulenti per distinguerli da quelli a fenotipo normale.

In seguito, gli stessi studiosi dimostrarono che attraverso il processo dell'anastomosi ifale (fusione delle ife del micelio), le caratteristiche dei ceppi ipovirulenti potevano essere trasmesse ai ceppi normali con lo scambio di materiale citoplasmatico (**Fig. 10**). Infatti, inoculando artificialmente attorno ad un cancro letale il ceppo ipovirulento, i sintomi della malattia regredivano lentamente, con una buona risposta della pianta.

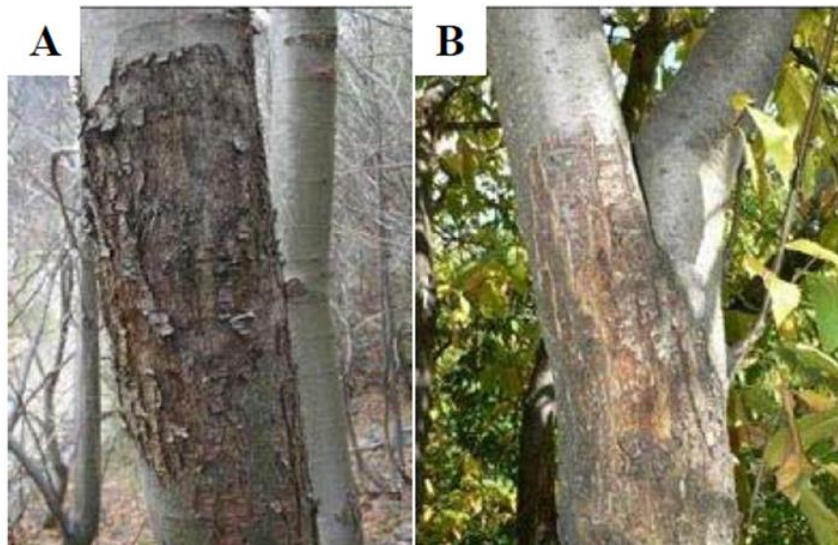


Figura 9: Cancro involutivo (A), cancro cicatrizzato (B).

Parallelamente inoculando un ceppo ipovirulento su una pianta sana, il cancro che ne risultava era superficiale e non letale.

L'ipovirulenza è determinata dall'iperparasitismo di un micovirus del genere *Hypovirus* (*Cryphonectria hypovirus*, *CHV*), caratterizzato dall'assenza del capsido proteico e il cui dsRNA (molecole di RNA a doppia elica) è localizzato nel citoplasma delle cellule dell'ospite (Day *et al.*, 1977; Anagnostakis, 1987; MacDonald and Fulbright, 1991; Choi e Nuss, 1992; Fahima *et al.*, 1993; Heiniger e Rigling, 1994; Hillman *et al.*, 1995; Milgroom, 1995; McCabe *et al.*, 1999).

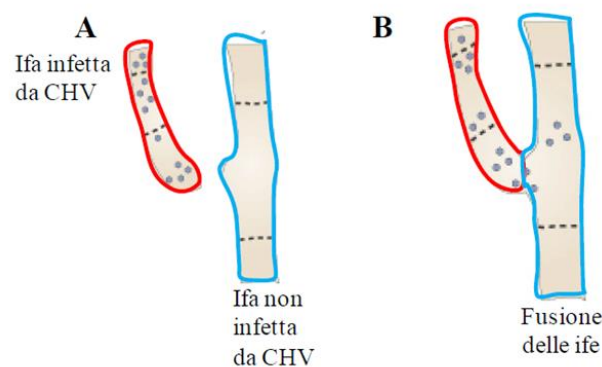


Figura 10: Ifa di *Cryphonectria parasitica* infetta da *CHV* (isolato ipovirulento) (rosso) e ifa non infetta di un isolato virulento (blu) (A); Anastomosi ifale e conversione di ceppo virulento in ceppo ipovirulento (B).

(Fonte: Nuss *et al.*, 2005)

2.1.2 Organizzazione genetica di CHV-1, le funzioni e l'ecologia

CHV-1 appartiene alla famiglia *Hypoviridae*, che comprende il solo genere *Hypovirus* (Nuss e Hillman, 2011; Rigling e Hillman, 2012). Appartenenti a tale genere, sono stati descritti altri tre membri, *CHV-2*, *CHV-3* e *CHV-4*, tutti parassiti di *C. parasitica*. Le quattro specie di *Hypovirus* sono differenti per dimensioni e organizzazione del genoma (Hillman e Suzuki, 2004).

Le dimensioni del genoma di *CHV-1* è di 12,7 kb (**Fig. 11**) ed è composto da due grandi open reading frames (ORFs), ovvero griglie di lettura aperta, denominate ORF A e B.

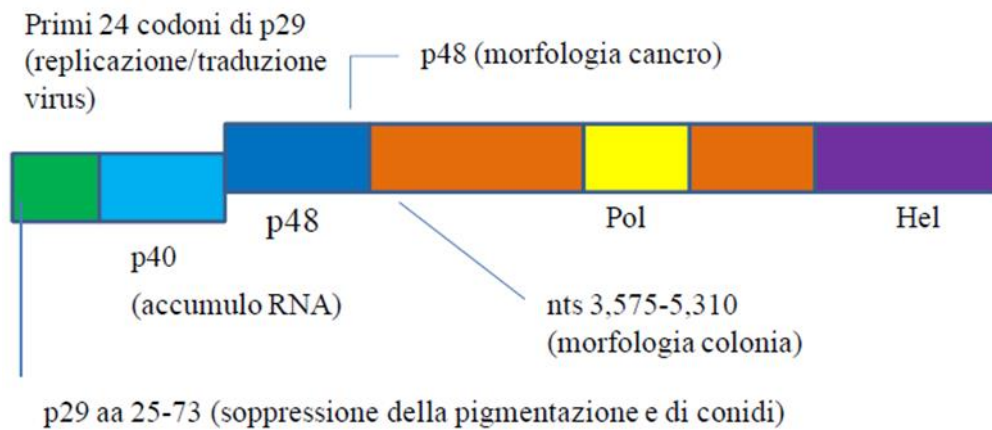


Figura 11: Genoma del virus *CHV-1*.

(Fonte: Nuss et al., 2005)

Entrambe le ORF codificano per poliproteine che sono separate autocataliticamente (Dawe e Nuss, 2001). ORF A codifica per la proteasi p29 e la proteina basica p40. ORF B codifica per la proteasi p48, l'RNA polimerasi RNA-dipendente e l'RNA elicasi. In particolare, la capacità di *CHV-1* di alterare principalmente il fenotipo di *C. parasitica* e il suo adattamento ecologico (almeno in Europa) hanno stimolato la ricerca di domini funzionali in *CHV-1* responsabili di questi effetti. Tra i fattori responsabili dell'alterazione del fenotipo dell'ospite fungino e della fitness del virus (Dawe e Nuss, 2001), è stato dimostrato che p29 svolge un ruolo importante nell'interazione virus-fungo. L'attenuazione della pigmentazione, della sporulazione asessuata e della produzione della laccasi da parte del fungo sono stati associati a p29 (Craven et al., 1993). Inoltre, p29 aumenta anche la replicazione dell'RNA e la

trasmissione verticale del virus nelle spore asessuali (Suzuki *et al.*, 2003). È stato inoltre dimostrato che p40 influenza l'accumulo di RNA (Suzuki e Nuss, 2002). I domini in ORF B sono stati identificati come responsabili della dimensione del cancro, della sua morfologia, della crescita del fungo (Chen *et al.*, 2000) e della perturbazione nelle vie di trasduzione del segnale cellulare nel fungo (Parsley *et al.*, 2002).

Le differenze di organizzazione del genoma e le sue funzioni possono spiegare le differenze nel fenotipo, nell'ecologia e la fitness tra le quattro specie di *CHV*. *CHV-1* non solo è diffuso in Europa, ma anche in Asia, che si pensa sia il suo centro d'origine (Milgroom e Cortesi, 2004). Tuttavia, *CHV-1* non è stato trovato in America del Nord, tranne in alcuni luoghi in cui è stato rilasciato per il controllo biologico (Peever *et al.*, 1997). Recentemente, nella Regione Marche è stato effettuato un monitoraggio nei castagneti per verificare la presenza di cancri ipovirulenti ed è stato possibile isolare ceppi di *C. parasitica* iperparassitizzati dal virus *CHV-1*. Applicando tecniche di next generation sequencing è stato possibile ricostruire l'intero genoma dello stesso virus e metterlo a confronto con altri ceppi virali (Murolo *et al.*, 2018) (Fig. 12).

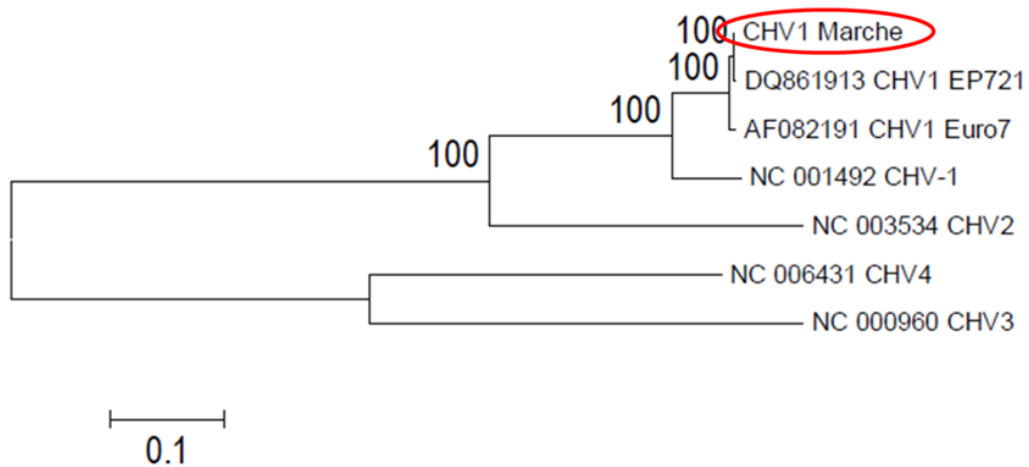


Figura 12: Analisi filogenetica di *CHV1*, responsabile dell'ipovirulenza di *Cryphonectria parasitica*.
(Fonte: Murolo *et al.*, 2018)

Il genoma del *Hypovirus CHV-2* è simile per dimensioni (12,5 kb) a quello di *CHV-1* ed è composto ugualmente da due ORF (Dawe e Nuss, 2001). L'organizzazione di ORF B è molto simile a quello di *CHV-1*, con un omologo p48, p52, la polimerasi e l'elicasi che indicano un'elevata conservazione della sequenza. L'organizzazione di ORF A, tuttavia, è differente.

Infatti, ORF A di *CHV-2* codifica per una sola proteina, p50, che contiene un dominio basico omologo a p40 di *CHV-1*, e quindi manca un omologo per p29 (Hillman e Suzuki, 2004). Al contrario di *CHV-1*, *CHV-2* ha una distribuzione più limitata (Hillman e Suzuki, 2004). È stato trovato solo in due località: una piccola popolazione nel New Jersey e pochi isolati indipendenti in Cina. Anche *CHV-2* induce ipovirulenza in *C. parasitica* e debilita il fungo anche più di quanto fa *CHV-1*, ma ha un adattamento ecologico molto più limitato (Hillman *et al.*, 1994).

Il genoma di *CHV-3* (9,8 kb) è considerevolmente di dimensioni inferiori di quello di *CHV-1* e *CHV-2* ed è costituito da un'unica ORF (Dawe e Nuss, 2001). Esso codifica per un omologo di p29 di *CHV-1*, p32 e una glicosil-trasferasi, una polimerasi e un dominio di proteinasi (Hillman e Suzuki, 2004). *CHV-3* è stato rinvenuto spontaneamente nel Nord America, ma non in Asia ed Europa. È diffuso in Michigan e Ontario e causa a sua volta ipovirulenza, ma il suo effetto sul fungo è molto ridotto rispetto a quello di *CHV-1* o *CHV-2* (Hillman *et al.*, 1994).

Infine, *CHV-4* ha un genoma di 9,1 kb costituito da una singolo ORF, codifica per una polimerasi, un'elicasi e molto probabilmente per un omologo di p29 di *CHV-1* (Linder-Basso *et al.*, 2005). Inoltre, codifica anche per un dominio omologo alla glicosil-trasferasi presente in *CHV-3*. *CHV-4*, inoltre, è diffuso in tutto il Nord America, tuttavia non è associato all'ipovirulenza e ha poco o nessun effetto su *C. parasitica* (Linder-Basso *et al.*, 2005).

Nessuna di queste tre ultime specie di *Hypovirus* ha avuto, quindi, grande successo come agente di biocontrollo, sia a causa della mancanza di adattamento ecologico che a causa di una limitata capacità di ridurre il potenziale patogeno di *C. parasitica* (Milgroom e Cortesi, 2004). La virulenza, combinata all'adattamento ecologico, è la caratteristica peculiare di *CHV-1* che ha portato al successo questo virus come agente di biocontrollo di *C. parasitica* in Europa.

