



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



***Colletotrichum siamense* COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE
BIOLÓGICO DA ANTRACNOSE EM GUARANAZEIRO**

LUANA LOPES CASAS

Manaus – AM

2021

LUANA LOPES CASAS

***Colletotrichum siamense* COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE
BIOLÓGICO DA ANTRACNOSE EM GUARANAZEIRO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Co-orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Manaus – AM

JULHO/2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C335c Casas, Luana Lopes
Colletotrichum siamense como estratégia de controle biológico da antracnose em guaranazeiro / Luana Lopes Casas . 2021
104 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Lúcio de Azevedo
Coorientador: José Odair Pereira
Coorientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Agricultura. 2. Fitopatologia. 3. Amazônia. 4. Guaraná. I. Azevedo, João Lúcio de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

LUANA LOPES CASAS

**COLLETOTRICHUM SIAMENSE COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE
BIOLÓGICO DA ANTRACNOSE EM GUARANAZEIRO.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Co-orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

Banca Examinadora:



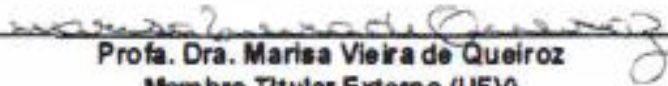
**Prof. Dr. José Odair Pereira
Presidente (UFAM)**



**Prof. Dr. Spartaco Astoffi Filho
Membro Titular Interno (UFAM)**



**Prof. Dr. Adolfo José da Mota
Membro Titular Interno (UFAM)**



**Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz
Membro Titular Externo (UFV)**



**Prof. Dr. Rogério Elji Hanada
Membro Titular Externo (INPA)**

**Prof. Dr. José Ferreira da Silva
Suplente interno (UFAM)**

**Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo
Suplente Externo (USP)**

**MANAUS-AMAZONAS
Julho/2021**

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ser o autor e consumidor da minha fé e quem dia após dia me tem sustentado com seu infinito amor. Ele certamente tomou-me pela mão e guiou meus passos para a conclusão deste trabalho.

À minha família, especialmente ao meu marido Samaroni que além de incentivador, esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Ele com certeza é merecedor junto comigo dessa vitória.

Ao Dr. João Lúcio Azevedo, meu orientador querido que mesmo distante providenciou tudo que estava a seu alcance para que o trabalho fosse desenvolvido.

Aos meus co-orientadores Dr. José Odair Pereira e Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto. Eles me acompanhavam diariamente e sempre recorria a eles quando não sabia mais o que fazer. Posso dizer com certeza que os levarei para sempre em meu coração. Obrigada pelos ensinamentos e o tempo a mim dedicado.

Aos colegas do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana (LPBOM): Lucas, Leandro, Kelven, Aryana e Brenda. Dedico um agradecimento especial ao Lucas que foi meu braço direito na realização desta pesquisa e sem ele com certeza teria sido tudo mais difícil.

Aos colegas da turma de 2017 do PPG-Bionorte em especial a Nadionara nossa querida representante discente que sempre nos auxiliou com as demandas da pós-graduação.

Às queridas amigas de caminhada que o PPG-Bionorte me deu: Sarah Raquel e Michele Sanches. A Sarinha, como carinhosamente me refiro a ela, me auxiliou com muita paciência e atenção nos ensaios enzimáticos. A Mimi, (Michele para os não tão próximos) compartilhou comigo toda as tensões, alegrias e tristezas desse doutorado. Além de colegas de turma somos parceiras na docência e agradeço cada palavra de conforto dita a mim ao longo desses 4 anos.

Ao Dr. José Ferreira da Silva por compartilhar seus conhecimentos e disponibilizar a casa de vegeação e seu laboratório para a realização de alguns experimentos. Meus sinceros agradecimentos.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de realizar o doutorado e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pelo espaço físico de trabalho e pelo apoio intelectual obtido por meio da orientação do Dr. José Odair e Dr. Pedro.

À Embrapa Amazônia Ocidental pelo apoio técnico e consultoria.

À Empresa Agropecuária Jayoro pela doação das mudas usadas em parte desta pesquisa.

À FAPEAM e CAPES pelo financiamento dado para realização desta pesquisa. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta pesquisa.

EPÍGRAFE

Bem sei que tudo podes, e nenhum dos teus planos pode ser frustrado.

Jó 42:2

CASAS, Luana Lopes. *Colletotrichum siamense* como estratégia de controle biológico da antracnose em guaranazeiro. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

RESUMO

O Brasil destaca-se no mercado mundial por ser o único exportador de guaraná em escala comercial. A cultura do guaraná é de grande importância para a economia do Amazonas, tanto do ponto de vista econômico como social. Apesar da região amazônica ser o centro de origem da planta, nos últimos anos a produção de guaraná entrou em declínio. Dentre os fatores que têm levado a esta realidade destaca-se a doença denominada antracnose causada por *Colletotrichum* spp. A utilização de microrganismos endofíticos tem sido considerada uma alternativa viável devido a capacidade destes em proteger a planta contra o ataque de fitopatógenos. Além disso, estudos com fungos infectados com micovírus têm despertado a atenção para o uso potencial como agente de controle biológico. Desta forma, este trabalho objetivou utilizar o fungo *Colletotrichum siamense*, isolado como endofítico de folhas de guaranazeiro e infectado com micovírus, como agente de controle biológico da antracnose em guaranazeiro. Foram avaliadas também a influência do fungo sobre características fisiológicas e morfológicas das mudas. Para avaliar o potencial de inibição *in vivo* foram usadas estacas da cultivar BRS-Cereçaporanga e mudas da cultivar Maués. O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira, o fungo foi inoculado via enraizamento de estacas da cultivar BRS-Cereçaporanga. Após o período para o estabelecimento de *C. siamense* foi borrifada sobre as mudas uma suspensão de conídios do fitopatógeno *C. fructicola*. As mudas foram avaliadas quanto ao percentual de lesões características da doença durante 28 dias. As análises morfológicas foram feitas utilizando como parâmetros massa fresca e seca, altura e comprimento da parte aérea e do sistema radicular. Folíolos de todos os tratamentos foram analisados quanto a presença de macro e micronutrientes. Na segunda etapa, o endófito foi borrifado diretamente nas partes aéreas de mudas da cultivar BRS-Maués. Após o período de estabelecimento do fungo, o fitopatógeno foi borrifado e as mudas foram observadas por 28 dias. Folíolos de todos os tratamentos foram coletados nos tempos 0h, 48h, 72h e 96h para dosar proteínas totais, peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e quitinase (CHI). Os resultados da primeira etapa demonstraram que a inoculação de *C. siamense* em mudas de guaranazeiro auxiliou na redução do percentual de lesões. Além disso, a presença do fungo auxiliou no crescimento vegetativo da planta refletindo no aumento da parte aérea. Foram verificadas diferenças significativas quanto aos teores de macro e micronutrientes nos tecidos foliares. Os resultados da segunda etapa também evidenciaram um potencial de inibição de lesões quando *C. siamense* foi inoculado na fase de muda. A presença do endófito promoveu a síntese de proteínas totais e enzimas em diferentes momentos após a inoculação do fitopatógeno. Em 48 e 72 horas, as mudas com o endófito apresentaram maior produção de POX. Após 72 horas, houve queda na produção desta enzima em todos os tratamentos. A atividade da PAL aumentou após 48 e 72 h. Não foi observada tendência na produção de CHI quando comparada a outras enzimas. Estudos adicionais são necessários para otimizar as condições experimentais e validar o potencial de *C. siamense* para o biocontrole em mudas de guaraná.

Palavras-chave: Agricultura; Fitopatologia; Amazônia; Guaraná

CASAS, Luana Lopes. *Colletotrichum siamense* as a biological control strategy for anthracnose in guaraná plants. 104 p. Thesis (PhD in Biotechnology) – Amazonas State University, Manaus, 2021.

ABSTRACT

Brazil stands out in the world market for being the only exporter of guaraná on a commercial scale. The culture of guarana is of great importance for the economy of Amazonas, both from an economic and social point of view. Despite the Amazon region being the center of origin of the plant, in recent years the production of guaraná has declined. Among the factors that have led to this reality, the disease called anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. The use of endophytic microorganisms has been considered a viable alternative due to their ability to protect the plant against the attack of phytopathogens. Furthermore, studies with fungi infected with mycoviruses have drawn attention to its potential use as a biological control agent. Thus, this work aimed to use the fungus *Colletotrichum siamense*, isolated as an endophytic from guaraná leaves and infected with mycovirus, as a biological control agent for anthracnose in guaraná. The influence of the fungus on physiological and morphological characteristics of the seedlings was also evaluated. To evaluate the *in vivo* inhibition potential, cuttings of the cultivar BRS-Ceriçaporanga and seedlings of the cultivar Maués were used. The experiment was conducted in two stages. In the first one, the fungus was inoculated by rooting cuttings of the BRS-Ceriçaporanga cultivar. After the period for the establishment of *C. siamense*, a suspension of conidia of the phytopathogen *C. fructicola* was sprayed on the seedlings. The seedlings were evaluated for the percentage of characteristic lesions of the disease during 28 days. Morphological analyzes were performed using fresh and dry mass, height and length of the aerial part and root system as parameters. Leaflets from all treatments were analyzed for the presence of macro and micronutrients. In the second stage, the endophyte was sprayed directly on the aerial parts of seedlings of cultivar BRS-Maués. After the period of establishment of the fungus, the phytopathogen was sprayed and the seedlings were observed for 28 days. Leaflets from all treatments were collected at times 0h, 48h, 72h and 96h to measure total proteins, peroxidase (POX), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chitinase (CHI). The results of the first stage showed that the inoculation of *C. siamense* in guaraná seedlings helped in reducing the percentage of lesions. In addition, the presence of the fungus helped in the vegetative growth of the plant, reflecting the increase in the aerial part. Significant differences were found in the levels of macro and micronutrients in leaf tissues. The results of the second stage also showed a potential for inhibition of lesions when *C. siamense* was inoculated in the seedling stage. The presence of the endophyte promoted the synthesis of total proteins and enzymes at different times after inoculation of the phytopathogen. At 48 and 72 hours, the seedlings with the endophyte showed higher POX production. After 72 hours, there was a decrease in the production of this enzyme in all treatments. PAL activity increased after 48 and 72 h. There was no trend in CHI production when compared to other enzymes. Additional studies are needed to optimize the experimental conditions and validate the potential of *C. siamense* for biocontrol in guaraná seedlings.

Keywords: Agriculture; Phytopathology; Amazon; Guarana.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
A cultura do guaranazeiro	13
Antracnose	15
A presença de micovírus em fungos	17
Micovírus em <i>Colletotrichum</i> spp.	24
Controle biológico e resistência induzida	26
Controle biológico em guaranazeiro	29
CAPÍTULO 1	32
Micovirose em <i>Colletotrichum</i> spp.: uma revisão abrangente.....	32
Introdução	33
Micovírus	34
Formas de transmissão das micoviroses	37
Interação micovírus-hospedeiro	37
Incidência de micovírus em <i>Colletotrichum</i> spp.	40
Conclusões e perspectivas futuras	49
Agradecimentos	50
Referências	50
CAPÍTULO 2	57
<i>Colletotrichum siamense</i> , endófito portador de micovírus como estratégia de controle biológico da antracnose em guaranazeiro	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAIS E MÉTODOS	60
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÃO	69
AGRADECIMENTOS	69
CONFLITO DE INTERESSES	70
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO 3	74
Controle biológico e indução de resistência em guaranazeiro: eficiência da aplicação do fungo endofítico <i>Colletotrichum siamense</i>	74

INTRODUÇÃO	76
MATERIAIS E MÉTODOS	77
RESULTADOS	80
DISCUSSÃO	83
CONCLUSÃO	86
CONFLITO DE INTERESSES	86
AGRADECIMENTOS	86
REFERÊNCIAS	86
CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92

INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana*, variedade *sorbilis* (Martius) Duke) é uma planta nativa da Amazônia brasileira que produz o fruto conhecido como guaraná. É uma espécie vegetal arbustiva e trepadeira da família Sapindaceae (ÂNGELO *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009).

O Brasil é praticamente o maior produtor de guaraná, em escala comercial, no mundo (NAZARÉ; FIGUEIRÊDO, 1982; TAVARES *et al.*, 2005). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020) as plantações de guaraná no país ocupam aproximadamente 10.000 hectares dos quais 3.954 hectares encontram-se no estado do Amazonas, portanto, o guaraná é de grande valor para a economia regional, pois alcança bons preços na comercialização e constitui-se numa alternativa para diversificação da agricultura (BENTES; MATSUOKA, 2002). Além disso, desde o início do século passado, o guaraná passou a despertar o interesse da indústria, inicialmente de bebidas e, posteriormente, de cosméticos, aromas, alimentos e outras (MENEGHETTI *et al.* 2021).

Um fator que limita a produção e a expansão da guaranicultura no Amazonas é a antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum* sp. considerada a doença mais séria da cultura (BONATELLI *et al.* 2016). A antracnose se estabelece em qualquer estágio de desenvolvimento de forma altamente destrutiva. Nas plantas atacadas, uma das características da infecção é o crestamento em folhas jovens, seguido da queda das mesmas. Em folhas novas, ainda em crescimento e antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico, quadro denominado antracnose. Quando numerosas, essas lesões causam deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendente dos ramos e por fim, a da planta (TAVARES *et al.*, 2005).

Espécies de *Colletotrichum* possuem diferentes mecanismos que possibilitam a colonização e o desenvolvimento nos tecidos de seu hospedeiro. Uma das principais estratégias utilizadas é a produção de enzimas como cutinases, pectinases, policetídeo sintase, dentre outras, que auxiliam no processo de adesão e infecção do fungo (PERFECT *et al.*, 1999). Existe uma série de estruturas de infecção apresentadas por estes patógenos incluindo, tubos germinativos, apressórios, hifas intracelulares necrotróficas secundárias e acérvulos (SUTTON, 1990).

Muitos estudos já foram feitos visando ao desenvolvimento de estratégias capazes de minimizar os efeitos agressivos do fungo sobre esta cultura. O controle da doença pode ser obtido pelo emprego de pelo menos duas estratégias: utilização de clones possuidores de alto níveis de

resistência estável e redução da severidade da doença mediante utilização de podas em épocas pré-definidas (TAVARES *et al.*, 2005). Apesar de haver indicação para cultura de controle químico, não há registros de que seja aplicado de maneira efetiva no campo. Mesmo com essas estratégias de controle da antracnose, a produtividade no Amazonas permanece abaixo da média nacional (MENEGHETTI *et al.* 2021).

Uma alternativa sustentável de controlar a antracnose seria o emprego do controle biológico por microrganismos associados às plantas, como bactérias e fungos. Dentre aqueles que estabelecem relações de simbiose com a planta, destacam-se os endofíticos. Os microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos a seu hospedeiro (PETRINI, 1991). Ao longo dos anos, pesquisas têm comprovado que a relação estabelecida entre microrganismos endofíticos e planta hospedeira resulta, em geral, benefício ao vegetal. Destacam-se a produção de moléculas capazes de otimizar o crescimento da planta no que tange à produção de fitormônios, proteção contra herbivoria e estímulo do metabolismo secundário por meio de alterações morfológicas nos tecidos do hospedeiro, e/ou provocando alterações fisiológicas (AZEVEDO, 1998).

Uma alternativa que suscitou inúmeros estudos nos últimos anos, é a utilização de fungos infectados com micovírus para controle de fitopatógenos. A presença do vírus no hospedeiro fúngico pode conduzir a várias alterações fisiológicas, dentre elas, a diminuição da virulência em fungos fitopatogênicos conduzindo ao fenômeno da hipovirulência (DOUBLE *et al.* 2018; ROMON-OCHOA *et al.* 2020). O fenótipo de hipovirulência associado a presença de micovírus em fungos patógenos de plantas pode ser transmissível intraespecificamente por meio de anastomose de hifas em isolados compatíveis e há a possibilidade de haver a transmissão também por tubos de anastomoses conidiais (ANAGNOSTAKIS; DAY, 1979; ROCA *et al.* 2003).

Diante do exposto, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar, *in vivo*, a ação de *C. siamense* infectado com micovírus como controle biológico da antracnose em guaranazeiro (*P. cupana*). Os objetivos específicos foram:

- Analisar o potencial de *C. siamense* em controlar o fitopatógeno causador da antracnose por meio da inoculação em estacas de guaranazeiro.
- Analisar o potencial de *C. siamense* em controlar o fitopatógeno causador da antracnose por meio da inoculação na parte aérea de guaranazeiro.
- Avaliar a influência da inoculação de *C. siamense* sobre as características morfológicas e fisiológicas de mudas de guaranazeiro.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura do guaranazeiro

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis* H.B.K.) é uma planta nativa da Amazônia e durante séculos foi utilizada pelas civilizações indígenas, em virtude de suas propriedades estimulantes e medicinais. É a espécie vegetal com maior teor de cafeína (2% a 6%), superando em até três vezes o encontrado no café (COSTA; FERREIRA, 2011). Caracteriza-se como uma planta perene arbustiva, trepadeira e lenhosa que pode atingir 10 metros de altura, embora quando cultivada em áreas abertas, cresce no máximo até três metros (ERICKSON *et al.*, 1984). Desde o início do século passado, o guaraná passou a despertar o interesse da indústria, inicialmente de bebidas e, posteriormente, de cosméticos, aromas, alimentos e outras (MENEHETTI *et al.* 2021). Além disso, várias atividades farmacológicas já foram atribuídas a este fruto (CARVALHO *et al.* 2016; MINGORI *et al.* 2017; POMPORTES *et al.* 2017; LIMA *et al.* 2018).

Em termos de produção de sementes, o Brasil é praticamente o único produtor mundial de guaraná, com pequenas exceções para Amazônia peruana e venezuelana, com áreas plantadas no Amazonas (centro de dispersão da espécie), no Pará, no Acre, em Rondônia, Mato Grosso e da Bahia. No País, a produção está perto de 2761 toneladas/ano (CONAB, 2020) sendo que 70% é direcionada para as indústrias de refrigerantes gaseificados sob forma de xarope e apenas 30% são comercializado sob a forma de pó, bastão e extrato para consumo interno e exportação (PEREIRA, 2005; SUFRAMA, 2003).

Desde o início do processo de domesticação, a cultura do guaraná vem assumindo importância cada vez maior no cenário econômico e social do país, especialmente na Região Amazônica. A cultura demanda quantidade expressiva de mão-de-obra não especializada, como por exemplo, no Município de Maués, onde, segundo a Embrapa, cerca de 2.600 famílias cultivam aproximadamente 3.120 ha de guaranazais (OLIVEIRA, 2014).

Até a década de 1980, a cidade de Maués, no Amazonas, era a líder indiscutível na produção de guaraná, com 90% da produção de pequenos produtores no Brasil. No entanto, a expansão do uso comercial da semente, principalmente devido ao uso do extrato de guaraná em refrigerantes e pelas indústrias farmacêuticas e de beleza, levou milhares de agricultores no sul da Bahia, na área de cultivo de cacau, a plantar guaraná (MARQUES *et al.* 2019). O guaraná expandiu-se rapidamente nesta região devido às condições edáficas e climáticas, que são semelhantes às do habitat natural da planta (alta temperatura, precipitação média anual entre 1500

e 2000 mm e solo bem drenado), mas principalmente ausência de pragas (tripes) e doenças (antracnose) e aumento da fertilidade do solo (SCHIMPL *et al.*, 2013).

A partir da safra de 2001, a EMBRAPA Amazônia Ocidental vem fornecendo mudas desenvolvidas pelo processo de clonagem (reprodução assexuada), as quais propiciam os seguintes benefícios: resistência à antracnose, produtividade em até cinco vezes superior à da planta tradicional, precocidade no início da produção (2 anos contra 4 da planta tradicional), estabilização da produção comercial 3 anos após o plantio (contra 5 da planta tradicional), e índice de sobrevivência das plantas clonadas no campo superior ao das plantas tradicionais (90% das primeiras contra 80% das últimas) (SUFRAMA, 2003). Desde 1999 até os dias atuais, a EMBRAPA disponibilizou para os produtores cerca de 18 clones de guaranzeiro melhorados geneticamente (quadro 1) que passaram a integrar os campos de produção do Amazonas.

Quadro 1 - Cultivares de guaranzeiro obtidas por técnicas de melhoramento genético lançadas pela EMBRAPA Amazônia Ocidental entre os anos 1990 e 2009

Nome	Reação à antracnose	Número de colheitas/ano	Produtividade de sementes secas (kg/planta/ano)	Referência
BRS-Amazonas	Tolerante	5	1,49	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (1999)
BRS-Maués	Tolerante	4	1,55	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (1999)
BRS-CG372	Tolerante	2,76	1,46	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG648	Tolerante	3,22	1,02	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG189	Tolerante	2,67	1,02	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG505	Tolerante	4,53	1,13	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG610	Tolerante	3	1,10	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG612	Tolerante	3,02	1,09	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG850	Tolerante	3,36	1,34	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG882	Tolerante	4,09	1,09	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG608	Tolerante	3,79	1,30	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-CG611	Tolerante	4,11	1,39	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2000)
BRS-Mundurucânia	Alta resistência, estável e moderadamente previsível	6	1,40	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2007a)

BRS-Andirá	Alta resistência, estável e previsível	7,00	1,40	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2007b)
BRS-Cereçaporanga	Resistência moderada e estável	6,00	1,30	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2007c)
BRS-Luzéia	Alta resistência, estável e previsível	7,00	1,60	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2007d)
BRS-Saterê	Resistência estável	3,00	1,00-1,50	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2009a)
BRS-Marabitaná	Resistência estável	3,00	1,00-1,50	Nascimento Filho <i>et al.</i> , (2009b)

Fonte: Elaborado pela autora

Os estados do Amazonas e da Bahia, juntos, contêm cerca de 90% da área plantada do guaraná no Brasil, no entanto, nos últimos 5 anos, o rendimento médio na Bahia foi aproximadamente 2 vezes maior do que no estado do Amazonas. Vários fatores contribuem para a menor produtividade na região amazônica tais como baixa qualificação técnica dos produtores, tratamentos culturais inadequados, plantas matrizes que não passaram por processos de melhoramento genético e doenças fúngicas como o superbrotamento (*Fusarium decemcellulare*) e a antracnose (PEREIRA, 2005; SCHIMPL *et al.*, 2013). Mesmo com essas estratégias de controle da antracnose, a produtividade no Amazonas permanece abaixo da média nacional (MENEGETTI *et al.* 2021).