2.1.3 I fattori che regolano la virulenza di *CHV-1*

Comprendere i fattori che governano l'iperparassitismo che *CHV-1* esprime nei confronti di *C. parasitica* può essere di grande interesse anche in un contesto applicativo. Gli iperparassiti vivono un rapporto molto intimo con i loro ospiti (parassiti). La questione del perché e in quali circostanze gli iperparassiti danneggiano il loro ospite, quando, al tempo stesso, essi dipendono dal loro ospite per la sopravvivenza, ha affascinato i ricercatori per diversi decenni (Anderson e May, 1982; Bull, 1994; Frank, 1996; Walther e Ewald, 2004;

Alizon *et al.*, 2009). Dalle ricerche è emerso che gli agenti di biocontrollo devono essere aggressivi quanto basta per ottenere un controllo sufficiente sulla malattia, ma allo stesso tempo devono essere in grado di diffondersi in modo indipendente e persistere nell'ecosistema. Diversi sono i fattori che possono influire sull'efficacia degli iperparassiti nel controllo della malattia sul lungo termine. Sicuramente le condizioni ambientali esterne, in particolare le temperature, rappresentano un fattore chiave che può da una parte aumentare o addirittura reprimere le performance dell'iperparassita (Mitchell *et al.*, 2005; Laine, 2008; Vale *et al.*, 2008; Vale e Little, 2009), dall'altro influire sull'ospite-parassita. Sulla base di queste considerazioni, possiamo quindi dire che l'iperparassitismo degli *Hypovirus*, che controllano con successo il cancro corticale del castagno in alcune zone, potrebbe risultare inefficace in altre regioni, caratterizzate da condizioni climatiche diverse. L'influenza dell'ambiente sull'interazione iperparassita/parassita, richiama inoltre l'attenzione sui cambiamenti climatici che potrebbero determinare la ricomparsa di epidemie di cancro corticale del castagno in regioni in cui la malattia era sotto controllo

Un altro fattore importante che potrebbe influenzare il successo del biocontrollo mediante l'iperparassita *CHV-1* è rappresentato dalla popolazione del parassita *C. parasitica*. Come accennato in precedenza, *CHV-1*, come tutti i micovirus vive in stretto rapporto con il fungo e si trasmette secondo una modalità verticale e orizzontale. La trasmissione orizzontale attraverso l'anastomosi ifale tra individui fungini, tuttavia, è limitata dall'incompatibilità vegetativa in *C. parasitica* (Liu e Milgroom, 1996). In *C. parasitica*, l'incompatibilità vegetativa è controllata da almeno sei loci (*vic*) bi-allelici (Cortesi e Milgroom, 1998). Gli individui compatibili condividono gli stessi alleli in tutti e sei i loci *vic*, mentre individui incompatibili hanno alleli differenti in uno o più loci. La fusione tra cellule di individui incompatibili provoca la morte delle stesse, ostacolando la trasmissione del virus e di altri elementi citoplasmatici. Tra individui compatibili di *C. parasitica*, la trasmissione di *CHV-1* è pari al 100%. Tra i diversi gruppi di compatibilità vegetativa, la trasmissione può comunque verificarsi, ma con tassi più ridotti (Liu e Milgroom, 1996; Cortesi *et al.*, 2001; Papazova-Anakieva *et al.*, 2008). La probabilità di trasmissione di *CHV-1* in popolazioni di *C. parasitica* con grande variabilità di gruppi di compatibilità vegetativa è notevolmente ridotta, limitando così la diffusione di *CHV-1* (Cortesi *et al.*, 2001; Milgroom e Cortesi, 2004). Una delle ragioni del fallimento del controllo biologico con *CHV-1* in Nord America si presume sia legata alla maggiore diversità dei gruppi di compatibilità vegetativa di *C. parasitica* nella popolazione americana rispetto a quella europea (Heiniger e Rigling, 1994; Milgroom e Cortesi, 2004). Tuttavia, nuove introduzioni o la riproduzione sessuale tra differenti genotipi di *C. parasitica*

(Jezic *et al.*, 2012) potrebbe portare a un aumento nella diversità dei gruppi di compatibilità vegetativa anche nelle popolazioni europee. Una potenziale diminuzione dell'efficacia del controllo biologico nel tempo è quindi un problema di grande preoccupazione.

Oltre all'ambiente e alla popolazione fungina ospitante, anche le caratteristiche dello stesso virus possono influenzarne la virulenza. La teoria attuale suggerisce che l'evoluzione della virulenza dipende dal rapporto costi-benefici nel parassita: i benefici dello sfruttamento dell'ospite per la trasmissione del parassita all'interno della popolazione sono contrapposti al costo di questo sfruttamento per la trasmissione del virus tra gli altri ospiti (Anderson e May, 1982; Bull, 1994; Frank, 1996). I parassiti altamente virulenti si moltiplicano rapidamente e sfruttano il loro ospite in maniera efficiente. Questo, però, avviene al costo di debilitare o aumentare la mortalità del fungo, limitando la sua capacità di trasmettere l'iperparassita.

2.1.4 *Controllo biologico del cancro corticale del castagno mediante CHV-1*

La lotta biologica viene definita come l'insieme delle misure che influiscono negativamente, anche in modo indiretto, sull'attività dei parassiti mediante l'intervento di organismi non compresi nel binomio ospite-parassita. (Matta, 1996). In particolare, in patologia vegetale tale metodo ha come obiettivo la riduzione degli attacchi di microrganismi patogeni attraverso l'impiego di altri microrganismi, chiamati antagonisti (funghi, batteri, virus, viroidi) in grado di contrastare un patogeno bersaglio, andando ad interferire con i processi vitali e il ciclo biologico (Baker e Cook, 1974). Nonostante le modalità attraverso cui i microrganismi antagonisti attaccano gli agenti patogeni non siano sempre del tutto chiare, i meccanismi d'azione ad oggi individuati sono molteplici. Tali meccanismi possono essere distinti in meccanismi diretti e indiretti. I meccanismi diretti sono quelli che operano nell'ambito dell'interazione antagonista-patogeno e comprendono: il parassitismo, l'antibiosi e la competizione per spazio e nutrienti. Tra i meccanismi indiretti, invece, vengono incluse tutte quelle modificazioni morfologiche e biochimiche elicitate nella pianta ospite dall'agente antagonista e che si traducono in una maggiore resistenza della pianta a stress abiotici e biotici.

I rischi e gli effetti collaterali associati all'impiego di fungicidi di sintesi, quali la perdita di efficacia conseguente all'acquisizione nei funghi bersaglio e la presenza di residui nei prodotti, e la conseguente necessità di disporre di mezzi alternativi per il contenimento dei patogeni, in un'ottica di integrazione e gestione sostenibile della protezione, assieme alla disponibilità di tecniche molecolari di indagine ha portato, negli ultimi anni, ad un crescente

interesse del mondo scientifico ai micovirus di funghi fitopatogeni (De Miccolis *et al.*, 2014). Questo ha suggerito lo sfruttamento del fenomeno dell'attenuazione della virulenza (ipovirulenza) come una possibile alternativa all'uso dei fungicidi nel controllo biologico dei funghi fitopatogeni.

L'ipovirulenza è un fenomeno in cui la virulenza di patogeni fungini è ridotta o addirittura completamente persa come conseguenza di infezione da virus. Lo studio dei sistemi fungo-micovirus può permettere di comprendere le basi molecolari della virulenza di funghi fitopatogeni e può consentire di derivare informazioni sulle caratteristiche fondamentali delle interazioni virus-fungo-pianta (Nuss, 2005; Li *et al.*, 2008).

Il fenomeno dell'ipovirulenza è stato utilizzato con successo in *C. parasitica*, agente del cancro corticale del castagno, dove il virus *CHV-1* è diventato un importante agente di biocontrollo della malattia, grazie alla combinazione delle sue caratteristiche biologiche.

Si ipotizza che *CHV-1* sia stato introdotto insieme a *C. parasitica* e che abbia seguito la comparsa e la diffusione del fungo (Heiniger e Rigling, 1994; Milgroom e Cortesi, 2004). L'evoluzione dei parassiti obbligati, come i virus, è spesso spazialmente congruente con quella del loro ospite, in quanto la loro distribuzione rispecchia l'areale dell'ospite (Real *et al.*, 2005; Biek *et al.*, 2007; Nadin-Davis *et al.*, 2010; Torres-Pérez *et al.*, 2011). *CHV-1* quindi si diffuse in modo indipendente in tutte le popolazioni di *C. parasitica* in Europa, trasmettendosi da un individuo all'altro e causando l'ipovirulenza del fungo.

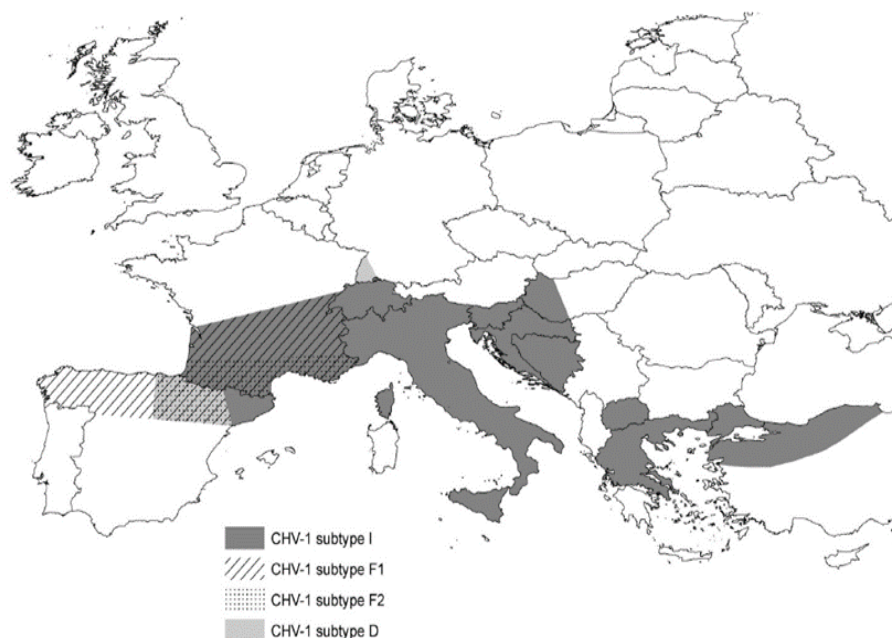


Figura 13: Distribuzione dei sottotipi di *Cryphonectria hypovirus 1* in Europa.

In Europa sono stati descritti quattro sottotipi, geneticamente distinti di *CHV-1*: sottotipo I, F1, F2 e D (Allemann *et al.*, 1999; Gobbin *et al.*, 2003). La differenza nucleotidica tra i sottotipi è stimabile intorno all'11-19% (Gobbin *et al.*, 2003). Il sottotipo I è il più diffuso ed è stato rinvenuto in Italia, Francia, Svizzera, Balcani, Grecia e Turchia (**Fig. 13**) (Allemann *et al.*, 1999; Gobbin *et al.*, 2003; Sotirovski *et al.*, 2006; Krstin *et al.*, 2008; Robin *et al.*, 2010; Krstin *et al.*, 2011). I sottotipi F1 e F2 sono meno diffusi, infatti sono stati identificati solo in Francia e nel nord della Spagna, mentre il sottotipo D è stato registrato in Germania meridionale e nel nord della Spagna (Fig. 10) (Allemann *et al.*, 1999; Gobbin *et al.*, 2003, Montenegro *et al.*, 2008; Robin *et al.*, 2010).

I quattro sottotipi differiscono non solo per la distribuzione e la prevalenza, ma anche per la virulenza (Chen e Nuss, 1999; Peever *et al.*, 2000, Robin *et al.*, 2010). Il sottotipo I è il meno virulento, il sottotipo D è intermedio e i sottotipi F1 e F2 sono i più virulenti.

La diffusione naturale di *CHV-1* è stata incentivata da tentativi di biocontrollo attivo e insieme hanno portato ad una grande diffusione dell'infezione da virus in Europa (Heiniger e Rigling, 1994). Ad oggi, l'incidenza in Europa del cancro corticale è molto alta, ma la severità della malattia è mantenuta bassa grazie all'ipovirulenza. Anche in Nord America furono intrapresi dei trattamenti di biocontrollo con *CHV-1*, ma con scarso successo (Milgroom e Cortesi, 2004). Le possibili ragioni potrebbero essere la più alta suscettibilità al cancro dei castagni americani, le differenze nella struttura della popolazione del fungo ospite, le differenze nella virulenza dei virus applicati, le differenze ambientali o un'interazione di tutti questi fattori (MacDonald e Fulbright, 1991; Dawe e Nuss, 2001; Milgroom e Cortesi, 2004). Inoltre, a differenza della situazione in Nord America, in Europa l'ipovirulenza comparve durante le prime fasi dell'epidemia di cancro (Anagnostakis, 1982), e ciò può aver impedito che diventasse un fenomeno devastante.

2.2 Marciumi radicali e *Heterobasidion spp.*

Heterobasidion spp. è un patogeno agente di marciume radicale e carie del fusto, che colpisce diverse specie di conifere, deprezzandone il legname, favorendone il ribaltamento e giungendo in alcuni casi a far deperire gli alberi sino alla morte. Ampiamente diffuso nei nostri climi, *Heterobasidion* rappresenta nei boschi temperati una delle principali fonti di danno, sebbene relativamente poco numerosi siano gli studi che giungono a quantificare con una certa attendibilità l'ammontare delle perdite economiche (Pratt, 1996, Pukkala *et al.*, 2004). Una stima approssimata dei soli danni diretti (perdita del valore del legname) superava nel 2002 gli 800 milioni di euro, nei 15 paesi dell'Unione Europea.



Figura 14: Sintomi causati da *Heterobasidion* su un tronco di abete rosso accatastato.

I sintomi causati da *Heterobasidion spp.* variano a seconda delle specie patogene coinvolte, delle specie arboree infette, dell'età e dell'uso precedente del popolamento forestale, del tipo di suolo, del clima locale e anche dell'inquinamento atmosferico. La malattia provocata, marciumi radicali e del fusto, viene anche chiamata "mal del rotondo", espressione indicante la tipica, ma non esclusiva, modalità di diffusione centrifuga in un popolamento.