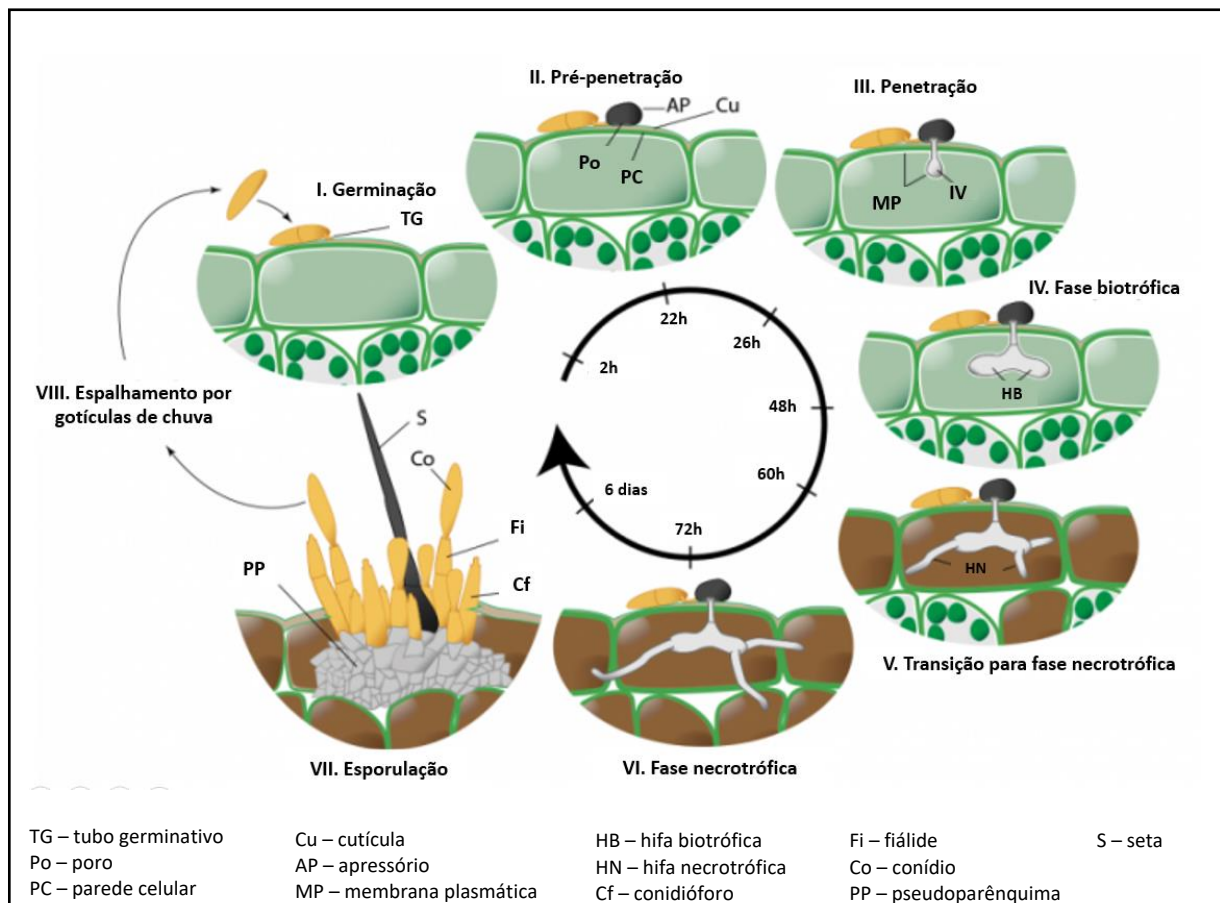
Antracnose

A antracnose é uma doença causada por espécies de *Colletotrichum* patogênicas e é um dos gêneros fúngicos mais importantes economicamente, afetando uma ampla gama de hospedeiros, especialmente em cultivos tropicais e subtropicais, bem como em árvores frutíferas (SUTTON, 1992; HYDE *et al.*, 2009). Pode causar doença em qualquer parte da planta acima do solo como caules, folhas, flores e frutos. Bailey e Jeger (1992) destacaram que *Colletotrichum* spp. podem causar antracnose em manga, abacate, mamão, leguminosas, hortaliças, frutíferas desde o estágio de plântulas até árvores adultas.

Existe uma série de estruturas de infecção apresentadas por estes patógenos incluindo, tubos germinativos, apressórios, hifas intracelulares necrotróficas secundárias e acérvulos (SUTTON, 1980). Inicialmente, colonizam a planta como hemibiotróficos e, dependendo da interação com o hospedeiro, resultam na formação de hifas necrotróficas secundárias (figura 1) (O'CONNEL *et al.* 2012).

Em geral, nas lesões causadas por *Colletotrichum* spp. forma-se um acérvulo nas camadas mais externas do tecido do hospedeiro, de onde saem massas de conídios unidos por uma matriz mucilaginosa composta de glicoproteínas, polissacarídeos, enzimas e outros constituintes. Esta mucilagem impede a germinação prematura e dessecação dos conídios e os protege dos raios UV e dos efeitos tóxicos de compostos fenólicos produzidos pelo hospedeiro (BAILEY *et al.*, 1992; SKIPP *et al.*, 1995). Os conídios de *Colletotrichum* spp. germinam na presença de água e dão origem a um tubo germinativo e apressório que adere fortemente à cutícula do hospedeiro e geralmente está envolvido na penetração de tecidos cuticularizados (BAILEY *et al.*, 1992; BENTES, 2000).

Figura 1. Esquema das etapas do processo de colonização de espécies patogênicas de *Colletotrichum*. De I a IV demonstram o comportamento hemibiotrófico e de V a VIII as etapas associadas à fitopatogenicidade.



Fonte: <http://pilotunit.com/projects/lab-projects/npc>. Imagem adaptada

Embora várias medidas de controle contra espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* já tenham sido testadas, o controle químico continua sendo o padrão-ouro (DOWLING *et al.*, 2020).

A pulverização de fungicidas, além de onerar os custos de produção, é prejudicial ao meio ambiente e ao homem.

A antracnose do guaranazeiro é causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola*. Nas plantas atacadas, uma das características da infecção é o crestamento em folhas jovens, seguido da queda das mesmas. Em folhas novas, ainda em crescimento e antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico. Quando numerosas, essas lesões causam deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendente dos ramos e por fim, a da planta (TAVARES *et al.*, 2005).

O controle biológico de plantas é um método alternativo ao uso de agroquímicos, que devido sua eficiência e menor custo de manutenção e agressividade ao ecossistema, vem ganhando espaço no mundo (AZEVEDO *et al.*, 2000). Uma alternativa que suscitou inúmeros estudos nos últimos anos, é a utilização de fungos infectados com micovírus para controle de fitopatógenos. A presença do vírus no hospedeiro fúngico pode conduzir a várias alterações fisiológicas, dentre elas, a diminuição da virulência em fungos fitopatogênicos conduzindo ao fenômeno da hipovirulência. O fenótipo de hipovirulência associado a vírus de dsRNA (RNA fita dupla) em fungos patógenos de plantas pode ser transmissível intraespecificamente por meio de anastomose de hifas em isolados compatíveis (ANAGNOSTAKIS; DAY, 1979).

A presença de micovírus em fungos

Micovírus caracterizam-se como vírus que infectam fungos e atualmente têm sido descritos em uma ampla variedade de espécies fúngicas. O primeiro relato da presença de partículas virais em fungos aconteceu em 1962 quando Hollings estudava uma doença no cogumelo comestível *Agaricus bisporus* (HOLLINGS, 1962). Nessa mesma época, foi descoberto que os dsRNAs (do inglês, *double-stranded RNA*) virais presentes nos extratos de isolados de *Penicillium stoloniferum* induziam a síntese de interferon (BANKS *et al.*, 1968), uma proteína antiviral produzida por animais, desencadeando interesse nesses microrganismos (BUCK, 1988; PICARELLI *et al.*, 2017).

Vírus fúngicos são frequentemente associados a infecções latentes em seus hospedeiros. Eles são conhecidos por não terem vetores naturais (por exemplo, artrópodes ou anelídeos) no entanto, Petrzik *et al.* (2016) registraram pela primeira vez a presença de um micovírus (*Thelephora terrestris virus 1 - TtV1*) isolado inicialmente em um fungo micorrízico (*Thelephora*

terrestris (Ehrh.), em espécies de ácaro (*Steganacarus (Tropacarus) carinatus* e *Nothrus silvestris*).

Na natureza são comumente transmitidos horizontalmente por meios intracelulares (anastomose das hifas) ou verticalmente pela disseminação de esporos (mitóticos e às vezes meióticos). Yu *et al.* (2013) descreveram também a possibilidade de transmissão do micovírus *Sclerotinia sclerotiorum* hypovirulence-associated DNA virus 1 (SsHADV-1) via aplicação de partículas virais diretamente sobre a colônia de *Sclerotinia sclerotiorum*. Em outra pesquisa também foi possível verificar que quando SsHADV-1 foi pulverizado em folhas de *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus* houve redução das lesões causadas pela linhagem fitopatogênica de *S. sclerotiorum* (YU *et al.* 2010).

Assim, embora na maioria das vezes eles não apresentem uma fase extracelular para os seus ciclos de vida, possuem meios eficientes tanto para a transmissão horizontal como vertical e são claramente muito bem-sucedidos, sendo prevalentes em todos os principais grupos de fungos como Chytridiomycota, Zigomycota, Ascomycota e Basidiomycota. As estimativas da incidência de micovírus sugerem que 30-80% das espécies de fungos podem estar infectadas (GHABRIAL; SUZUKI, 2009; GHABRIAL *et al.*, 2015; PEARSON *et al.*, 2009).

Semelhante aos vírus isolados de animais ou vegetais, os micovírus podem localizar-se no citoplasma ou na mitocôndria do hospedeiro de modo latente (PEARSON *et al.*, 2009), com efeitos adversos como hipo e hipervirulência (VAINIO *et al.*, 2018) e efeitos mutualísticos (MÁRQUEZ *et al.*, 2007).

Em relação à taxonomia viral, existem algumas características observadas que auxiliam no processo de identificação e classificação. São elas: a gama de hospedeiros, o modo de transmissão na natureza, a morfologia e o tamanho da partícula, a presença ou ausência de capsídeo e de envelope, o tipo e o número de segmentos de ácido nucleico, a organização genômica e a porcentagem de identidade entre as sequências genômicas (KING *et al.*, 2012; PICARELLI *et al.*, 2017). De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) atualmente os micovírus são classificados em 23 gêneros, 15 famílias, uma subfamília (*Spinareovirinae*) e duas ordens (*Mononegavirales* e *Tymovirales* – famílias *Alphaflexiviridae* e *Gammapflexiviridae*).

Os micovírus podem se apresentar com diferentes tipos de genomas como os de **dsRNA** linear (RNA de fita dupla) que abrange sete famílias (*Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadriviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae* e *Totiviridae*), **(+)ssRNA** (RNA fita

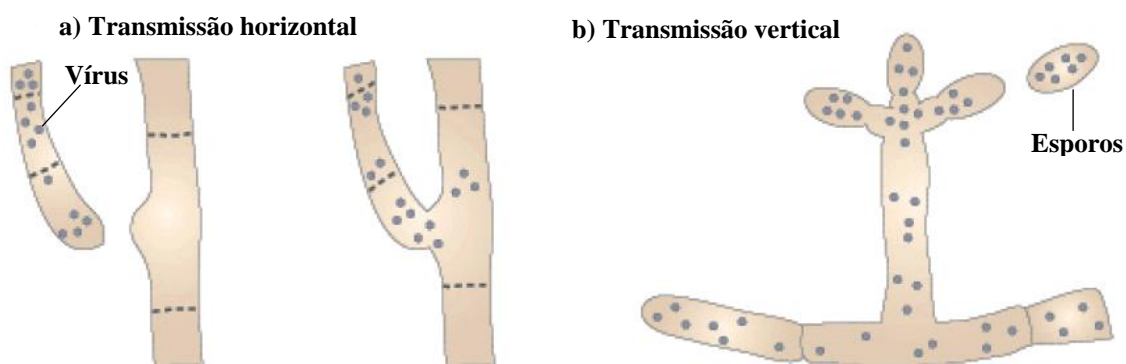
simples senso positivo) que abrange cinco famílias (Alphaflexiviridae, Barnaviridae, Gammaflexiviridae, Hypoviridae e Narnaviridae), (-)ssRNA (RNA fita simples senso negativo) que abrange a família Mycomononegaviridae e ssDNA (DNA fita simples) representado pela família Genomoviridae (GHABRIAL *et al.*, 2015).

Formas de transmissão das micoviroses

As micoviroses, na natureza, podem ser transmitidas por via vertical ou horizontal (WANG *et al.*, 2016) como demonstrado na figura 2. A transmissão vertical, por divisão de células na produção de esporos sexuais ou assexuais, é a mais comum e o meio primário de propagação dos micovírus. Já foram relatadas taxas de 100% de transmissão de vírus na produção de esporos assexuais, o que dificulta a obtenção de isolados isogênicos sem micovírus (PICARELLI *et al.*, 2017; LEQOC *et al.*, 1979). A transmissão por esporos sexuais também pode ocorrer, mas em menor frequência quando comparada à transmissão por esporos assexuais (PEARSON *et al.*, 2009).

A transmissão horizontal por meio de anastomose de hifas ocorre quando há a compatibilidade vegetativa entre os indivíduos fúngicos. No processo de troca citoplasmática de células fúngicas, os micovírus se espalham para células de hifas não infectadas (WANG *et al.*, 2017). Nos casos em que não há reconhecimento entre as células envolvidas na anastomose têm-se a incompatibilidade vegetativa.

Figura 2. Representação das formas de transmissão de micovírus na natureza. a) Transmissão horizontal b) Transmissão vertical



Fonte: adaptada de Jamal (2010)

A incompatibilidade vegetativa caracteriza-se por uma compartimentação e lise das células envolvidas e tem sido comparada à reação de hipersensibilidade em planta (PAOLETTI; SAUPE,

2009). Caracteriza-se como a principal barreira à transmissão horizontal de micovírus. Quando hifas de duas cepas de fungos incompatíveis se fundem e não ocorre o reconhecimento, é desencadeado o processo de morte celular programada. A troca citoplasmática falha, resultando na impossibilidade de transmissão horizontal do micovírus (WANG *et al.*, 2017). No entanto, em alguns fungos, é possível driblar essa incompatibilidade vegetativa observada entre hifas por meio dos tubos de anastomoses conidiais (Conidial Anastomosis Tubes - CATs). Roca *et al.* (2003) observaram a presença de CAT's em *Colletotrichum lindemuthianum* que possibilitava o compartilhamento entre os citoplasmas de organelas, vacúolos e núcleos. Além de *C. lindemuthianum* estudos sobre CAT's estão bem estabelecidos em diferentes espécies como *Colletotrichum gossypii*, *C. fructicola*, *C. nymphaeae*, *C. siamense*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa* e *Venturia inaequalis* (ROCA *et al.* 2004; GONÇALVES *et al.* 2016; KURIAN *et al.* 2018; ROCA *et al.* 2005; MEHTA; BAGHELA, 2021; LEU, 1967).

Embora compartilhem algumas características com vírus de animais e vegetais, os micovírus possuem características únicas, como: (1) a maioria necessita de rota extracelular para infecção; (2) micovírus são transmitidos entre células apenas através da divisão celular, esporulação e fusão celular; e (3) aparentemente não possuem uma proteína de movimento, que é essencial para o ciclo de vida de vírus de animais e plantas (SON *et al.*, 2015).

Interação micovírus-hospedeiro

Os micovírus, ao interagirem com o hospedeiro, geralmente não causam sintomas aparentes, sendo, portanto, considerados latentes na maioria dos fungos (PEARSON *et al.*, 2009). No entanto, a infecção por micovírus pode alterar a taxa de crescimento micelial, além de outras alterações. Van Diepeningen *et al.* (2006) relataram diferenças marcantes no crescimento, produção de esporos e capacidade competitiva entre cepas isogênicas de *Aspergillus* infectadas e não infectadas.

Milgroom e Hillman (2011) consideram que a barreira à transmissão horizontal, caracterizada pela incompatibilidade vegetativa entre indivíduos e a dependência da transmissão vertical contribuíram, ao longo do tempo, para que os micovírus evoluíssem para serem benéficos não induzindo alteração, positiva ou negativa, ao fungo. Ainda assim, esses autores acreditam que as alterações, ainda que sutis, observadas em características como taxa de crescimento, esporulação e virulência, que interferem na dinâmica do vírus e de seu hospedeiro e o fato de os micovírus não ocorrerem em alta frequência, colocam em dúvida se eles são de fato tão benignos

quanto possam parecer. Além disso, alterações no ambiente e na fisiologia do fungo e a ocorrência de infecções mistas podem interferir nas manifestações de virulência e até mesmo na transmissão dos micovírus entre seus hospedeiros (PEARSON *et al.*, 2009; PICARELLI *et al.*, 2017).

Curiosamente, a maioria dos sintomas associados a infecções por micovírus pode ser útil para seus hospedeiros e pode afetar a interação entre fungos e outros organismos. Assim, a presença de micovírus em fungos endofíticos está associada à adaptação de plantas a condições extremas, incluindo o aumento da temperatura. Por exemplo, a resistência térmica do capim *Dichanthelium lanuginosum* que cresce no solo geotérmico é causada pela presença do micovírus da tolerância térmica no endofítico *Curvularia* (MÁRQUEZ *et al.*, 2007). Além disso, a infecção por micovírus pode afetar a adaptação de endófitos a hospedeiros de plantas. Assim, fungos entomopatogênicos, cujo ciclo de vida inclui a fase endofítica natural na grama selvagem *Festuca rubra* e *Holcus lanatus*, demonstraram adquirir a capacidade de colonizar outras plantas após serem infectadas com micovírus (ASENSIO *et al.*, 2013).

As interações mais estudadas são aquelas em que os micovírus induzem hipovirulência, particularmente aquelas envolvendo o gênero *Hypovirus*, por representarem uma alternativa efetiva ao controle convencional de fungos fitopatogênicos (MILGROOM; HILLMAN, 2011). Na hipovirulência mediada por micovírus, a capacidade do fungo fitopatogênico hospedeiro causar doença é reduzida ou completamente perdida como consequência da infecção viral (YU *et al.*, 2010; PICARELLI *et al.*, 2017).

O advento de extenso estudo relacionado à infecção por micovírus no fungo filamentosso *Cryphonectria parasitica* forneceu uma forte base para futuras pesquisas em hipovirulência fúngica ou debilitação em outras espécies de fungos (GHABRIAL; SUZUKI, 2009; EUSEBIO-COPE *et al.*, 2015). A interação do micovírus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) com seu hospedeiro fúngico *C. parasitica* é bem estudada e tem sido modelo para diversos estudos com outros fungos patogênicos como *Fusarium graminearum* (CHU *et al.*, 2002), *Sclerotinia homoeocarpa* (ZHOU; BOLAND, 1997) e *Botrytis cinerea* (WU *et al.*, 2010).

O cancro da castanheira é uma doença causada pelo fungo *Cryphonectria parasitica*. Este fungo ascomiceto infecta a casca e o câmbio da castanheira através de feridas e induz cancras da casca, que podem levar à morte das partes distais após o anelamento dos ramos ou o tronco de uma árvore inteira (HEINIGER; RIGLING, 1994). Duas décadas após os primeiros registros da doença, foi observado que algumas árvores infectadas começaram a se recuperar da doença, como indicado

pela ocorrência de cancrios superficiais não-letais na superfície da casca. Esta recuperação espontânea foi encontrada como resultado do surgimento de um micovírus que parasitava os indivíduos da população de *C. parasitica* (CHOI; NUSS, 1992; ROBIN; HEINIGER, 2001).

O CHV1 infecta o hospedeiro fúngico e reduz significativamente sua virulência fenômeno chamado hipovirulência. Essa infecção também inibe a reprodução sexual do fungo e reduz sua pigmentação e esporulação, dando-lhe uma aparência branca típica em cultura. A descoberta de que a hipovirulência era transmissível forneceu a base para o controle biológico da doença na castanheira (CHEN; NUSS, 1999; NUSS, 2005). Na Europa, cepas de *C. parasitica* portadores de CHV1 foram utilizados comercialmente com sucesso no controle da doença (NUSS, 2005).