Figura 15: Piante di abete rosso infette da *Heterobasidion*, ribaltate con la zolla di terra.

Quando la colonizzazione fungina si verifica nel durame (come ad esempio nella stragrande maggioranza degli abeti rossi infetti in Europa), i sintomi esterni sono quasi nulli e l'infezione viene normalmente rilevata in caso danni causati dal vento o quando gli alberi vengono tagliati

a fine ciclo produttivo (**Fig. 15**). La sua azione si svolge infatti senza sintomi apparenti (i carpofori si manifestano molto raramente), sino al momento dell'utilizzazione legnosa, quando le ceppaie tagliate rendono evidenti marciumi colorati e parti interamente cave che risalgono nel tronco, rendendolo inutilizzabile, se non per fini energetici.

Quando l'infezione si verifica nell'alburno (come comunemente osservato su vere specie di abete in Nord America), una riduzione dell'alburno funzionale si tradurrà in una crescita stentata e a ingiallimenti e clorosi della chioma. Tuttavia, i sintomi si manifestano solo dopo che una percentuale significativa dell'alburno dell'albero è degenerata (Greig, 1998). Sebbene le specie *Heterobasidion* siano tutte note per causare un marciume bianco, le sostanze chimiche secrete sia dall'ospite che dall'agente patogeno nelle prime fasi dell'infezione provocano una macchia più scuro-violacea nel legno (**Fig. 16**). Il legno degradato assume un aspetto scuro e "umido", prima di assumere il suo aspetto finale di marciume bianco. La carie può essere rilevata nelle radici primarie, nella corona della radice e nel tronco, a volte a diversi metri dal suolo (Stenlid *et al.*, 1998).

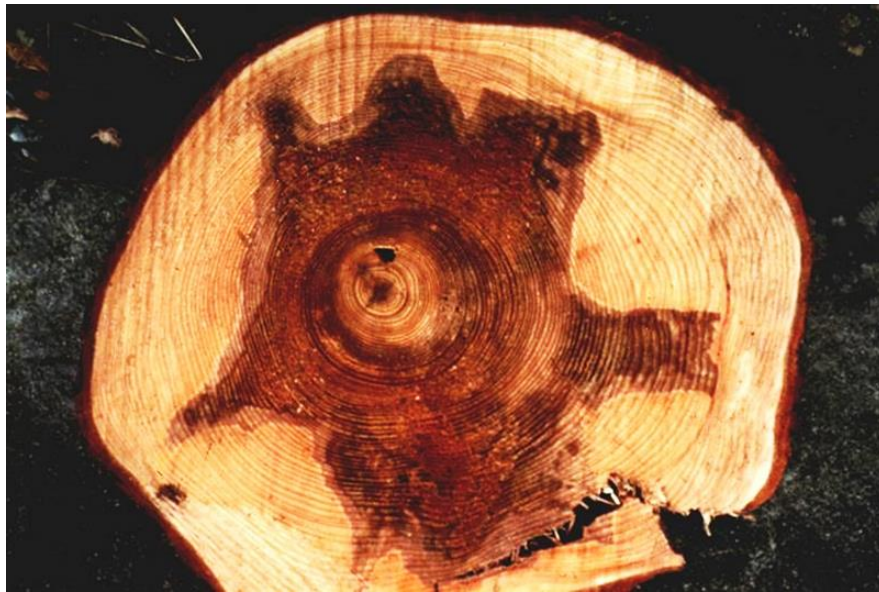


Figura 16: Foto dei sintomi causati da *Heterobasidion*.

(Fonte: Paolo Capretti)

Il genere *Heterobasidion* Basidiomycota, Russulales include diverse specie tra cui *Heterobasidion annosum* s.s. attacca principalmente i pini (*Pinus* spp.), in particolare il pino

silvestre (*Pinus sylvestris* L.), ma può essere associato a molte altre conifere e persino ad alcune specie di latifoglie. *H. parviporum* è strettamente associato all'abete rosso [*Picea abies* (L.) Karst.], mentre *H. abietinum* è comunemente associato all'abete bianco (*Abies alba* Mill.) e ad altre specie del genere *Abies*. Nel Nord America, *H. irregulare* attacca generalmente i pini, i ginepri (*Juniperus* spp.) e in Italia nel 2004 è stato segnalato su *Pinus pinea*. Infine, *H. occidentale* mostra una gamma di ospiti più ampia e può essere trovato sui generi *Abies*, *Picea*, *Tsuga*, *Pseudotsuga* e *Sequoiadendron* (Garbelotto e Gonthier, 2013).

I corpi fruttiferi sono a forma di mensola semicircolare ampiamente fissata al substrato o crostosi, superiormente di color ardesia ed inferiormente, dove è situato lo strato fertile finemente poroso, di colore chiaro (**Fig. 17**). I corpi fruttiferi si formano per lo più a livello della lettiera, inseriti alla base delle piante morte o delle ceppaie o sopra le radici emergenti dal terreno (Pegler e Waterston, 1968), ma si possono differenziare anche sulla parte bassa dei tronchi.



Figura 17: Carpofores di *Heterobasidion*.

(Fonte da destra: <https://www.forestresearch.gov.uk>; Steven Katovich, Bugwood.org)

L'imenio è caratterizzato da una colorazione biancastra e presenta pori arrotondati-angolosi (**Fig. 18**), attraverso cui vengono prodotte e rilasciate le basidiospore. Le basidiospore costituiscono un mezzo di diffusione a distanza assai efficiente e da esse deriva la possibilità di sviluppo di nuovi focolai in popolamenti indenni. L'infezione inizia a partire dalla superficie

delle ceppaie tagliate di fresco o da ferite presenti alla base del tronco; da qui il fungo colonizza i tessuti della ceppaia e dell'apparato radicale. Il periodo di più alta colonizzazione delle ceppaie corrisponde essenzialmente a quello di maggior produzione delle spore, di solito la tarda estate e l'autunno (Pegler e Waterston, 1968).



Figura 18: Dettaglio della parte inferiore di un carpoforo di *Heterobasidion*.

(Fonte: <http://www.naturespot.org.uk>, Graham Calow)

2.2.1 Micovirus e *Heterobasidion*

Il gen. *Heterobasidion* ospita virus appartenenti alle famiglie *Partitiviridae* (Ihrmark, 2001; Kashif *et al.*, 2015), *Narnaviridae* (Vainio *et al.*, 2015) nonché il virus *Heterobasidion RNA 6* (*HetRV6*) (Vainio *et al.*, 2012; (Kashif *et al.*, 2019)), attualmente non ancora classificato in nessuna famiglia.

I virus appartenenti alla famiglia *Partitiviridae* hanno il genoma bipartito con RNA a doppia elica (dsRNA) e sono in grado di infettare piante, funghi o protozoi (Nibert *et al.*, 2014). Vainio *et al.* (2010) hanno dimostrato che quando *Heterobasidion annosum* è colonizzato da *Heterobasidion alphapartitivirus* (*HetPV13-an1*) causa riduzioni della crescita, inoltre, sono state registrate importanti alterazioni nell'espressione genica anche per *H. parviporum* (**Fig. 19**). In particolare *HetPV13-an1* causa dei cambiamenti nel metabolismo dei carboidrati e degli amminoacidi del fungo, suggerendo che il virus determina “uno stato di

fame” nel il fungo che tenta di compensare con vie metaboliche alternative. Tale micovirus sembra avere anche un certo impatto sui geni che codificano per proteine associate a reazioni redox (ossidoreduttasi, idrolasi, aldoriduttasi, perossidasi e monoossigenasi) (Vainio *et al.*, 2018).

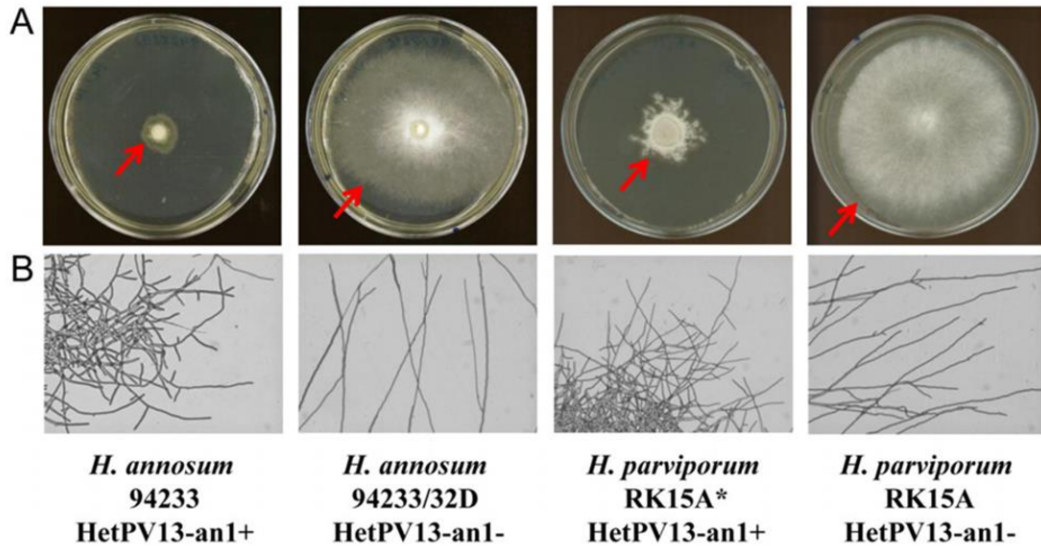


Figura 19: *H. annosum* in presenza e in assenza del virus *HetPV13-an1*.
(Vainio *et al.*, 2018)

I genomi di *Alphapatitivirus* variano da 3,6 a 3,9 kbp e sulla base di osservazioni effettuate al microscopio elettronico le particelle appaiono arrotondate e sono isometriche (**Fig. 20**). Si trasmettono per via intracellulare durante la divisione cellulare o la fusione cellulare e la sporogenesi.

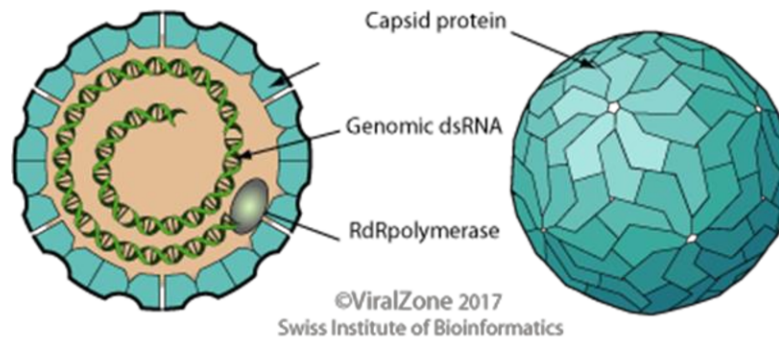


Figura 20: Disegno schematico di un micovirus appartenente alla famiglia Partitiviridae.
(Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics)

Per quanto riguarda la potenziale applicazione nel biocontrollo di *HetPV13-an1*, la presenza comune di ceppi virali simili in natura suggerisce un basso livello di rischio nel caso si effettuasse un'introduzione artificiale di *HetPV13-an1*. Gli studi non si sono fermati solo all'analisi di laboratorio a valutare le caratteristiche fenotipiche del fungo e a livello genico a verificare i geni del fungo che vengono repressi dal virus, ma *Heterobasidion* parassitizzati dal virus *HetPV13-an1* sono stati anche inoculati in pianta, facendo registrare risultati promettenti che però devono essere validati su più ampia scala (Vainio *et al.*, 2018). Questo potrebbe rappresentare una soluzione biologica per mitigare una problematica fitosanitaria che annualmente ha un impatto notevole sulla produzione di legname derivante da abete rosso in Europa.

2.3 Cancro del fusto delle conifere e *Gremmeniella abietina*

Gremmeniella abietina, fungo Ascomycota, è agente eziologico del cancro del fusto delle conifere è presente in quasi tutto il mondo (Nord America, Europa, Asia) (Donaubauer, 1972; Santamaria *et al.*, 2005). In Europa è stata segnalata all'inizio del XX secolo (Nevalainen, 2002; Sikström *et al.*, 2005) su *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pinus cembra*, *Pinus mugo*, ma anche di *Picea abies*.

La distribuzione geografica va dalla regione boreale a quella mediterranea. Nelle foreste scandinave, i pini e l'abete rosso sono tra i principali ospiti da *G. abietina* (Barklund e Unestam, 1988; Witzell e Karlman, 2000) e il pino silvestre è considerato più sensibile dell'abete rosso (Barklund e Rowe, 1981; Barklund e Unestam, 1988; Anglberger e Halmshlager, 2003). In Svezia, sono stati documentati diversi focolai estesi di *G. abietina* dalla fine degli anni '50 (Hellgren e Barklund, 1992; Wulff *et al.*, 2006). Nel 2000-2003, un'epidemia di *G. abietina* si è diffusa nelle foreste di pini svedesi con sintomi che sono diventati sempre più evidenti a partire dall'estate del 2001 (Sikström *et al.*, 2011). Questa epidemia è stata registrata come l'epidemia più grave finora in Svezia (Bernhold *et al.*, 2011) (**Fig. 21**). L'inventario forestale nazionale svedese (NFI) ha stimato che quasi il 6% delle foreste di pini (484.000 ha) è stato infettato nel periodo 2001-2003 (Wulff *et al.*, 2006), con il conseguente abbattimento di oltre 50.000 ettari di pino silvestre a partire del 2001 (Wulff *et al.*, 2006; Bernhold *et al.*, 2011). Inoltre, studi hanno documentato alti livelli di mortalità (454 alberi ha⁻¹) nei primi cinque anni successivi alle epidemie (Sikström *et al.*, 2011), con forti attacchi di patogeni di debolezza nonché infestazione da parte di insetti coleotteri. All'interno dei popolamenti giovani (30-50 anni) e produttivi, le piante malate hanno avuto un forte impatto sulla crescita, con perdite stimate 42-73% (Sikström *et al.*, 2011).