O interesse em micovírus tem aumentado nas últimas décadas, e uma aceleração considerável de seu estudo tem sido observada (quadro 2). Em primeiro lugar, isso está associado ao fato de que muitos micovírus causam alterações fenotípicas em seus fungos hospedeiros, e essa característica pode ser valiosa tanto para pesquisa fundamental quanto para uso prático. O interesse nesses patógenos também é estimulado pelas conquistas técnicas no campo da biologia molecular dos micovírus. Ao mesmo tempo, os vírus dos fungos são utilizados com sucesso como ferramentas para estudar os mecanismos de interação e controle do hospedeiro (KIRICHENKO *et al.*, 2018).

Quadro 2 – Espécies de fungos fitopatogênicos onde já foi observado o fenômeno de hipovirulência mediada por micovírus

HOSPEDEIRO	VÍRUS	GÊNERO DO VÍRUS	REFERÊNCIAS
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus fumigatus</i> partitivirus-1 (AfuPV-1)	<i>Partitivirus</i>	BHATTI <i>et al.</i> (2012)
	<i>Aspergillus fumigatus</i> chrysovirus (AfuCV)	<i>Chrysovirus</i>	JAMAL <i>et al.</i> (2010)
	<i>Aspergillus niger</i> chrysovirus (AniCV)	<i>Chrysovirus</i>	HAMMOND <i>et al.</i> (2008)
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria alternata</i> chrysovirus 1	<i>Betachrysovirus</i>	MA <i>et al.</i> (2020)
<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	DALZOTO <i>et al.</i> (2006)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i> chrysovirus 1	Provável <i>Chrysovirus</i>	WANG <i>et al.</i> (2014)
	<i>Botryosphaeria dothidea</i> RNA virus 1	-	ZHAI <i>et al.</i> (2016)
<i>Botrytis</i> spp.	<i>Botrytis cinerea</i> mitovirus 1	Provável <i>Mytovirus</i>	WU <i>et al.</i> (2010)
	<i>Botrytis porri</i> RNA virus 1	N.I	WU <i>et al.</i> (2012)

	-	-	CASTRO <i>et al.</i> (2003)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Chryphonectria hypovirus 1	<i>Hypovirus</i>	SHAPIRA <i>et al.</i> (1991)
	Chryphonectria hypovirus 2		HILLMAN <i>et al.</i> (1992)
	Chryphonectria hypovirus 3		FULLBRIGHT <i>et al.</i> (1983)
	Mycoreovirus 1	<i>Mycoreovirus</i>	SUZUKI <i>et al.</i> (2004)
<i>Diaporthe</i> spp.	Diaporthe ambigua RNA virus	N.I	PREISIG <i>et al.</i> (1996)
<i>Fusarium</i> spp.	Fusarium graminearum virus 1-DK21	N.I	CHU <i>et al.</i> (2002)
	Fusarium graminearum hypovirus 2 - JS16	Provável <i>Hypovirus</i>	LI <i>et al.</i> (2015)
	Fusarium graminearum mycovirus china 9	N.I	DARISSA <i>et al.</i> (2012)
	Fusarium graminearum hypovirus 1 (FgHV1)	Provável <i>Hypovirus</i>	WANG <i>et al.</i> (2013)
	Fusarium graminearum mycotymovirus 1 (FgMTV1/SX64)	<i>Mycotymovirus</i>	LI <i>et al.</i> (2016)
	Fusarium oxysporum f. sp. dianthi vírus 1 (FodV1)	<i>Chrysovirus</i>	TORRES-TRENAS <i>et al.</i> (2019)
<i>Helicobasidium mompa</i>	Helicobasidium mompa endornavirus 1	<i>Endornavirus</i>	IKEDA <i>et al.</i> (2003)
<i>Helminthosporium victoriae</i>	Helminthosporium victoriae virus 190S	<i>Victorivirus</i>	ZHAO <i>et al.</i> (2006)
<i>Heterobasidion</i> spp.	Heterobasidion partitivirus 13	<i>Alphapartitivirus</i>	VAINIO <i>et al.</i> (2018)
	H. ecrustosum, strain 1 (HetRV3-ec1)	Provável <i>Partitivirus</i>	VAINIO <i>et al.</i> (2010)
	H. abietinum 04188 (HetRV6-ab6)	Provável <i>Partitivirus</i>	Ikeda <i>et al.</i> (2013)
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Magnaporthe oryzae chrysovirus 1 strain A	Provável <i>Chrysovirus</i>	URAYAMA <i>et al.</i> (2010)
	Magnaporthe oryzae chrysovirus 2 strain B		URAYAMA <i>et al.</i> (2014)
<i>Plasmopara halstedii</i>	Plasmopara halstedii virus	N.I	GRASSE <i>et al.</i> (2013)
<i>Penicillium digitatum</i>	Penicillium digitatum virus 1	<i>Victorivirus</i>	NIU <i>et al.</i> (2016)
<i>Pestalotiopsis theae</i>	Pestalotiopsis theae chrysovirus-1	<i>Alphachrysovirus</i>	ZHOU <i>et al.</i> (2021)
<i>Rhizoctonia</i> spp.	Rhizoctonia solani M2	Provável <i>Narnaviridae</i>	LAKSHMAN <i>et al.</i> (1998)
	Rhizoctonia solani partitivirus 2	<i>Alphapartitivirus</i>	ZHENG <i>et al.</i> (2014)
<i>Rosellinia necatrix</i>	Mycoreovirus 3	<i>Mycoreovirus</i>	KANEMATSU <i>et al.</i> (2014)
	Rosellinia necatrix megabirnavirus 1	<i>Megabirnavirus</i>	CHIBA <i>et al.</i> (2009)
	Rosellinia necatrix megabirnavirus 2 Rosellinia necatrix partitivirus 1	Provável <i>Megabirnavirus e Partitivirus</i>	LIN <i>et al.</i> (2012)
<i>Sclerotinia homeocarpa</i>	Ophiostoma mitovirus 3a	<i>Mitovirus</i>	DENG <i>et al.</i> (2003)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sclerotinia gemycircularvirus 1	<i>Gemycircularvirus</i>	YU <i>et al.</i> (2010) ZHANG <i>et al.</i> (2020)

	Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus	<i>Sclerodarnavirus</i>	XIE <i>et al.</i> (2006)
	Sclerotinia sclerotimonavirus	<i>Sclerotimonavirus</i>	LIU <i>et al.</i> (2014)
	Sclerotinia sclerotiorum partitivirus 1	Provável <i>Partitivirus</i>	XIAO <i>et al.</i> (2014)
	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 1 Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 2	Provável <i>Mitovirus</i>	XIE & GHABRIAL (2012)
	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 1	<i>Mitovirus</i>	XU <i>et al.</i> (2015)
	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 2 Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 3 Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 4	Provável <i>Mitovirus</i>	KHALIFA; PERSON (2013)
	Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 1	Provável <i>Hypovirus</i>	XIE <i>et al.</i> (2011)
	Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 2	<i>Hypovirus</i>	KHALIFA; PERSON (2014)
	Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 2	Provável <i>Hypovirus</i>	MARZANO <i>et al.</i> (2016)
	Sclerotinia sclerotiorum botybirnavirus 3	NI	WANG <i>et al.</i> (2019)
	Sclerotinia sclerotiorum mycotymovirus 1	NI	WANG <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Elaborado pela autora

Sob a perspectiva agrícola, os micovírus podem contribuir para agricultura sustentável como agentes de controle biológico. Atualmente, o controle de fungos patogênicos de plantas é uma tarefa difícil devido à falta de estratégias adequadas de controle da doença. Além dos riscos para a saúde e meio ambiente, o uso de fungicidas é muitas vezes oneroso ao produtor. A necessidade de novas medidas de biocontrole para combater doenças fúngicas não pode ser ignorada. Além disso, o estudo das interações vírus/hospedeiro é uma área importante da virologia moderna, na qual os micovírus podem ser usados como ferramentas para explorar a fisiologia de seus hospedeiros fúngicos (GHABRIAL; SUZUKI, 2009).

Micovírus em *Colletotrichum* spp.

O primeiro registro de micovírus em *Colletotrichum* spp. ocorreu em 1975 nos trabalhos de Rawlinson e colaboradores. Ao analisarem 36 amostras de *C. lindemuthianum* isolados de feijão com diferentes graus de virulência, identificaram a presença de dsRNA em somente 5 amostras. Não foram visualizadas alterações quanto à morfologia, taxa de crescimento, produção de conídios e patogenicidade nos fungos que continham o vírus.

Dale *et al.* (1988) analisando 14 isolados australianos de *C. gloeosporioides* patógenos de *Stylosanthes* spp., encontraram diferentes padrões de bandeamento referentes a dsRNA. Cada um dos sete isolados que causaram a antracnose do tipo A continham apenas duas bandas principais de dsRNA que estavam ausentes ou presentes apenas em pequenas quantidades em sete isolados do Tipo B. Observou-se uma variação considerável entre diferentes isolados do Tipo B, mas todos os isolados continham três bandas principais que estavam ausentes em isolados do Tipo A. Esses achados forneceram evidências bioquímicas para confirmar a existência de duas populações distintas de patógenos na Austrália.

Liao *et al.* (2012) analisando três isolados de *C. acutatum* patógenos de *Capsicum* sp. perceberam que o fungo que abrigava dois diferentes vírus, apresentavam alta atividade da enzima lacase, enzima importante no papel de colonização do patógeno. No trabalho em questão, a alta taxa de colonização atribuída a este fungo foi associada ao genótipo das plantas testadas e não necessariamente à presença dos vírus no fungo em estudo. Em contrapartida, Zhong *et al.* (2014) analisando o fungo da mesma espécie, mas isolado de *Capsicum* sp. da China, verificaram que a presença do vírus no hospedeiro aumentava a produção de conídios. Esse dado foi constatado quando o mesmo foi comparado com sua linhagem isogênica (livre de vírus). O vírus foi isolado e identificado como pertencente à família *Partitiviridae*.

Lima *et al.* (2012) em um estudo para identificação morfológica e molecular de 39 fungos codificados como *Colletotrichum* sp. verificou a presença de dsRNA em três deles. Esse foi o primeiro registro de micovirose em *C. gloeosporioides*. No mesmo ano, Figueirêdo *et al.* (2012) em seus estudos com *C. gloeosporioides* causador de antracnose em cajueiro, verificou a presença de bandas características de dsRNA. Apesar de estar em pequena quantidade, a microscopia de transmissão revelou partículas isométricas características de vírus pertencentes às famílias *Chrysoviridae*, *Partitiviridae* e *Totiviridae*.