Figura 21: Disseccamenti localizzati delle gemme e degli aghi (sinistra), estesi disseccamenti dei rami e morte delle piante.

Nell'Europa settentrionale sono stati individuati biotipi di *G. abietina*, uno che attacca prevalentemente le giovani piante (STT) e l'altro che invece attacca piante adulte (LTT) (Kaitera *et al.*, 2000) (**Fig. 21**). I danni maggiori si evidenziano sulle giovani piantine che rapidamente possono andare incontro a completo disseccamento (**Fig. 22a, b, c**).



Figura 22: Sintomi di (a) clorosi e (b) avvizzimento; (c) tessuti brunastri in una pianta per il controllo degli endofiti e (d) corpi fruttiferi di *G. abietina*.

(Fonte: Romeralo *et al.*, 2015)

Durante la primavera o l'inizio dell'estate sui germogli recentemente uccisi sono visibili i corpi fruttiferi vegetativi (picnidi), di circa 1 mm di diametro e di colore nero lucido o bruno scuro. Due anni dopo l'infezione si formano i corpi fruttiferi sessuali, gli apotecii (**Fig. 22 d**). La dimensione degli apotecii è all'incirca la stessa dei picnidi, ma il colore è più bruno. Quando l'umidità dell'aria è elevata (durante o dopo la pioggia) gli apotecii si aprono, l'imenio grigio chiaro è esposto, liberando le ascospore (Cauchon e Lachance, 1980).

2.3.1 *Gremmeniella abietina* e micovirus

Diversi studi hanno documentato la presenza di micovirus all'interno di isolati di *G. abietina*, descrivendo anche la struttura del genoma (**Fig. 23**). In particolare, sono stati descritti virus appartenenti ai *Totivirus* (Tuomivirta *et al.*, 2002), ai *Partitivirus* (Tuomivirta e Hantula, 2003; Tuomivirta e Hantula, 2005), ai *Mitovirus* (Tuomivirta e Hantula, 2003; Botella *et al.*, 2012), agli *Endornavirus* (Tuomivirta *et al.*, 2009) e un micovirus non ancora classificato (Botella *et al.*, 2015; Nibert *et al.*, 2014) (**Fig. 23**).

Dallo studio comparato di isolati di *G. abietina* parassitizzati o non da *Mitovirus*, allevati in diverse condizioni di temperatura, pH e potenziale osmotico, è stato possibile verificare che alla temperatura ottimale i *Mitovirus* addirittura stimolano la crescita del micelio del fungo patogeno. Questo aumento della crescita miceliale potrebbe essere correlato a una maggiore virulenza del patogeno poiché, in termini generali, una minore crescita del micelio è strettamente associata all'ipovirulenza dei funghi (Romeralo *et al.*, 2012).

Oltre ai *Mitovirus*, sono state fatte delle indagini preliminari su *Gremmeniella abietina* *RNA virus 6* (*GaRV6*) (Botella *et al.*, 2017) (**Fig. 23**), che hanno rilevato l'impatto negativo che questo virus esercita sulla crescita miceliale del patogeno (Nerva *et al.*, 2016). Tale caratteristica non è temperatura dipendente, ma è legata all'elevata carica virale. Il comportamento del virus *GaRV6* è conforme al comportamento del virus correlato a *Rhizoctonia solani dsRNA virus 1* (*RsRV1*), che è stato trovato all'interno di un isolato di *R. solani* con tasso di crescita più lento e ridotta patogenicità rispetto a isolati virulenti.

Ovviamente la possibilità di utilizzare il micovirus *GaRV6* come agente di controllo necessita di ulteriori approfondimenti, in quanto questo effetto potrebbe non essere dovuto alla mera presenza del micovirus *GaRV6*, in quanto alcuni isolati fungini sono state rinvenute delle infezioni virali multiple (Botella *et al.*, 2017).

| Virus Name | Virus Abbreviation | Full-Length Virus Strains | GenBank Accessions * | Virus Genus | Genome | Fungal Population | Population Studies | Countries Detected |
|---|--------------------|---------------------------|---|-------------------------|-----------|-------------------|--------------------|--|
| Gremmeniella abietina RNA virus multi segmented 1 | GaRV-MS1 | 3 | KJ786411- KJ786413, AY089993-5, AY615211-13, | <i>Gammartitivirus</i> | dsRNA | A, B, SP | YES | Canada, USA, Finland, Spain, Montenegro, Italy, Turkey |
| Gremmeniella abietina mitovirus 1 | GMV1 | 3 | HE586988, AF534641, AY615209 | <i>Mitovirus</i> | (+) ssRNA | A, SP | YES | Finland, Spain |
| Gremmeniella abietina mitovirus 2 | GMV2 | 1 | JN654496 | <i>Mitovirus</i> | (+) ssRNA | B, SP | YES | Finland, Spain |
| Gremmeniella abietina RNA virus lone | GaRV-L | 2 | AF337175, AY615210 | <i>Totivirus</i> | dsRNA | A | NO | Finland |
| Gremmeniella abietina RNA virus XL | GaBRV-XL | 2 | DQ399289-90 | <i>Betaendornavirus</i> | dsRNA | B | NO | Finland |
| Gremmeniella abietina RNA virus 6 | GaRV6 | 1 | KJ742567.1 | Unassigned † | dsRNA | A, SP | YES | Finland, Canada, Italy, Spain |

† Virus belonging to a new family not defined and submitted in the ICTV yet. * GenBank accession numbers of full-length virus sequences.

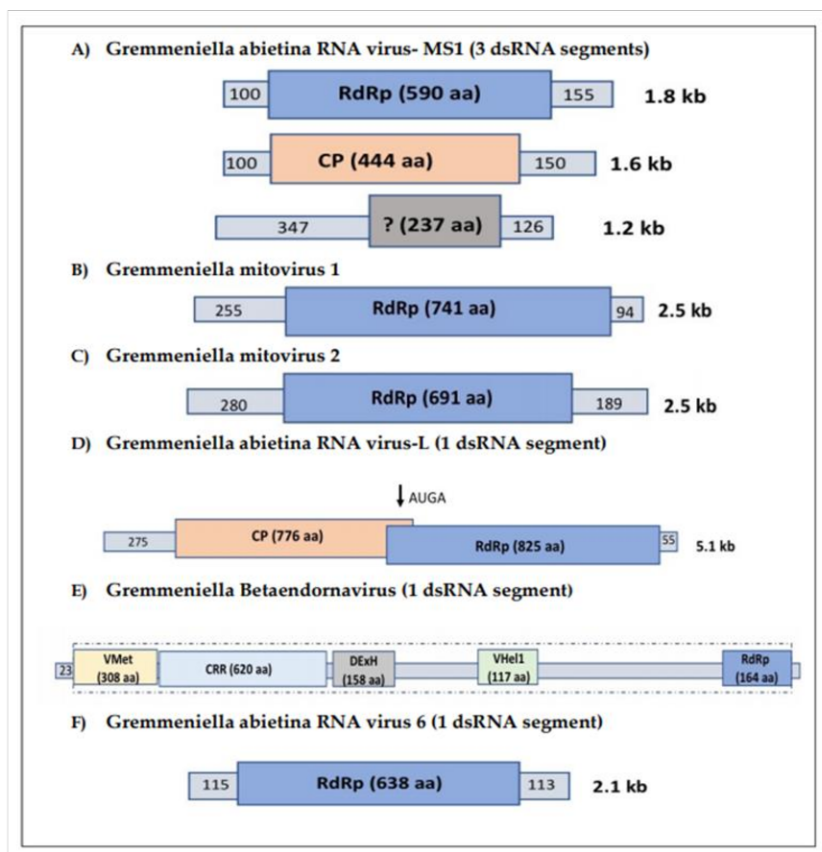


Figura 23: Lista dei principali micovirus riportati per *G. abietina* e rappresentazione grafica della struttura dei loro genomi dei principali.

(Fonte: Botella e Hantula, 2018)

2.4 Grafiosi dell'olmo e *Ophiostoma ulmi* e *Ophiostoma novo-ulmi*.

La grafiosi dell'olmo causata da alcuni funghi *Ascomyceti* del genere *Ophiostoma* (*Ophiostoma ulmi* s.l.), è una delle malattie più distruttive degli alberi legnosi mai conosciute nella patologia vegetale (Santini *et al.*, 2015). La gravità e la devastazione delle sue pandemie hanno suscitato l'interesse dell'opinione pubblica e dei ricercatori (Rohring, 1996). A seguito della grafiosi dell'olmo, durante l'ultimo secolo gli olmi hanno subito gravi perdite in tutto il mondo, con la quasi totale scomparsa di alberi adulti in molte aree europee, asiatiche e nordamericane. Si sono verificate due pandemie, la prima, causata da *O. ulmi*, iniziò in Europa negli anni '10 (Spierenburg, 1921) devastò rapidamente le popolazioni di olmi in Europa e, 20 anni dopo, nel Nord America (Brasier, 2000; Guries, 2001), attenuandosi in Europa intorno al 1940 (Brasier, 1979; Mittempergher, 1989). Alcuni anni dopo, a metà del 1900, una seconda e più distruttiva pandemia causò il deperimento diffuso di olmi maturi in Europa, Asia occidentale e Nord America (Gibbs e Brasier, 1973; Brasier e Kirk, 2001). Questa seconda pandemia, ancora attiva, è dovuta a una specie diversa, virulenta *O. novo-ulmi* (Brasier, 1991), che ha quasi totalmente sostituito *O. ulmi*. Inoltre, sono stati identificati due biotipi di *O. novo-ulmi*: *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, precedentemente nota come biotipo euro-asiatico (EAN), e *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, precedentemente nota come biotipo nord americano (NAN – Brasier, 1979; Brasier e Kirk, 2001). Dagli anni '80 è stata rilevata la presenza di ibridi tra queste due biotipi. Gli ibridi, la cui patogenicità non differisce da quella dei progenitori (Santini *et al.*, 2005), si stanno ora espandendo attraverso i continenti (Brasier e Kirk, 2010). Una terza specie, *O. himal-ulmi*, che causa anche la grafiosi dell'olmo, è stata identificata in Himalaya (Brasier e Mehrotra, 1995), ma la sua presenza non è stata ancora segnalata in Europa o Nord America.

O. ulmi è un patogeno molto meno aggressivo di *O. novo-ulmi* (Fig. 24). Entrambi sono patogeni agenti di tracheomicosi, quindi colonizzano i fasci vascolari. *O. ulmi* si muove molto più lentamente di *O. novo-ulmi* dai rami verso la base del fusto e l'avanzare della malattia è generalmente lento. In genere le piante riescono a reagire e a recuperare, anche in quelle specie di olmo notoriamente poca resistenti (es. *Ulmus procera*).

Si ritiene che i composti fitotossici siano coinvolti nel processo infettivo. In particolare, il ruolo della cerato-ulmina è stato oggetto di approfondite indagini. In particolare è stato

dimostrato che l'elevata capacità del fungo di produrre questa tossina è legata alla virulenza. La produzione di CU è un'altra caratteristica che differenzia *O. ulmi* da *O. novo-ulmi*: *O. ulmi* (la specie meno aggressiva) produce quantità nulla o molto basse di (Scheffer *et al.*, 1987).

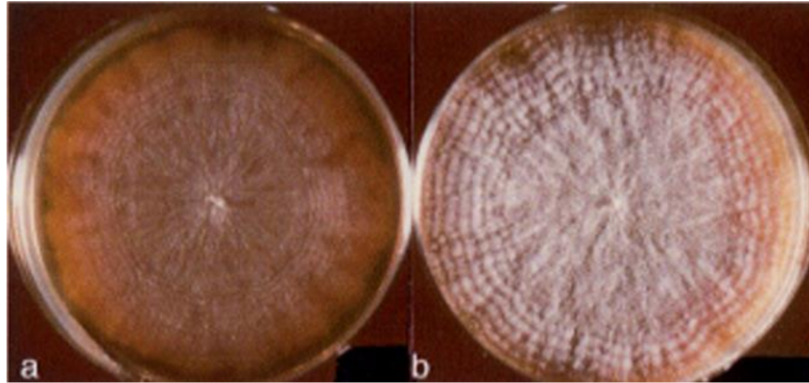


Figura 24: Colonia di *O. ulmi* (a) e *O. novo-ulmi* (b).

(Fonte: C. Brasier)

I sintomi dell'infezione da *O. ulmi* su olmo sono quelli tipici di una malattia tracheomicotica (Fig. 25). I primi sintomi esterni sono la perdita del colore verde brillante e l'appassimento delle foglie sulla parte distale dei rami. Le foglie possono andare incontro a filloptosi o se il processo di deperimento della pianta è rapido, le foglie possono rimanere secche attaccate al ramo. I sintomi si diffondono lungo i rami centralmente, interessando l'intera chioma e l'albero muore rapidamente.



Figura 25: Sintomi di appassimento delle porzioni distali di piante di olmo infette da *O. ulmi* (sinistra), e piante adulte con chioma quasi completamente compromessa (destra).

Un tipico sintomo interno della malattia è la formazione di un anello marrone nell'alburno infetto a causa della formazione di tilosi e gel nei vasi xilematici (Stipes e Campana, 1981; Rioux *et al.*, 1998; Ouellette *et al.*, 2004a; Ouellette *et al.*, 2004b; Et-Touil *et al.*, 2005), con conseguente loro ostruzione (Zimmermann e McDonough, 1978; Newbanks *et al.*, 1983) (**Fig. 26**). Un'infezione sistemica riduce drasticamente la conducibilità idraulica nello xilema funzionale, provocando una grave sindrome da avvizzimento che uccide rapidamente l'albero (MacHardy e Beckman, 1973).



Figura 26: Tipico imbrunimento dei vasi xilematici evidenti facendo una sezione trasversale di un ramo di olmo infetto da *O. novo ulmi* (sopra); Fasi di germinazione e moltiplicazione di *O. novo-ulmi* osservate al microscopio all'interno delle cellule xilematiche di olmo.

(Fonte: Sherif *et al.*, 2016).

Esiste una notevole variazione tra le specie di olmo nella resistenza alla grafiosi. Gli olmi asiatici sono solitamente i più resistenti (Smalley e Kais, 1966; Ware, 1995; Smalley e Guries, 2000), mentre la maggior parte degli olmi nordamericani sono altamente sensibili e le specie europee sono da moderatamente a molto sensibili (Gibbs, 1978; Dunn, 2000). Infezioni da *O. ulmi* e *O. novo-ulmi* sono state riscontrate solo negli olmi, con un'unica eccezione per *Zelkova carpinifolia* che pur appartenendo alla famiglia delle *Ulmaceae* non si infetta (Sinclair e Campana, 1978). Tutte e tre le specie di olmi europei sono sensibili, ma *Ulmus minor* mostra almeno una certa resistenza contro *O. ulmi*. Delle sei specie di olmo americano, *Ulmus americana*, *U. thomasii*, *U. alata*, *U. serotina* e *U. rubra* sono segnalate come altamente sensibili, mentre *U. crassifolia* mostra una certa resistenza. Le specie di olmo asiatico *U. parvifolia* e *U. pumila* mostrano alti livelli di resistenza e sono state utilizzate nei programmi di allevamento per creare ibridi più resistenti all'attacco del patogeno (Smalley e Guries, 2000). Rispetto agli olmi suscettibili, gli olmi resistenti mostrano alcune caratteristiche anatomiche peculiari dei vasi xilematici (McNabb *et al.*, 1970; Sinclair *et al.*, 1975; Solla e Gil, 2002a; Solla e Gil 2002b; Solla *et al.*, 2005; Elgersma, 1970; Ewers *et al.*, 1990; Tyree e Zimmermann, 2002; Martín *et al.*, 2009).

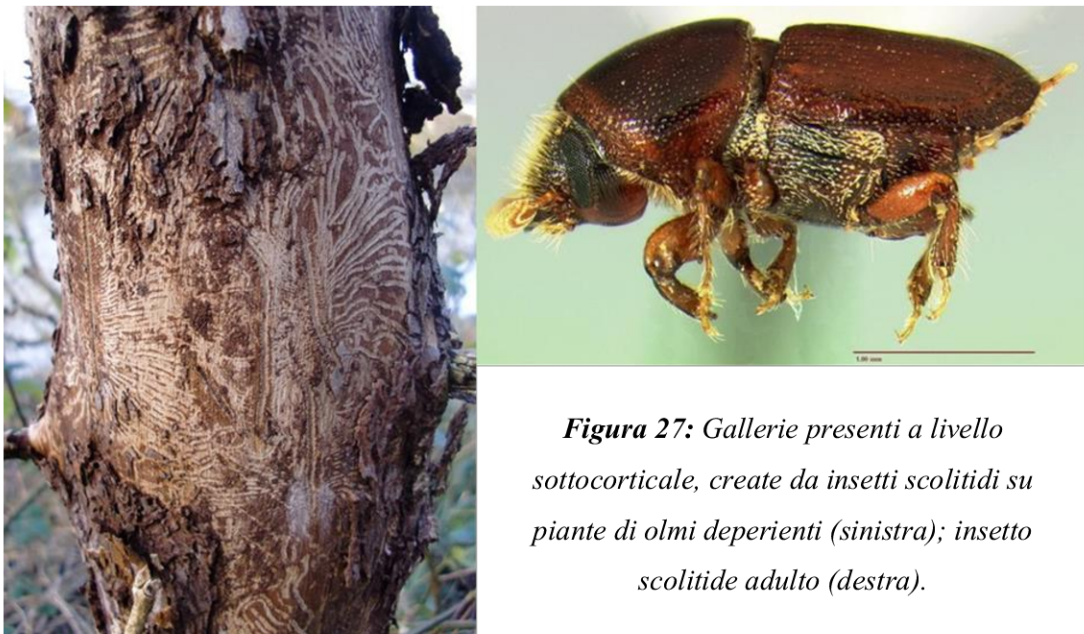


Figura 27: Gallerie presenti a livello sottocorticale, create da insetti scolitidi su piante di olmi deperienti (sinistra); insetto scolitide adulto (destra).

La gravità di questa malattia è dovuta principalmente alla rapidità e all'efficienza della sua diffusione, particolarmente rapida grazie all'associazione di *O. ulmi* s.l. con gli scolitidi (Brasier, 1990) (**Fig. 27**). Questi coleotteri si riproducono nelle porzioni sottocorticali di olmi

già debilitati per altri stress biotici o abiotici. I coleotteri adulti che sfarfallano volano verso gli olmi sani, dove si nutrono, o direttamente verso gli olmi infetti per la riproduzione. Qui si contaminano con le spore del patogeno e diventano efficienti vettori dello stesso.

Oltre alla dispersione attraverso vettori, *O. ulmi* si può diffondere attraverso anastomosi radicale, cioè la fusione tra radici della stessa specie di alberi limitrofi. In questo modo l'inoculo entra direttamente nel fusto e viene portato verso l'alto attraverso il flusso linfatico, interessando contemporaneamente l'intero albero. Di solito non possono essere prese contromisure e gli olmi suscettibili vanno incontro a deperimento e morte nel giro di poco tempo.

2.4.1 *Ophiostoma ulmi* e micovirus

Per quanto riguarda *Ophiostoma ulmi* e, più in particolare *Ophiostoma novo-ulmi*, inizialmente erano stati individuati più segmenti di RNA a doppio filamento (dsRNA) che erano stati definiti fattori d (Brasier, 1986; Sutherland *et al.*,1997), trasmissibili per via citoplasmatica che determinavano una riduzione della crescita del fungo (Fig. 28).

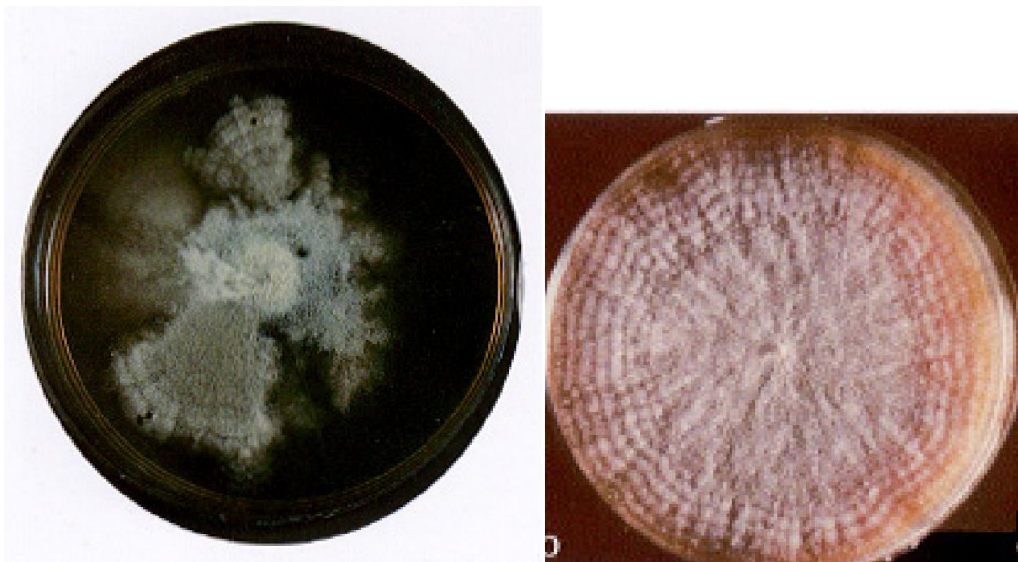


Figura 28: Coltura di *O. novo-ulmi* infettata con fattori d, che mostra un tipico modello di crescita irregolare e instabile (a sinistra) e una coltura non infetta con una crescita regolare (a destra).

(Fonte: Clive Brasier)

Solo successivamente, è stato possibile verificare che si trattasse di micovirus appartenenti alla famiglia *Narnaviridae* e alla specie *Mitovirus*. Un totale di tredici dsRNA sono stati isolati da diversi isolati di *Ophiostoma* (Sutherland e Brasier, 1995) e un isolato di *O. novo-ulmi* (Ld), è risultato infetto da dodici *mitovirus* distinti (Cole *et al.*, 1998). Per *OnuMV3a*, *OnuMV4-Ld*, *OnuMV5-Ld*, *OnuMV6-Ld* sono disponibili oggi le sequenze genomiche complete (Hong *et al.*, 1999). Inoltre, sono state determinate le sequenze RdRp dei *mitovirus* di *O. novo-ulmi* (Doherty *et al.*, 2006). Inoltre, è stato dimostrato che altre specie di *Ophiostoma* ospitano micovirus. *Ophiostoma minus* e il saprofita *Ophiostoma quercus* ospitano micovirus appartenenti alle famiglie *Totiviridae* e *Partitiviridae* (Doherty *et al.*, 2007). È stata suggerita una relazione lontana tra *OPV2* e *Ophiostoma partitivirus 1* (*OPV1*) (Doherty *et al.*, 2007).

CONCLUSIONI

Il controllo dei patogeni delle piante attraverso l'uso di micovirus come agenti di biocontrollo è una linea di ricerca molto promettente (Garcia-Pedrajas *et al.*, 2019). A tal fine è molto importante la conoscenza del comportamento dell'ospite e del virus in bosco. Tuttavia, il successo del controllo biologico delle malattie fungine dipende dalla diffusione naturale dei virus e dalla complessa interazione tra micovirus, fungo, pianta e ambiente

Attualmente circa l'80% dei funghi è infettato da micovirus, con conseguenti effetti positivi, negativi o trascurabili nel fungo-ospite. Esistono numerosi agenti patogeni fungini in cui sono disponibili micovirus che hanno un'elevata potenzialità come mezzo di biocontrollo. Tuttavia tale linea di ricerca può essere ulteriormente approfondita, andando a utilizzare le nuove tecniche di sequenziamento massale (Next generation sequencing), che permette di ottenere le sequenze del genoma di micovirus già noti o non ancora descritti. Queste indagini potrebbero essere estese non soltanto ai micovirus che parassitizzano funghi patogeni, ma anche a micovirus presenti in funghi endofiti, in modo da creare un ampio database (Siddique *et al.*, 2020). Una volta individuati i micovirus, la ricerca dovrebbe verificare se tali entità sono legati all'ipovirulenza e se sono in grado di infettare la maggior parte dei ceppi fungini in condizioni naturali.

Per migliorare le possibilità di applicazione dei micovirus in campo bisogna ulteriormente indagare il ruolo dei geni *vic* che sono responsabili della compatibilità vegetativa e permettono la trasmissione di tali agenti virali in modo orizzontale all'interno della popolazione del patogeno, migliorare le conoscenze sull'impatto che infezioni multiple virali possono avere sul fungo patogeno, approfondire la possibilità di utilizzare micovirus che parassitizzano in natura una specie fungina in altre specie fungine, implementare le modalità pratiche di distribuzione su larga scala.

Le attuali conoscenze indicano che i micovirus possono essere applicati anche in un contesto di piante forestali, come anche in impianti destinati alla produzione di legname, dove i patogeni possono esprimere maggiormente la loro virulenza determinando importanti perdite economiche.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. J., 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Annals of Applied Biology*, 118 (2), 479–492.
- Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N., Van Baalen, M., 2009. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *J. Evol. Biol.*, 22, 245-259.
- Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., Rigling, D., 1999. Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV-1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Molecular Ecology*, 8, 843-854.
- Anagnostakis, S. L., 1982. Biological control of chestnut blight. *Science*, 215, 466–471.
- Anagnostakis, S. L., 1987. Chestnut blight – the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79, 23–37.
- Anagnostakis, S. L., 1992. Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight. *Can. J. For. Res.*, 22, 568–571.
- Anagnostakis, S. L., Chen, B., Geletka, L. M., Nuss, D. L., 1998. Hypovirus Transmission to Ascospore Progeny by Field-Released Transgenic Hypovirulent Strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*. 88, 598–604.
- Anderson, R. M. e May R. M., 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85,411-426.
- Augsburger, C. K., Kelly, C. K., 1984. Pathogen mortality of tropical tree seedlings: experimental studies of the effects of dispersal distance, seedling density, and light conditions. *Oecologia*, 61, 211–217.
- Baker, K.F. e Cook, R.J., 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*, W. H. Freeman and Co, San Francisco, California. 433.
- Baldacci, E., Orsenigo, M., 1952. Chestnut blight in Italy. *Phytopathology*, 42(4), 38-39.
- Bever, J., Westover, K., & Antonovics, J., 1997. Incorporating the Soil Community into Plant Population Dynamics: The Utility of the Feedback Approach. *Journal of Ecology*, 85(5), 561-573.
- Biek, R., Henderson, J. C., Waller, L. A., Rupprecht, C. E., Real, L. A., 2007. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104,7993-7998.
- Biraghi, A., 1954. Ulteriori notizie sulla resistenza di *Castallea sativa* Mill. nei confronti di *Endothia parasitica* (Murr.) And. *Boll. Staz. Patol. Veg.*, 9, 149–157.
- Bisiach, M., De Martino, A., Gobbi, E., Intropido, M., Vegetti, G., 1988. Studies on chestnut blight: activity report. *Rivista di Patologia Vegetale (S. IV)*, 24, 3-13.