A partir de *C. gloeosporioides*, patógeno de *Citrus* sp. isolado de frutos doentes, Zhong *et al.* (2016) isolaram um novo vírus pertencente à família *Chrysoviridae*. Rosseto *et al.* (2016) após realizar um estudo com 26 espécies de *Colletotrichum* isolados de diferentes hospedeiros verificou que somente um deles apresentava sinais da presença de micovírus. Após o tratamento com as enzimas DNase e nuclease foi confirmado que as bandas visualizadas no gel pertenciam a um micovírus. As características estruturais observadas na microscopia de transmissão sugeriram que o mesmo pertencia a família *Partitiviridae*.

Campo *et al.* (2016) ao analisarem o fenômeno de silenciamento de RNA em *C. higginsianum* verificaram que, quando este mecanismo apresentava falhas, o micovírus causava diminuição na quantidade de conídios formados e alteração no tamanho dos mesmos.

Marzano *et al.* (2016) isolaram de *Colletotrichum truncatum* dois micovírus pertencentes a família Partitiviridae. Esse fungo causa antracnose em diversas culturas especialmente na soja onde ele é transmitido por sementes contaminadas (GOULART, 2009).

Jia *et al.* (2017) foram os primeiros a registrar um micovírus com partículas filamentosas em *Colletotrichum camelliae*. Esse fungo é causador de antracnose em *Camellia sinensis* na China. Diferente do que a maior parte dos estudos demonstram, a presença do micovírus não causou o fenômeno de hipovirulência. Os estudos demonstraram que mesmo quando o fungo foi curado do vírus, ele foi capaz de causar os sintomas característicos da doença.

Zhai *et al.* (2018) caracterizaram o vírus presente em *Colletotrichum fructicola* bem como seus efeitos na taxa de crescimento, morfologia da colônia e virulência em frutos destacados de pêra (*Pyrus bretschneideri*). Os resultados demonstraram que a presença do vírus diminuía a taxa de crescimento e a virulência dos sintomas no fruto, mas não alterava significativamente a morfologia da colônia. O vírus heptasegmentado foi classificado dentro da família *Chrysoviridae*. A transferência vertical (esporos sexuais) e horizontal (anastomose de hifas) do vírus também foi confirmada.

Controle biológico e resistência induzida

O controle biológico de doenças de plantas, incluindo patógenos fúngicos, tem sido considerado um método alternativo viável para o controle químico. Em patologia vegetal, o termo biocontrole se aplica ao uso de antagonistas microbianos para suprimir doenças (SHARMA, 2020). Heimpel e Mills (2017) ampliam esse conceito afirmando que o controle biológico se trata da supressão de populações de pragas, ervas daninhas e organismos causadores de doenças por organismos vivos e vírus.

Ao longo de seu ciclo de vida, plantas e patógenos interagem com uma ampla variedade de organismos. Essas interações podem afetar significativamente a saúde da planta de várias maneiras. Diferentes modos de ação de microrganismos ativos de biocontrole no controle de doenças fúngicas de plantas incluem hiperparasitismo, predação, antibiose, proteção cruzada, competição por sítio e nutriente e resistência induzida (SHARMA, 2020).

Dentre os diferentes agentes de controle biológico destacam-se os endofíticos. Os microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos a seu hospedeiro (PETRINI, 1991). Caracterizam-se como um grupo de distribuição ubíqua e extremamente diverso que forma associações em todo o reino vegetal e oferecem defesa indireta para plantas contra patógenos e herbívoros (HARTLEY; GANGE, 2009). Através dessa associação, desempenham um papel crucial na manutenção da saúde vegetal, conferindo proteção contra estresses bióticos e abióticos (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008; LATA *et al.*, 2018), como promotores de crescimento e contribuindo para o desenvolvimento da resistência sistêmica induzida (PIETERSE *et al.* 2014).

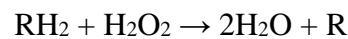
O termo ‘resistência induzida’ é um termo genérico para o estado induzido de resistência em plantas desencadeado por indutores biológicos ou químicos, que protege partes não expostas da planta contra futuro ataque de microrganismos patogênicos e insetos herbívoros. As plantas podem desenvolver resistência induzida como resultado da infecção por um patógeno, em resposta à herbivoria de insetos, após a colonização das raízes por microrganismos benéficos específicos ou após tratamento com produtos químicos específicos. A resistência induzida é expressa não apenas localmente no local da indução, mas também sistemicamente em partes da planta que são espacialmente separadas do indutor, daí o termo ‘resistência sistêmica induzida’ (do inglês Induced Systemic Resistance – ISR) (PIETERSE *et al.* 2014; KÖHL *et al.* 2019).

Aumentar a resistência é uma das estratégias agronômicas com maior potencial para prevenir perdas bióticas nas lavouras. Os mecanismos de defesa induzidos pelas plantas são acionados por estímulos reconhecidos por receptores de reconhecimento específicos, dentre eles os padrões moleculares associados a patógenos (do inglês Pathogen-Associated Molecular Patterns – PAMP’s) e os padrões moleculares associados a microrganismos (do inglês Microbe-Associated Molecular Patterns – MAMP’s). Esses PAMPs e MAMP’s induzem vias de defesa na planta para aumentar a resistência do hospedeiro contra patógenos de ataque reconhecido (CONRATH *et al.* 2015; KÖHL *et al.* 2019).

Os mecanismos de defesa induzidos envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas, compostos fenólicos ou proteínas relacionadas à patogênese (PRP) ou a formação de barreiras físicas como modificações na parede celular e cutícula pela planta induzida (GARCIÓN *et al.* 2014). Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas-chave no

metabolismo primário e secundário (STANGARLIN *et al.* 2011). Algumas dessas enzimas serão abordadas adiante com mais detalhes: peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e quitinase (CHI).

Peroxidasas são enzimas presentes em animais, plantas e microrganismos. São classificadas como oxidorreduções que podem usar diversos substratos orgânicos e inorgânicos como doadores de hidrogênio na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SIEGEL, 1993; HOAGLAND, 1990). São conhecidas por catalisar reações como a descrita abaixo.



Essas enzimas participam de processos metabólicos importantes na fisiologia vegetal como as respostas de hipersensibilidade, suberização, oxidação de compostos fenólicos os quais acumulam-se em resposta à infecção, oxidação do ácido indolacético (AIA) e na biossíntese de lignina (HOAGLAND, 1990; PASSARD *et al.* 2005; STANGARLIN *et al.* 2011; PRASANATH, 2017).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) é a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas, devido a importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. PAL é a enzima chave na síntese de PRP. Catalisa a desaminação não oxidativa da fenilalanina em ácido trans-cinâmico e amônia, que é uma etapa inicial na biossíntese de compostos fenólicos, incluindo o ácido salicílico (AS). O AS desempenha papéis fisiológicos importantes como uma molécula sinalizadora para induzir a expressão de genes de resistência contra herbívoros e patógenos (KAMLE *et al.* 2020; FERNANDES *et al.* 2009). A PAL já foi isolada de algas, fungos e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008; STANGARLIN *et al.* 2011).

As quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise da quitina, um homopolímero linear de resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Os tipos mais extensivamente estudados em plantas são as endoquitinases (COLLINGE *et al.* 1993). As quitinases são geralmente encontradas em pequenas quantidades em vegetais e seu aumento é visto após a exposição a patógenos que possuem quitina em sua estrutura, como fungos, insetos e outros invertebrados (HAMID *et al.* 2013).

A atividade desta enzima *in vivo* é complexa, pois está associada a fatores como localização e nível de expressão nas plantas (LANDIM, 2011). Por exemplo, quitinases básicas estão localizadas em vacúolos de células vegetais e, possivelmente, não entrarão em contato imediato com fungos que crescem no espaço intercelular (NEUHAUS *et al.* 1991). As formas ácidas, por outro lado, são geralmente secretadas no apoplasto ou ambiente extracelular.

Controle biológico em guaranazeiro

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver soluções alternativas para o controle da antracnose em guaranazeiro. Dentre os estudos realizados destacam-se aqueles que buscam, na microbiota associada à cultura do guaranazeiro, microrganismos capazes de inibir ou reduzir a ação do fitopatógeno (BATISTA *et al.*, 2017).

Silva *et al.* (2016) analisando a microbiota das sementes de guaranazeiro provenientes do Amazonas e da Bahia isolaram bactérias com atividade frente ao *C. guaranicola*. Para verificar a presença de compostos que pudessem interferir no desenvolvimento do patógeno, as bactérias foram inoculadas em placas contendo o fitopatógeno, e a presença ou ausência de zonas de inibição foi observada. O teste de antagonismo mostrou que 16 das 102 bactérias avaliadas reduziram substancialmente o crescimento de *C. guaranicola*. No entanto, nenhum teste *in vivo* foi realizado para inferir o controle do patógeno em condições de viveiro ou de campo.

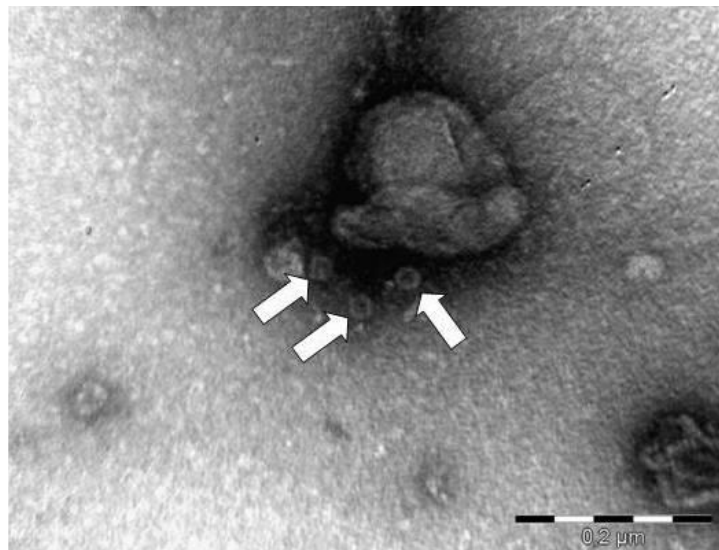
Em outro estudo com a microbiota do guaranazeiro, Tsui (2012) isolou 97 bactérias de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e 53 bactérias das folhas aparentemente saudáveis coletadas de uma fazenda localizada no município de Maués (Amazonas). Testes de antagonismo foram realizados utilizando as bactérias e aproximadamente 10% delas mostraram algum efeito antagônico contra o fungo, com cinco bactérias provenientes de folhas sintomáticas e cinco de folhas assintomáticas selecionadas e analisadas para a produção de quitina. Uma linhagem de *Serratia marcescens* de folhas assintomáticas demonstrou grande potencial para inibir *C. guaranicola* e alta atividade quitinolítica.