- Borodynko, N., Hasiyw-Jaroszewska, B., Rymelska, N., and Pospieszny, H., 2010. La France disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* in Poland. *Acta Virol.*, 54, 217–219.
- Botella, L., Tuomivirta, T., Hantula, J., Diez, J., 2012. Presence of Viral dsRNA molecules in the Spanish population of *Gremmeniella abietina*. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4, 211-213.
- Botella, L., Tuomivirta, T. T., Vervuurt, S., Diez, J. J., Hantula, J., 2012. Occurrence of two different species of mitoviruses in the European race of *Gremmeniella abietina* var. *abietina*, both hosted by the genetically unique Spanish population. *Fungal Biol.*, 116, 872–882.
- Botella, L., Vainio, E.J., Hantula, J., Diez, J. J., Jankovsky, L., 2015. Description and prevalence of a putative novel mycovirus within the conifer pathogen *Gremmeniella abietina*. *Arch. Virol.*, 160, 1967–1975.
- Botella, L., Dvořák, M., Capretti, P., Luchi, N., 2017. Effect of temperature on *GaRV6* accumulation and its fungal host, the conifer pathogen *Gremmeniella abietina*. *For. Path.*, 47.
- Botella, L. e Hantula, J., 2018. Description, Distribution, and Relevance of Viruses of the Forest Pathogen *Gremmeniella abietina*. *Viruses*, 10(11), 654.
- Bozarth, R. F., 1972. Mycoviruses: a new dimension in microbiology. *Environmental Health Perspectives*, 2 (1), 23–39.
- Brasier, C. M., 1979. Dual origin of recent Dutch Elm disease outbreaks in Europe. *Nature*, 281, 78-79.
- Brasier, C. M., 1981. Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. *Stipes R. J., Campana, R. J. eds. Compendium of elm diseases. St. Paul, MN, USA: The American Phytopathological Society*, 76-79.
- Brasier, C. M., 1990. China and the origins of Dutch elm disease: an appraisal. *Plant Pathology*, 39, 5-16.
- Brasier, C. M., 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia*, 115, 151–161.
- Brasier, C. M., Mehrotra, M. D., 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp.nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycological Research*, 99(2), 205-215.
- Brasier, C. M., 2000. Intercontinental spread and continuing evolution of the Dutch elm disease pathogens. *The elms: breeding, conservation and disease management (Dunn, C. P., ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, 61-72.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A., 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies: their perithecial size differences and geographical distributions. *Mycological Research*, 105, 547-554.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A., 2010. Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. *Plant Pathology*, 59, 186-199
- Brown, N. A. e Hammond-Kosack, K. E., 2015. Secreted biomolecules in fungal plant pathogenesis. *Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd.*

- Buck, K. W., 1986. Fungal Virology - An overview. *Buck K. (ed.), Fungal Virology (Boca Raton: CRC Press)*, 1-84.
- Buck, K., 1998. Molecular variability of viruses of fungi. *Molecular Variability of Fungal Pathogens (Bridge, P. D., Couteaudier, Y. e Clackson, J. M., eds)*, 53–72.
- Bull, J. J., 1994. Virulence. *Evolution*, 48, 1423-1437.
- Burdon, J. J., 1991. Fungal pathogens as selective forces in plant populations and communities. *Australian Journal of Ecology*, 16, 423-432.
- Campana R. J., 1981. *Compendium of elm diseases*.
- Castello, J. D., Leopold, D. J., Smallidge, P. J., 1995. Pathogens, patterns, and processes in forest ecosystems. *Bioscience*, 45, 16–24.
- Cauchon, R., Lachance, D., 1980. Research on cryptopycnidia for rapid diagnosis of *Gremmeniella abietina*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2, 232-234.
- Chang, S. S., Zhang, Z., e Liu, Y., 2012. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu. Rev. Microbiol.*, 66, 305–323.
- Chen, J. J., Cui, B. K., Zhou, L. W., Korhonen, K., Dai, Y. C., 2015. Phylogeny, divergence time estimation, and biogeography of the genus *Heterobasidion* (Basidiomycota, Russulales). *Fungal Diversity*, 71, 185–200.
- Chen, B. S., Geletka, L. M., Nuss, D. L., 2000. Using chimeric hypoviruses to fine-tune the interaction between a pathogenic fungus and its plant host. *J. Virol.*, 74,7562-7567.
- Chen, B. S. e Nuss, D. L., 1999. Infectious cDNA clone of hypovirus *CHVI-Euro7*: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *J. Virol.*, 73, 985-992.
- Choi, G. H., Nuss, D. L., 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science*, 257, 800-803.
- Choi, G. H., Chen, B. e Nuss, D. L., 1995. Virus-mediated or transgenic suppression of a G-protein alpha subunit and attenuation of fungal virulence. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 92, 305–309.
- Choi, G. H., Dawe, A. L., Churbanov, A., Smith, M. L., Milgroom, M. G., e Nuss, D. L., 2012. Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 190, 113–127.
- Chun, S. J., Lee, Y. H., 2009. Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters*, 148, 159–162.
- Chun, J., Ko, Y.-H., Kim, D.-H., 2020. Transcriptome Analysis of *Cryphonectria parasitica* Infected With *Cryphonectria hypovirus 1 (CHVI)* Reveals Distinct Genes Related to Fungal Metabolites, Virulence, Antiviral RNA-Silencing, and Their Regulation. *Frontiers in Microbiology*.
- Cogoni, C., e Macino, G., 1999. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 657–662.

- Cole, T. E., Müller, B., Hong, Y., Brasier, C. M., Buck, K. W., 1998. Complexity of virus-like double-stranded RNA elements in a diseased isolate of the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. *J. Phytopathol.*, 146, 593–598.
- Cortesi, P., McCulloch, C. E., Song, H., Lin, H., Milgroom, M. G., 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 159, 107-118.
- Cortesi, P. e Milgroom, M. G., 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64,2988-2994.
- Craven, M. G., Pawlyk, D. M., Choi, G. H., Nuss, D. L., 1993. Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *J. Virol.*, 67,6513-6521.
- Crawford, L. J., Osman, T. A. M., Booy, F. P., Coutts, R. H. A., Brasier, C. M., Buck, K. W., 2006. Molecular characterization of a partitivirus from *Ophiostoma himal-ulmi*. *Virus Genes*, 33, 33–39.
- Day, P. R., Dodds, J. A., Elliston, J. E., Jaynes, R. A., Anagnostakis, S. L., 1977. Doublestranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopatology*, 84, 528-534.
- Dawe, A. L. e Nuss, D. L., 2001. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annu. Rev. Genet.*, 35, 1-29.
- De Miccolis et al., 2014. Le opportunità del Next Generation Sequencing nella ricerca sulle malattie fungine. *Protezione delle Colture*, 1, 11-15.
- Doherty, M., Coutt, R. H. A., Brasier, C. M., Buck, K. W., 2006. Sequence of RNA-dependent RNA polymerase genes provides evidence for three more distinct mitoviruses in *Ophiostoma novo-ulmi* isolate Ld. *Virus Genes*, 33(1), 41–44.
- Doherty, M., Sanganee, K., Kozlakidis, Z., Coutts, R. H. A., Brasier, C. M., Buck, K. W., 2007. Molecular characterization of a totivirus and a partitivirus from the genus *Ophiostoma*. *Journal of Phytopathology*, 155, 188–192.
- Donaubauer, E., 1972. Distribution and hosts of *Scleroderris lagerbergii* in Europe and North America. *For. Pathol.*, 2, 6–11.
- Diller, J. D., 1965. Chestnut Blight. *Forest Pest Leaflet*, 94. U.S.
- Ding, P., Liu, F., Xu, C., Wang, K., 2007. Transmission of *Cryphonectria hypovirus* to protect chestnut trees from chestnut blight disease. *Biological Control*, 40, 9–14.
- Domingo, E. e Holland, J., 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 151–178.
- Dunn, C. P., 2000. The elms: breeding, conservation and disease management. *Kluwer Academic Publishers, Boston, USA*, 228.
- Dutech, C., Barres, B., Bridier, J., Robin, C., Milgroom, M. G. e Ravigne, V., 2012. The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. *Mol. Ecol.*, 21, 3931–3946.
- Elgersma, D. M., 1970. Length and diameter of xylem vessels as a factors in resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 76, 179-182.

- Elgersma, D. M., Roosien, T., Scheffer, 1993. Biological control of Dutch elm disease by exploiting resistance in the host. *Proceedings of the 2nd international symposium on Dutch elm disease, East Lansing*, 188-192.
- Et-Touil, A., Rioux, D., Mathieu, F. M., Bernier, L., 2005. External symptoms and histopathological changes following inoculation of elms putatively resistant to Dutch elm disease with genetically close strains of *Ophiostoma*. *Canadian Journal of Botany*, 83, 656-667.
- Ewers, F. W., Fisher, J. B., Chiu, S. T., 1990. A survey of vessel dimensions in stems of tropical lianas and other growth forms. *Oecologia*, 84, 544-552.
- Fahima, T., Kazmierczak, P., Hansen, D. R., Pfeiffer, P., Van Alfen, N. K., 1993. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-stranded RNA of the fungus *Cryphonectria parasitica*. *Virology*, 195, 81-89.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., 2005. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: The Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *San Diego, CA: Elsevier Academic*.
- Frank, S. A., 1996. Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.*, 71,37-78.
- García-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M., 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 157–186.
- Mycoviruses in Biological Control: From Basic Research to Field Implementation
- García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil J. L., Jacquat A. G., Dambolena J. S., 2019. *Phytopathology*, 109, 1828-1839.
- Ghabrial, S., 1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16, 119–131.
- Ghabrial, S. A., Suzuki, N., 2008. Fungal Viruses. *Mahy, B. W. J. e Van Regenmortel, M. H. V. (ed.), Encyclopedia of Virology, 3rd ed., Elsevier, Oxford, United Kingdom*, 2, 284-291.
- Ghabrial, S. A. e Suzuki, N., 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 47, 353–384.
- Ghabrial, S. A., Castyn, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., e Suzuki, N., 2015. 50-Plus years of fungal viruses. *Virology*, 479–480, 356–368.
- Gibbs, J. N., Brasier, C. M., 1973. Correlation between cultural characters and pathogenicity in *Ceratocystis ulmi* from Britain, Europe and North America. *Nature*, 241, 381-383.
- Gibbs, J. N., 1978. Intercontinental epidemiology of Dutch elm disease. *Annual Review of Phytopathology*, 16, 287-307.
- Gobbin, D., Hoegger, P. J., Heiniger, U., Rigling, D., 2003. Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1 (CHV-1)* in Europe. *Virus Res.*, 97, 39-46.
- Göker, M., Scheuner, C., Klenk, H-P., Stielow, J. B., Menzel, W., 2011. Codivergence of Mycoviruses with Their Hosts. *PLoS ONE*, 6(7).
- Graniti, A., 1998. Cypress Canker: A Pandemic in Progress. *Journal Article, Annual Review of Phytopathology*, 91-114.

- Graves, A. H., 1950. Relative blight resistance in species and hybrids of *Castanea*. *Phytopathology*, 40, 1125-1131.
- Greig, B. J. W., 1998. Field recognition and diagnosis of *Heterobasidion annosum*. *Heterobasidion annosum, Biology, Ecology, Impact and Control*, ed. Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A., 35 – 4.
- Grente, J., 1965. Les formes hypovirulentes d'Endothia parasitica et les espoirs de lutte contre le chancre du chataignier. *Comptes rendus des Seances de l'Academie d'Agriculture des France*, 51, 1033-1037.
- Grente, J., Sauret, S., 1969. L'hypovirulence exclusive, phénomène originel en pathologie végétale. *C. R. Hebd. Seance Acad. Sci.*, 268, 2347-2350
- Guries, R. P., 2001. Elms: past, present, and future. *Proceeding of the "National conference on wilt diseases of shade trees" (Ash, C. L. ed), St. Paul (MN, USA), APS Press, USA*, 29-36.
- Hammond, T. M., Andrewski, M. D., Roossinck, M. J., e Keller, N. P., 2008. *Aspergillus* mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. *Eukaryotic Cell*, 7, 350–357.
- Heiniger, U. e Rigling, D., 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathology*. 32, 581–599.
- Heiniger, U. e Rigling, D., 2009. Application of the *Cryphonectria Hypovirus (CHVI)* to control the chestnut blight, experience from Switzerland. *Acta Hortic*, 815, 233–245.
- Herrero, N., Dueñas, E., Quesada-Moraga, E., Zabalgoceazcoa, I., 2012. Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8523–8530.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509–547.
- Hillman, B. I., Fulbright, D. W., Nuss, D. L., Van Alfen, N. K., 1995. Hypoviridae. *Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, 261-264.
- Hillman, B. I., Halpern, B. T., Brown, M. P., 1994. A viral dsRNA Element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology*, 201,241-250.
- Hillman, B.I. e Suzuki, N., 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Adv. Virus Res*, 63,423-472.
- Holdenreider, O. e Greig, B. J. W., 1998. Biological methods of control. *Heterobasidion annosum Biology, Ecology, Impact and Control*, Edited by: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R. and HuËttermann, A. Oxford, UK: CAB International.
- Hollings, M., 1962. Viruses Associated with A Die-Back Disease of Cultivated Mushroom. *Nature*, 196, 962–965.
- Hong, Y., Dover, S. L., Cole, T. E., Brasier, C. M., Buck, K. W., 1999. Multiple mitochondrial viruses in an isolate of the Dutch elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*. *Virology*, 258, 118–127.
- Hubbes, M., 1999. The American elm and Dutch elm disease. *For Chron*, 75, 265–273.

- Ihrmark, K., 2001. Double-stranded RNA elements in the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae* 210. Ph. D. thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Ihrmark, K., Johannesson, H., Stenström, E., Stenlid, J., 2002. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology*, 36, 147–154.
- Ihrmark, K., Stenström, E., Stenlid, J., 2004. Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*, 108, 149–153.
- Jezic, M., Krstin, L., Rigling, D., Curkovic-Perica, M., 2012. High diversity in populations of the introduced plant pathogen, *Cryphonectria parasitica*, due to encounters between genetically divergent genotypes. *Mol. Ecol.*, 21, 87-99.
- Jordán, E., Muñoz-Adalia, M., Fernández, M., Diez J. J., 2016. The use of mycoviruses in the control of forest diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 26, 577-604.
- Kang, J., Wu, J., Bruenn, J. A., Park, C., 2001. The H1 double-stranded RNA genome of *Ustilago maydis virus-H1* encodes a polyprotein that contains structural motifs for capsid polypeptide, papain-like protease, and RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Res*, 76, 183–189.
- Karlman, M., Hansson, P., Witzell, J., 1994. Scleroderris canker on lodgepole pine introduced in northern Sweden. *Canadian Journal of Forest Research*, 24(9), 1948-1959.
- Kashif, M., Hyder, R., De Vega Perez, D., Hantula, J., Vainio, E. J., 2015. Heterobasidion wood decay fungi host diverse and globally distributed viruses related to *Helicobasidium mompa partitivirus V70*. *Virus Res*, 195, 119 –123.
- Kashif, M., Jurvansuu, J., Vainio, E. J., Hantula, J., 2019. Alphapartitiviruses of *Heterobasidion* Wood Decay Fungi Affect Each Other's Transmission and Host Growth. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 9.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J., 2011. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press, USA*, 901-952.
- Krstin, L., Novak-Agaba, S., Rigling, D., Curkovic-Perica, M., 2011. Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology*, 60,752-761.
- Krstin, L., Novak-Agaba, S., Rigling, D., Krajacic, M., Curkovic-Perica, M., 2008. Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology*, 57,1086-1096.
- Kyrychenko, A. N., Tsyganenko, K. S., Olishevskaya, S. V., 2018. Hypovirulence of Mycoviruses as a Tool for Biotechnological Control of Phytopathogenic Fungi. *Cytol. Genet.*, 52, 374–384.
- Laflamme, G., 1999. Successful control of *Gremmeniella abietina*, European race, in a red pine plantation. *Phytoprotection*, 80(2), 55-64.
- Laine, A. L., 2008. Temperature-mediated patterns of local adaptation in a natural plant–pathogen metapopulation. *Ecol. Lett.*, 11,327-337.

- Lee, K.-M., Yu, J., Son, M., Lee, Y.-W., e Kim, K.-H., 2011. Transmission of *Fusarium boothii* mycovirus via protoplast fusion causes hypovirulence in other phytopathogenic fungi. *PLoS One*, 6.
- Leslie, J. F., 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 127–150.
- Linder-Basso, D., Dynek, J. N., Hillman, B. I., 2005. Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common hypovirus species in North America. *Virology*, 337, 192-203.
- Lim, W.-S., Jeong, J. H., Jeong, R.-D., Yoo, Y. B., Yie, S. W., e Kim, K.-H., 2005. Complete nucleotide sequence and genome organization of a dsRNA partitivirus infecting *Pleurotus ostreatus*. *Virus Research*, 108, 111–119.
- Liu, Y. C., Linder-Basso, D., Hillman, B. I., Kaneko, S., Milgroom, M. G., 2003. Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus *Cryphonectria*. *Molecular Ecology*, 12 (6), 1619–1628.
- Liu, Y. C. e Milgroom, M. G., 1996. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 86, 79-86.
- McDonald, W. L. e Fullbright, D. W., 1991. Biological control of chestnut blight: use and limitation of transmissible hypovirulence. *Plant Disease*, 75, 656-661.
- MacHardy, W. E., Beckman, C. H., 1973. Water relations in American elm infected with *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 63, 98-103.
- Magasi, L. P., Manley, J. M., 1974. Survival of *Gremmeniella abietina* (*Scleroderris lagerbergii*) in marketed Christmas trees. *Plant Disease Reporter*, 58, 892-893.
- Magae, Y., 2012. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*. *Virology Journal*, 9, 60.
- Manion, P. D., 1981. *Tree Disease Concepts*.
- Marosy, M., Patton, R. F., Upper C. D., 1989. A conducive day concept to explain the effect of low temperature on the development of *Scleroderris* shoot blight. *Phytopathology*, 79(11), 1293-1301.
- 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(5811), 513-515.
- Martín, J. A., Solla, A., Esteban, L. G., De Palacios, P., Gil, L., 2009. Bordered pit and ray morphology involvement in elm resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*. *Canadian Journal of Forest Research*, 39, 420-429.
- Matta, A., 1996. Fondamenti di Patologia vegetale. *Patron Editore, Bologna, IT*, 1-496.
- McCabe, P. M., Pfeiffer, P., Van Alfen, N. K., 1999. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiol.*, 7, 377–381.
- McNabb, H. S., Heybroek, H. M., McDonald, W. L., 1970. Anatomical factors in resistance to Dutch elm disease. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 76, 196-204.
- Meng, H., Wang, Z., Wang, Y., Zhu, H., Huang, B., 2017. Dicer and Argonaute genes involved in RNA interference in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83.

- Milgroom, M. G., 1995. Population biology of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Can. J. Bot.*, 73 (Suppl. 1), S311-S319.
- Milgroom, M. G., Wang, K., Zhou, Y., Kaneko, S., 1996. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia*, 88,179-190.
- Milgroom, M. G. e Cortesi, P., 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42,311-338.
- Mills, K. E. e Bever, J. D., 1998. Maintenance of Diversity within Plant Communities: Soil Pathogens as agents of Negative Feedback. *Ecology*, 79, 1595-1601.
- Mitchell, S. E., Rogers, E. S., Little, T. J., Read, A. F., 2005. Host-parasite and genotype-by-environment interactions: temperature modifies potential for selection by a sterilizing pathogen. *Evolution*, 59, 70-80.
- Mittempergher, L., 1989. Il declino dell'olmo: da latifolia nobile a cespuglio (The elm decline: from tree to shrub). *Annali Accademia Italiana Scienze Forestali*, 38, 585-609.
- Moleleki, N., Van Heerden, S.W., Wingfield, M.J., Wingfield, D., Preisig, O., 2003. Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe RNA Virus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3952–3956.
- Montenegro, D., Aguín, O., Sainz, M., Hermida, M., Mansilla, J., 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *For. Ecol. Manag.*, 256, 973-980.
- Morsy, M. R., Oswald, J., He, J., Tang, Y., Roossinck, M. J., 2010. Teasing apart a three-way symbiosis: transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. *Biochem Biophys Res Commun.*, 401(2), 225-30.
- Murolo, S., De Miccolis Angelini, R., Faretra, F., Romanazzi, G., 2018. Phenotypic and molecular investigations on hypovirulent *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Plant Dis*, 102, 540– 545.
- Myers, D. F., Strobel, G. A., 1983. *Pseudomonas syringae* as a microbial antagonist of *Ceratocystis ulmi* in the apoplast of American elm. *Transactions of the British Mycological Society*, 80, 389-394.
- Nadin-Davis, S. A., Feng, Y., Mousse, D., Wandeler, A.I., Aris-Brosou, S., 2010. Spatial and temporal dynamics of rabies virus variants in big brown bat populations across Canada: footprints of an emerging zoonosis. *Mol. Ecol.*, 19, 2120-2136.
- Nerva, L., Ciuffo, M., Vallino, M., Margaria, P., Varese, G.C., Gnani, G., Turina, M., 2016. Multiple approaches for the detection and characterization of viral and plasmid symbionts from a collection of marine fungi. *Virus Res.*, 219, 22–38.
- Newbanks, D., Bosh, A., Zimmermann, M. H., 1983. Evidence for xylem dysfunction by embolization in Dutch elm disease. *Phytopatology*, 73, 1060-1063.
- Nibert, M. L., Ghabrial, S. A., Maiss, E., Lesker, T., Vainio, E. J., Jiang, D., Suzuki, N., 2014. Taxonomic reorganization of family Partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. *Virus Res.*, 188, 128–141.
- Nuss, D. L., 1992. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 56, 561–576.

- Nuss, D.L., 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 632–642.
- Nuss, D. L., 2011. Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination. *Advances in virus research, Elsevier*, 25-48.
- Nuss, D. L. e Hillman, B. I., 2011. Family Hypoviridae. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses Academic Press, London (King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J., eds.)*, 1029-1033.
- Old, K. M., Kobayashi, T., 1988. Eucalyptus are susceptible to the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Australian Journal of Botany*, 36, 599-603.
- Papazova-Anakieva I., Sotirovski K., Cortesi P., Milgroom M. G., 2008. Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. *Eur. J. Plant Pathol.*, 120,35-42.
- Ouellette, G. B., Rioux, D., Simard, M., Cherif, M., 2004a. Ultrastructural and cytochemical studies of host and pathogens in some fungal wilt diseases: retro- and introspection towards a better understanding. *Investigación agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 13, 119-145.
- Ouellette, G. B., Rioux, D., Simard, M., Chamberland, H., Cherif, M., Baayen, R. P., 2004b. Ultrastructure of the alveolar network and its relation to coating on vessel walls in elms infected by *Ophiostoma novo-ulmi* and in other plants affected with similar wilt diseases. *Investigación agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 13, 147-160.
- Packer, A. e Clay, K., 2000. Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature*, 404, 278-81.
- Parsley, T. B., Chen, B. S., Geletka, L. N., Nuss, D. L., 2002. Differential modulation of cellular signaling pathways by mild and severe hypovirus strains. *Eukaryot. Cell*, 1,401-413.
- 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), 115–28.
- Peever, T. L., Liu, Y. C., Milgroom, M. G., 1997. Diversity of hypoviruses, other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology*, 87, 1026-1033.
- Peever, T. L., Liu, Y. C., Cortesi, P., Milgroom, M. G., 2000. Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66,4863-4869.
- Pegler, D. N., Waterston, J. M., 1968. *Heterobasidion annosum*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 192.
- Petäistö, R. L., Kurkela, T., Heinonen, J., 2000. Climatic factors and phases of *Gremmeniella abietina* conidial dispersal. *Metsanduslikud Uurimused*, 34, 57-60.
- Pinchot, C., Knight, K., Haugen, L., Flower, C., Slavicek, J., 2017. *Proceedings of the American Elm Restoration Workshop 2016*.
- Pratt, J. E., 1998. Economic appraisal of the benefits of control treatments. *Heterobasidion annosum Biology, Ecology, Impact and Control, Edited by: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., HuËtterman, A.*

- Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U., Rigling, D., 2006. Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology*, 96, 1337–1344.
- Read, D. J., 1967. Brunchorstia dieback of Corsican pine. *Forest Record London*, 61.
- Real, L. A., Henderson, J.C., Biek, R., Snaman, J., Jack, T. L., Childs, J. E., Stahl, E., Waller, L., Tinline, R., Nadin-Davis, S., 2005. Unifying the spatial population dynamics and molecular evolution of epidemic rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 12107-12111.
- Rigling, D., Hillman, B. I., 2012. Hypovirus (Hypoviridae). *The Springer Index of Viruses*. Springer Verlag, Berlin (Tidona, C. e Darai, G., eds.), 737-742
- Rigling, D. e Prospero, S., 2017. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. *Molecular plant pathology*.
- Rigling, D., Borst, N., Cornejo, C., Supatashvili, A., Prospero, S., 2018. Genetic and Phenotypic Characterization of *Cryphonectria hypovirus 1* from Eurasian Georgia. *Viruses*.
- Rioux, D., Nicole, M., Simard, M., Ouellette, G. B., 1998. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees. *Phytopathology*, 88, 494-505.
- Ro, H. S., Kang, E. J., Yu, J. S., Lee, T. S., Lee, C. W., Lee, H. S., 2007. Isolation and characterization of a novel mycovirus, *PeSV*, in *Pleurotus eryngii* and the development of a diagnostic system for it. *Biotechnology Letters*, 29, 129–135
- Roane, M. K., Griffin, G. J., Elkins, J. R., 1986. Chestnut blight, other *Endothia* diseases, and the genus *Endothia*. *APS Monograph Series 53*. St. Paul, MN: APS Press.
- Robin, C., Lanz, S., Soutrenon, A., Rigling, D., 2010. Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. *Biol. Control.*, 53,55-61.
- Rohring, E., 1996. Elms in Europe: ecology and Dutch elm disease. *Forstarchiv*, 67, 179-198.
- Romeralo T. C, Botella, L., Santamaría, O., Diez, J., 2012. Effect of putative mitoviruses on in vitro growth of *Gremmeniella abietina* isolates under different laboratory conditions. *Forest Systems*, 3, 515-525.
- Romeralo, T. C., Witzell, J., Romeralo, T. R., Botella, L., Diez, J., 2015. Antagonistic activity of fungal endophyte filtrates against *Gremmeniella abietina* infections on Aleppo pine seedlings. *European Journal of Plant Pathology*. 143.
- Robin, C., Heiniger, U., 2001. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*, 76, 361–367.
- Romaine, C. P. e Schlaghauser, B., 1995. PCR Analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2322–23225.
- Santamaria, O., Alves-Santos, F. M., Diez, J. J., 2005. Genetic characterization of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* isolates from Spain. *Plant Pathol.*, 54, 331–338.