Não somente as bactérias, mas os fungos da microbiota do guaranazeiro também têm sido estudados quanto ao uso potencial no controle biológico da antracnose. Bonatelli *et al.* (2016) isolaram quatro fungos (duas linhagens de *Fusarium*, *Pestalotiopsis* e *Microdochium*) com alta atividade quitinilítica e inibitória a *Colletotrichum gloesporioides* em testes *in vitro*. Eles também apresentaram bons resultados de inibição *in vivo* no teste em folha destacada de guaranazeiro.

No trabalho de Bezerra (2015) foram obtidos 522 fungos endofíticos: 278 isolados de folhas, 179 de caules e 65 da rizosfera do guaranazeiro. Entre os endófitos identificados estavam os gêneros *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Guignardia*, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Também foi avaliada a atividade antagônica dos isolados fúngicos contra o fitopatógeno e 55 isolados inibiram o crescimento do patógeno. Os cinco isolados mais promissores foram classificados como *Penicillium verruculosum*, *P. pinophilum*, *Geotrichum* sp., *Schizophyllum commune* e *Aspergillus flavus*. Em testes *in vivo*, o patógeno foi inibido e nenhum dos fungos testados afetou a saúde das plantas.

Além dos fungos citados, também foi isolada uma espécie de *Colletotrichum* endofítica que inibiu a linhagem fitopatogênica em ensaios preliminares *in vivo*. Mais tarde, esse fungo foi identificado como sendo *Colletotrichum siamense*. O diferencial desta espécie em particular é a presença de partículas virais características de dsRNA (figura 3).

Figura 3 – Observação de partículas virais em microscopia eletrônica de transmissão no fungo *C. siamense* endofítico de guaranazeiro



Fonte: Bezerra (2015)

Sendo assim, a partir dos estudos iniciados com os microrganismos isolados de guaranazeiro, essa pesquisa tem por objetivo testar *in vivo* a capacidade de *C. siamense* de proteger mudas de guaranazeiro da linhagem fitopatogênica. A metodologia e os resultados serão apresentados na forma de capítulos.

No capítulo 1, inicialmente será feita uma abordagem mais aprofundada sobre o que são os micovírus e quais os impactos dessa interação no comportamento de algumas espécies de *Colletotrichum*. No capítulo 2, serão apresentados os resultados da inoculação do *C. siamense* em estacas de guaranazeiro da cultivar Cereçaporanga e as possíveis consequências da interação nas mudas testadas. Já no capítulo 3 serão apresentados os resultados da pulverização de *C. siamense* nas mudas de guaranazeiro da cultivar Maués e a produção de proteínas totais e enzimas relacionadas a patogênese.

CAPÍTULO 1

Micovirose em *Colletotrichum* spp.: uma revisão abrangente

Artigo aceito para publicação na Revista *Brazilian Journal of Biology*

Casas L.L., Azevedo J.L., Almeida L.N., Costa Neto P.Q., R.A. Bianco, Pereira J.O. Mycoviruses infecting *Colletotrichum* spp.: A comprehensive review. *Brazilian Journal of Biology*, v.84, n.1, 2022.

Micovírus em *Colletotrichum* spp.: uma revisão abrangente

L. L. Casas^a, J. L. Azevedo^b, L. N. Almeida^c, P. Q. Costa-Neto^c, R. A. Bianco^d, J. O. Pereira^c

^a Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Ciências da Saúde, 69095-001, Manaus, Amazonas, Brasil

^b Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil

^c Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, 69067-005, Manaus, Amazonas, Brasil

^d Uninorte – Laureate International Universities, 69020-030, Manaus, Amazonas, Brasil

Resumo

Colletotrichum é um dos gêneros fúngicos mais importantes economicamente, afetando uma ampla gama de hospedeiros, especialmente em cultivos tropicais e subtropicais. Atualmente já existem diversos registros de infecção por micovírus em *Colletotrichum* spp., sendo a maioria dos já identificados classificados na família *Partitiviridae*. Ocorrem registros também de micovírus pertencentes à família *Chrysoviridae*. Compreendem vírus de genoma de (+)ssRNA e dsRNA que podem ser ou não envelopados. Ainda não foram identificados micovírus com genoma de DNA em micovírus isolados de *Colletotrichum*. A infecção por micovírus pode ocorrer de forma latente, mas já foi observado em *Colletotrichum* spp. o fenômeno de hipo e hipervirulência. Além de influenciar no comportamento patogênico, a infecção pode causar mudanças fisiológicas importantes como alterações das características morfológicas, redução do crescimento vegetativo e redução na produção de conídios. O estudo com micovírus em fungos fitopatogênicos traz uma alternativa ao controle químico que é um método capaz de causar danos irreversíveis ao homem e ao meio ambiente. Sob a perspectiva agrícola, os micovírus podem contribuir para agricultura sustentável como agentes de controle biológico. Isso porque observam-se mudanças importantes na fisiologia fúngica resultando na perda total ou redução da virulência desses patógenos.

Palavras-chave: – Agricultura – Controle biológico – Hipovirulência – Fitopatologia

Introdução

Micovírus caracterizam-se como vírus que infectam fungos e atualmente têm sido descritos em uma ampla variedade de espécies fúngicas. O primeiro relato da presença de partículas virais em fungos aconteceu em 1962 quando Hollings estudava uma doença no cogumelo comestível *Agaricus bisporus* (Hollings, 1962). Nessa mesma época, foi descoberto que partículas virais de RNA fita dupla (dsRNA) presentes nos extratos de isolados de *Penicillium stoloniferum* induziam a síntese de interferon (Banks et al., 1968), uma proteína antiviral produzida por animais, desencadeando interesse nesses microrganismos (Buck, 1988; Picarelli et al. 2017).

O estudo relacionado à infecção por micovírus no fungo filamentosso *Cryphonectria parasitica* forneceu forte base para futuras pesquisas em hipovirulência fúngica ou debilitação em outras espécies de fungos. A interação do micovírus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) com seu

hospedeiro fúngico *C. parasitica* é bem estudada e tem sido modelo para diversos estudos com outros fungos patogênicos (Ghabrial & Suzuki, 2009; Wu et al., 2010; Eusebio-Cope et al., 2015; Kotta-Loizou & Coutts, 2017). A presença do vírus no fungo hospedeiro pode conduzir várias alterações fisiológicas, dentre elas, a diminuição da virulência em fungos fitopatogênicos conduzindo ao fenômeno da hipovirulência. A hipovirulência associada aos micovírus em fungos patogênicos de plantas pode ser transmissível intraespecificamente por meio de anastomose de hifas em isolados compatíveis (Anagnostakis & Day, 1979).

Colletotrichum spp. são fungos patogênicos de grande importância para a fitopatologia, pois são responsáveis por causar antracnose em diferentes culturas. A antracnose é uma doença causada por espécies de *Colletotrichum* patogênicas e afeta uma ampla gama de hospedeiros, especialmente em cultivos tropicais e subtropicais, bem como em árvores frutíferas (Sutton, 1992; Hyde et al., 2009). Pode causar doença em qualquer parte das plantas acima do solo como caules, folhas, flores e frutos. Bailey & Jeger (1992) destacaram que *Colletotrichum* spp. podem causar antracnose em manga, abacate, mamão, leguminosas, hortaliças, frutíferas desde o estágio de plântulas até árvores adultas.

Embora várias medidas de controle contra fitopatógenos já tenham sido testadas, o controle químico continua sendo o padrão-ouro (Dowling et al., 2020). A pulverização de fungicidas, além de onerar os custos de produção, é prejudicial ao meio ambiente e ao homem. Diante disso, o uso de micovírus como alternativa para o controle de fungos fitopatogênicos tem atraído muita atenção. Sendo assim, este artigo apresenta uma visão geral dos estudos sobre micovírus que infectam *Colletotrichum* spp., descrevendo a ocorrência das principais famílias de micovírus nos fungos desse gênero e os efeitos dos vírus na fisiologia do hospedeiro. Além disso, discutimos os micovírus em termos de sua classificação e transmissão, bem como as interações vírus-fungo.

Micovírus

Vírus fúngicos são frequentemente associados a infecções latentes em seus hospedeiros. Eles são conhecidos por não terem vetores naturais (por exemplo, artrópodes ou anelídeos), são comumente transmitidos horizontalmente na natureza por meios intracelulares (anastomose das hifas) ou verticalmente na natureza pela disseminação de esporos (mitóticos e às vezes meióticos). Assim, embora não possuam uma fase extracelular para os seus ciclos de vida, eles possuem meios eficientes tanto para a transmissão horizontal como vertical e são claramente muito bem-sucedidos, sendo prevalentes em todos os principais grupos de fungos como Chytridiomycota,

Zigomycota, Ascomycota e Basidiomycota. As estimativas da incidência de micovírus sugerem que 30-80% das espécies de fungos podem estar infectadas (Ghabrial & Suzuki, 2009; Pearson et al. 2009; Ghabrial et al., 2015). Podem localizar-se no citoplasma ou na mitocôndria do hospedeiro de modo latente (Pearson et al., 2009), com efeitos adversos como hipo e hipervirulência (Vainio et al. 2018) e efeitos mutualísticos (Márquez et al., 2007).

Na taxonomia viral, independentemente do hospedeiro, são consideradas como critérios para identificação: composição molecular do genoma, a estrutura do capsídeo e de envelope (quando presente), morfologia e o tamanho da partícula, gama de hospedeiros, patogenicidade e porcentagem de similaridade entre as sequências genômicas (Picarelli et al., 2017; Lefkowitz et al., 2018). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) atualmente os micovírus são classificados em 52 gêneros distribuídos em 16 famílias (Tabela 1). Os micovírus podem se apresentar com diferentes tipos de genomas como os de RNA de fita dupla (dsRNA), RNA fita simples senso positivo [(+)ssRNA], RNA fita simples senso negativo [(-)ssRNA] e DNA fita simples (ssDNA) (Ghabrial et al. 2015).