- Santini, A., Montagni, A., Vendramin, G. G., Capretti, P., 2005. Analysis of the Italian Dutch elm disease population. *Journal of Phytopathology*, 153, 73-79.
- Sasaki, A., Kanematsu, S., Onoue, M., Oyama, Y., Yoshida, K., 2006. Infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of Partitiviridae (*RnPV1-W8*). *Archives of Virology*, 151 (4), 697–707.
- Scala, A., Pattuelli, M., Coppola, L., Guastini, M., Tegli, S., Sorbo, G., Mittempergher, L., Scala, F., 1997. Dutch elm disease progression and quantitative determination of cerato-ulmin in leaves, stems and branches of elms inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50(5), 349-360.
- Scheffer, R. J., Liem, J. I., Elgersma, D. M., 1987. Production in vitro of phytotoxic compounds by non-aggressive and aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*, the Dutch elm disease pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30(3), 321-335.
- Schmitt, M. J., Breinig, F., 2006. Yeast viral killer toxins: Lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 212–221.
- Schmitt, M. J. e Breinig, F., 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 257–276.
- Schneider, W. e Roossinck, M., 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J. Virol.*, 75, 6566–6571.
- Segers, G. C., Van Wezel, R., Zhang, X., Hong, Y., Nuss, D. L., 2006. Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryotic Cell.*, 5(6), 896-904.
- Segers, G. C., Zhang, X., Deng, F., Sun, Q., Nuss D. L., 2007. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12902–12906.
- Shabalina, S. A. e Koonin, E. V., 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.*, 23, 578–587.
- Siddique, A. B., 2020. Viruses of endophytic and pathogenic forest fungi. *Virus Genes*, 56, 407–416.
- Sinclair, W. A., 1964. Root- and butt-rot of conifers caused by *Fomes annosus*, with special reference to inoculum dispersal and control of the disease in New York. *Cornell University Agricultural Experiment Station, Memoir*, 391, 54.
- Sinclair, W. A., Zahand, J. P., Melching, J. B., 1975. Anatomical markers for resistance of *Ulmus americana* to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 65, 349-352.
- Sinclair, W. A., Campana, R. J., 1978. Dutch elm disease: Perspectives after 60 years. *Cornell University Agricultural Experiment Station, Search (Agriculture)*, 8, 1-52.
- Sinden, J. W. e Hauser, E., 1950. Report on two new mushroom diseases. *Mushroom Sci.*, 1, 96–100.
- Skilling, D. D., O'Brien, J. T., 1979. Scleroderis canker of Northern conifers. *USDA Forest and Insect Leaflet*, 130.

- Smalley, E. B., Kais, A. G., 1966. Seasonal variation in the resistance of various elm species to Dutch elm disease. *Breeding Pest-Resistant Trees* (Gerhold, H. D., Schreiner, E. J., Mc Dermott, R. E., Winieski, J. A., eds), Pergamon Press, Elmsford, NY, USA, 279-292.
- Smalley, E. B., Guries, R. P., 2000. Asian elms: sources of disease and insect resistance. *Dunn, C. P., ed. The elms - Breeding, Conservation and Disease management*. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 215-230.
- Solla, A., Gil, L., 2002a. Influence of water stress on Dutch elm disease symptoms in *Ulmus minor* Miller. *Canadian Journal of Botany*, 80, 810-817.
- Solla, A., Gil, L., 2002b. Xylem vessel diameter as a factor in resistance of *Ulmus minor* to *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Pathology*, 32, 123-134.
- Solla, A., Martin, J. A., Ouellette, G., Gil, L., 2005. Influence of plant age on symptom development in *Ulmus minor* following inoculation by *Ophiostoma novo-ulmi*. *Plant Disease*, 89, 1035-1040.
- Sotirovski, K., Milgroom, M. G., Rigling, D., Heiniger, U., 2006. Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chestnut blight fungus in Macedonia. *For. Pathol.*, 36, 136-143.
- Spierenburg, T., 1921. Een onbekende ziekte in de iepen (An unknown disease in elm). *Tijdschrift over Plantenziekten*, 27, 53-61.
- Stenlid, J., Redfern, D. B., 1998. Spread within the tree and stand. *Heterobasidion annosum*, *Biology, Ecology, Impact and Control*, ed. Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A., 125–1241.
- Stielow, B., Klenk, H. P., Winter, S., Menzel, W., 2011. A novel *Tuber aestivum* (Vittad.) mitovirus. *Archives of Virology*, 156, 1107–1110.
- Stipes, R. J., Campana, R., 1981. Compendium of elm diseases. *American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA*, 66.
- Strauss, E. E., Lakshman, D. K., Tavantzis, S. M., 2000. Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Virology*, 81, 549–555.
- Sun Q., Choi, G. H., Nuss, D. L., 2009. Hypovirus-Responsive Transcription Factor Gene pro1 of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica* Is Required for Female Fertility, Asexual Spore Development, and Stable Maintenance of Hypovirus Infection. *Eukaryotic Cell*, 8(3), 262-270.
- Sutherland, M. L., Brasier, C. M., 1995. Effect of d-factors on in vitro cerato-ulmi production by the Dutch Elm Disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi*. *Mycol. Res.*, 99, 1211–1217.
- Sutherland, M. L., Brasier, C. M., 1997. A comparison of thirteen d-factors as potential biological control agents of *Ophiostoma novo-ulmi*. *Plant Pathology*, 46, 680-693.
- 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*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71, 161–168.
- Suzuki, N., Maruyama, K., Moriyama, M., Nuss, D. L., 2003. Hypovirus papain-like protease p29 functions in trans to enhance viral double-stranded RNA accumulation and vertical transmission. *J. Virol.*, 77, 11697.

- Suzuki, N., Nuss, D. L., 2002. Contribution of protein p40 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. *J. Virol.*, 76, 7747.
- Torres-Pérez, F., Palma, R. E., Hjelle, B., Holmes, E. C., Cook, J. A., 2011. Spatial but not temporal codivergence of a virus and its mammalian host. *Mol. Ecol.*, 20, 4109–4122.
- Tuomivirta, T. T., Uotila, A., Hantula, J., 2002. Two independent double-stranded RNA patterns occur in the Finnish *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. *For. Pathol.*, 32, 197–205.
- Tuomivirta, T. T., Hantula, J., 2003. *Gremmeniella abietina* mitochondrial RNA virus S1 is phylogenetically related to the members of the genus *Mitovirus*. *Arch. Virol.*, 148, 2429–2436.
- Tuomivirta, T. T., Hantula, J., 2003. Two unrelated double-stranded RNA molecule patterns in *Gremmeniella abietina* type A code for putative viruses of the families Totiviridae and Partitiviridae. *Arch. Virol.*, 148, 2293–2305.
- Tuomivirta, T. T., Hantula, J., 2005. Three unrelated viruses occur in a single isolate of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. *Virus Res.*, 110, 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. *J. Gen. Virol.*, 90, 2299–2305.
- Turchetti, T., Maresi, G., 1990. Indagini sulla diffusione naturale degli isolati ipovirulenti di *Cryphonectria parasitica* in alcuni cedui di castagno. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 89–98.
- Turchetti, T. e Maresi, G., 2008. Biological control and management of chestnut diseases. *Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria*. (Ciancio, A. e Mukerji, K. G., eds.). *Dordrecht, Netherlands: Springer*, 85–118.
- Tyree, M. T., Zimmermann, M. H., 2002. Xylem structure and the ascent of sap. *Springer Verlag, NY, USA*, 285.
- Vainio, E. J., Korhonen, K., Tuomivirta, T. T., Hantula, J., 2010. A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. *Fungal Biol.*, 114, 955–965.
- Vainio, E. J., Keriö, S., Hantula, J., 2011. Description of a new putative virus infecting the conifer pathogenic fungus *Heterobasidion parviporum* with resemblance to *Heterobasidion annosum* Ptype partitivirus. *Archives of Virology*, 156, 79–86.
- Vainio, E. J., Hyder, R., Aday, G., Hansen, E., Piri, T., Dogmus-Lehtijärvi, T., Lehtijärvi, A., Korhonen, K., Hantula, J., 2012. Population structure of a novel putative mycovirus infecting the conifer root-rot fungus *Heterobasidion annosum* sensu lato. *Virology*, 422, 366–376
- Vainio, E. J., Müller, M. M., Korhonen, K., Piri, T., & Hantula, J., 2014. Viruses accumulate in aging infection centers of a fungal forest pathogen. *The ISME Journal*, 9, 497–507.
- Vainio, E. J., Jurvansuu, J., Streng, J., Rajamäki, M. L., Hantula, J., Valkonen, J. P. T., 2015. Diagnosis and discovery of fungal viruses using deep sequencing of small RNAs. *J Gen Virol*, 96, 714–725.

- Vainio, E. J., Jurvansuu, J., Hyder, R., Kashif, M., Piri, T., Tuomivirta, T., Poimala, A., Xu, P., Mäkelä, S., Nitisa, D., Hantula, J., 2018. *Heterobasidion partitivirus 13* mediates severe growth debilitation and major alterations in the gene expression of a fungal forest pathogen. *Journal of Virology*.
- Vale, P. F. e Little, T. J., 2009. Measuring parasite fitness under genetic and thermal variation. *Heredity*, 103,102-109.
- Vale, P. F., Stjernman, M., Little, T. J., 2008. Temperature-dependent costs of parasitism and maintenance of polymorphism under genotype-by-environment interactions. *J. Evol. Biol.*, 21, 1418-1427.
- Van de Sande, W. W. J., Lo-Ten-Foe, J. R., Van Belkum, A., Netea, M. G., Kullberg, B. J., Vonk, A. G., 2010. Mycoviruses: future therapeutic agents of invasive fungal infections in humans?. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 29, 755–763.
- Van Diepeningen, A. D., Debets, A. J., Slakhorst, S. M., Fekete, C., Hornok, L., Hoekstra, R. F., 2000. Interspecies virus transfer via protoplast fusions between *Fusarium poae* and black *Aspergillus* strains. *Fungal Genetics Newsletter*, 47, 99–100.
- Van Regenmortel, M., 2007. Virus species and virus identification: past and current controversies. *Infect. Genet. Evol.*, 7, 133–144.
- Van Regenmortel, M. H. V., Burke, D. S., Calisher, C. H., Dietzgen, R. G., Fauquet, C. M., Ghabrial, S. A., Weaver, S. C., 2010. A proposal to change existing virus species names to non-Latinized binomials. *Archives of Virology*, 155, 1909–1919.
- Varga, J., Tóth, B., Vágvölgyi, C., 2003. Recent advances in mycovirus research. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 50(1), 77–94.
- Varley, D. A., Podila, G. K., Hiremath, S. T., 1992. Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus: suppression of cutinase gene expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. *Mol. Cell Biol.*, 12, 4539–4544.
- Vasiliauskas, R., Stenlid, J., 1998. Spread of S and P group isolates of *Heterobasidion annosum* within and among *Picea abies* trees in central Lithuania. *Canadian Journal of Forest Research*, 28(7), 961-966.
- Voth, P.D., Mairura, L., Lockhart, B.E., May, G., 2006. Phylogeography of *Ustilago maydis virus HI* in the USA and Mexico. *J. Gen. Virol.*, 87, 3433–3441.
- Walther, B. A. e Ewald, P. W., 2004. Pathogen survival in the external environment and the evolution of virulence. *Biol. Rev.*, 79,849-869.
- Ware, G., 1995. Little-known elms from China: landscape tree possibilities. *Journal of Arboriculture*, 21, 284-288.
- Webber, J. F., Gibbs, J. N., 1989. Insect dissemination of fungal pathogens of trees. Insect-fungus interactions. *14th Symposium of the Royal Entomological Society of London in collaboration with the British Mycological Society London, UK; Academic Press*, 161-193.

- Webber, J. F., 1990. Relative effectiveness of *Scolytus scolytus*, *S. multistriatus* and *S. kirschi* as vectors of Dutch elm disease. *European Journal of Forest Pathology*, 20,184-192.
- Witzell, J., 2001. Formation and growth of stem cankers caused by *Gremmeniella abietina* on young *Pinus contorta*. *Forest Pathology*, 31(2), 115-127.
- Wiebols, G. L. W. e Wieringa, K. T., 1936. Bacteriophageen algemeen voorkomend verschijnsel. *Fonds Landbouw Export Bureau*, 16, 1916–1918.
- Wu, W. D., Jeng, R. S., Hubbes, M., 1989. Toxic effects of elm phytoalexin mansonones on *Ophiostoma ulmi*, the causal agent of Dutch elm disease. *European Journal of Forest Pathology*, 19, 343–57.
- Xie, J. e Jiang, D., 2014. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol*, 52, 45–68.
- Yaegashi, H., Yoshikawa, N., Ito, T., Kanematsu, S., 2013. A mycoreovirus suppresses RNA silencing in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology*, 444, 409–416.
- Ylimartimo, A., Laflamme, G., Simard, M., Rioux, D., 1997. Ultrastructure and cytochemistry of early stages of colonization by *Gremmeniella abietina* in *Pinus resinosa* seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 75(7), 1119-1132.
- 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), 8387–92.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S. A., 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, 1452–1457.
- Zhnag, D.X., Spiering, M.J., Nuss, D.L., 2014.Characterizing the roles of *Cryphonectria parasitica* RNAdependent RNA polymerase-like genes in antiviral defense, viral recombination and transposon transcript accumulation. *PLoS One*, 9.
- Zimmermann, M. H., McDonough, J., 1978. Dysfunction in the flow of food. *Plant disease - an advanced treatise*, "How plants suffer from disease" (Horsfall, J. G., Cowling E. D. eds), Academic Press, New York, USA, 3, 117-140.