Tabela 1. Classificação atual dos micovírus

Ácido nucleico	Organização do genoma	Família	Gênero	Espécie
	Vírions isométricos de 40 nm 1 segmento 4–6.7 kbp	<i>Totiviridae</i>	<i>Giardivirus</i> , <i>Leishmaniavirus</i> , <i>Totivirus</i> , <i>Trichomonasvirus</i> , <i>Victorivirus</i>	28
	Vírions isométricos de 40 nm 2 segmentos 1.4–2.4 kbp	<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphapartitivirus</i> , <i>Betapartitivirus</i> , <i>Cryspovirus</i> , <i>Deltapartitivirus</i> , <i>Gammapartitivirus</i>	60
dsRNA	Vírions isométricos de 60–80 nm 10–12 segmentos 0.7–5 kbp	<i>Reoviridae</i>	<u>Subfamily:</u> <u>Sedoreovirinae:</u> <i>Cardoreovirus</i> , <i>Mimoreovirus</i> , <i>Orbivirus</i> , <i>Phytoreovirus</i> , <i>Rotavirus</i> , <i>Seadornavirus</i> <u>Subfamily:</u> <u>Spinareovirinae:</u> <i>Aquareovirus</i> , <i>Coltivirus</i> , <i>Cypovirus</i> , <i>Dinovernavirus</i> , <i>Fijivirus</i> , <i>Idnoreovirus</i> ,	97

			<i>Mycroevirus,</i> <i>Orthoreovirus, Oryzavirus</i>	
	Vírions isométricos de 40 nm 2 segmentos 2.4–3.6 kbp	<i>Crysoviridae</i>	<i>Alphachrysovirus,</i> <i>Betachrysovirus</i>	25
	Vesículas lipídicas 1 segmento 14–17.6 kbp	<i>Endornaviridae</i>	<i>Alphaendornavirus,</i> <i>Betaendornavirus</i>	31
	Vírions isométricos de 48 nm 4 segmentos 3.7–4.9 kbp	<i>Quadriviridae</i>	<i>Quadrivirus</i>	1
	Vírions isométricos de 50 nm 2 segmentos 7–9 kbp	<i>Megabirnaviridae</i>	<i>Megabirnavirus</i>	1
	Vírions isométricos de 35 nm 2 segmentos 5.9–6.2 kbp	-	<i>Botybirnavirus</i>	1
	Vírions filamentosos 470-800 × 12–13 nm 1 segmento 5.9–9 kbp	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus, Botrexvirus,</i> <i>Lolavirus, Mandarivirus,</i> <i>Platypuvirus, Potexvirus,</i> <i>Sclerodarnavirus</i>	56
	Vesículas lipídicas de 80 × 50 nm 1 segmento 9–13 kb	<i>Hypoviridae</i>	<i>Hypovirus</i>	4
(+) ssRNA	Unencapsidated 1 segment 1.7–2.9 kb	<i>Narnaviridae</i>	<i>Narnavirus, Mitovirus</i>	2
	Vírions baciliformes de 50 × 20 nm 1 segmento 4 kb	<i>Barnaviridae</i>	<i>Barnavirus</i>	1
	Vírions filamentosos de 720 × 12–13 nm 1 segmento 6.8 kb	<i>Gammaflexiviridae</i>	<i>Mycoflexivirus</i>	1
Reverse- transcribing RNA viruses	Vírions ovoides 1 segmento 4–10 kb	<i>Metaviridae</i>	<i>Errantivirus, Metavirus</i>	31
	Vírions ovoides 1 segment 5–9 kb	<i>Pseudoviridae</i>	<i>Hemivirus, Pseudovirus,</i> <i>Sirevirus</i>	34
(-)ssRNA	Vírions filamentosos de 300-400 × 20 nm 1 segmento 10 kb	<i>Mymonaviridae</i>	<i>Hubramonavirus,</i> <i>Sclerotimonavirus</i>	9
(-)ssDNA	Vírions isométricos de 20–22 nm	<i>Genomoviridae</i>	<i>Gemycircularvirus</i>	1

1 molécula circular 2.2
kb

Fonte: ICTV (2020)

Formas de transmissão das micoviroses

Os micovírus podem ser transmitidos vertical ou horizontalmente entre os fungos (Wang et al., 2016). A transmissão vertical (da hifa para esporos sexuais ou assexuados) é a forma mais comum de disseminação de micovírus. Foi relatada a taxa de transmissão do vírus de 100% via produção de esporos assexuados, o que dificulta o isolamento de cepas isogênicas sem micovírus (“cura”) (Leqoc et al., 1979; Picarelli et al., 2017). A transmissão via esporos sexuais é relativamente rara (Pearson et al., 2009). O processo de cura já foi observado em *Trichoderma* (Liu et al., 2019), *Ceratobasidium* (Cao et al., 2019) e *Aspergillus* (Öskan & Coutts, 2015) submetidos a tratamentos com diferentes substâncias químicas suplementadas no meio de cultura. A transmissão horizontal por meio de anastomose hifal ocorre entre indivíduos fúngicos vegetativamente compatíveis. O processo de troca citoplasmática transfere micovírus para células hifais não infectadas (Wang et al., 2017).

A incompatibilidade vegetativa caracteriza-se por uma compartimentação e lise das células envolvidas e tem sido comparada à reação de hipersensibilidade em planta (Paoletti & Saupe 2009). Caracteriza-se como a principal barreira à transmissão horizontal de micovírus. Quando hifas de duas cepas de fungos incompatíveis se fundem e não ocorre o reconhecimento, é desencadeado o processo de morte celular programada. A troca citoplasmática falha, resultando na impossibilidade de transmissão horizontal do micovírus (Wang et al., 2017).

Embora compartilhem algumas características com vírus de animais e vegetais, os micovírus possuem características únicas, como: (1) a maioria necessita de uma via extracelular para infecção; (2) micovírus são transmitidos entre células apenas através da divisão celular, esporulação e fusão celular; e (3) aparentemente não possuem uma proteína de movimento, que é essencial para o ciclo de vida de vírus de animais e plantas (Son et al., 2015).

Interação micovírus-hospedeiro

Os micovírus, ao interagirem com o hospedeiro, geralmente não causam sintomas aparentes, sendo, portanto, considerados latentes na maioria dos fungos (Pearson et al., 2009). No entanto, a infecção por micovírus pode alterar a taxa de crescimento micelial, além de outras alterações. Van

Diepeningen et al. (2006) relataram diferenças marcantes no crescimento, produção de esporos e capacidade competitiva entre cepas isogênicas de *Aspergillus* infectadas e não infectadas.

Milgroom & Hillman (2011) consideram que a barreira à transmissão horizontal, caracterizada pela incompatibilidade vegetativa entre indivíduos e a dependência da transmissão vertical contribuíram, ao longo do tempo, para que os micovírus evoluíssem para serem benéficos não induzindo alteração, positiva ou negativa, ao fungo. Ainda assim, esses autores acreditam que as alterações, ainda que sutis, observadas em características como taxa de crescimento, esporulação e virulência, que interferem na dinâmica do vírus e de seu hospedeiro, e o fato de os micovírus não ocorrerem em alta frequência, colocam em dúvida se eles são de fato tão benignos quanto possam parecer. Além disso, alterações no ambiente e na fisiologia do fungo e a ocorrência de infecções mistas podem interferir nas manifestações de virulência e até mesmo na transmissão dos micovírus entre seus hospedeiros (Pearson et al., 2009; Picarelli et al., 2017).

Curiosamente, a maioria dos sintomas associados a infecções por micovírus pode ser útil para seus hospedeiros e pode afetar a interação entre fungos e outros organismos. Assim, a presença de micovírus em fungos endofíticos está associada à adaptação de plantas a condições extremas, incluindo o aumento da temperatura. Por exemplo, a resistência térmica do capim *Dichanthelium lanuginosum* que cresce no solo geotérmico é causada pela presença do micovírus da tolerância térmica no endofítico *Curvularia* (Márquez et al., 2007). Além disso, a infecção por micovírus pode afetar a adaptação de endófitos a hospedeiros de plantas. Assim, fungos entomopatogênicos, cujo ciclo de vida inclui a fase endofítica natural na grama selvagem *Festuca rubra* e *Holcus lanatus*, demonstraram adquirir a capacidade de colonizar outras plantas após serem infectadas com micovírus (Asensio et al., 2013).

As interações mais estudadas são aquelas em que os micovírus induzem hipovirulência, particularmente aquelas envolvendo o gênero *Hypovirus*, por representarem uma alternativa efetiva ao controle convencional de fungos fitopatogênicos (Milgroom & Hillman, 2011). Na hipovirulência mediada por micovírus, a capacidade do fungo fitopatogênico hospedeiro causar doença é reduzida ou completamente perdida como consequência da infecção viral (Yu et al., 2010; Picarelli et al., 2017).

O advento de extenso estudo relacionado à infecção por micovírus no fungo filamentoso *Cryphonectria parasitica* forneceu uma forte base para futuras pesquisas em hipovirulência fúngica ou debilitação em outras espécies de fungos (Ghabrial & Suzuki, 2009; Eusebio-Cope et al., 2015). A interação do micovírus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) com seu hospedeiro

fúngico *C. parasitica* é bem estudada e tem sido modelo para diversos estudos com outros fungos patogênicos como *Fusarium graminearum* (Chu et al., 2002), *Sclerotinia homoeocarpa* (Zhou & Boland, 1997), *Botrytis cinerea* (Wu et al., 2010) e *Aspergillus* spp. (Kotta-Loizou & Coutts, 2017).

O cancro da castanheira é uma doença causada pelo fungo *C. parasitica*. Este fungo ascomiceto infecta a casca e o câmbio da castanheira através de feridas e induz cancrios da casca, que podem levar à morte das partes distais após o anelamento dos ramos ou o tronco de uma árvore inteira (Heiniger & Rigling, 1994). Duas décadas após os primeiros registros da doença, foi observado que algumas árvores infectadas começaram a se recuperar da doença, como indicado pela ocorrência de cancrios superficiais não-letais na superfície da casca. Esta recuperação espontânea foi encontrada como resultado do surgimento de um vírus fúngico que parasitava os indivíduos da população de *C. parasitica* (Choi & Nuss, 1992; Robin & Heiniger, 2001).

O CHV1 infecta o hospedeiro fúngico e reduz significativamente sua virulência fenômeno chamado hipovirulência. Essa infecção também inibe a reprodução sexual do fungo e reduz sua pigmentação e esporulação, dando-lhe uma aparência branca típica em cultura. A descoberta de que a hipovirulência era transmissível forneceu a base para o controle biológico da doença na castanheira (CHEN & NUSS, 1999; NUSS, 2005). Na Europa, cepas de *C. parasitica* portadores de CHV1 foram utilizados comercialmente com sucesso no controle da doença (Nuss, 2005).

O interesse em micovírus tem aumentado nas últimas décadas, e uma aceleração considerável de seu estudo tem sido observada. Em primeiro lugar, isso está associado ao fato de que muitos micovírus causam alterações fenotípicas em seus fungos hospedeiros e essa característica pode ser valiosa tanto para pesquisa fundamental quanto para uso prático. O interesse nesses patógenos também é estimulado pelas conquistas técnicas no campo da biologia molecular dos micovírus. Ao mesmo tempo, os vírus dos fungos são utilizados com sucesso como ferramentas para estudar os mecanismos de interação e controle do hospedeiro (Kirichenko et al., 2018).

Sob a perspectiva agrícola, os micovírus podem contribuir para agricultura sustentável como agentes de controle biológico. Atualmente, o controle de fungos patogênicos de plantas é uma tarefa difícil devido à falta de estratégias adequadas de controle da doença. Além dos riscos para a saúde e meio ambiente, o uso de fungicidas é muitas vezes oneroso ao produtor. A necessidade de novas medidas de biocontrole para combater doenças fúngicas não pode ser exagerada. Além disso, o estudo das interações vírus/hospedeiro é uma área importante da virologia moderna, na

qual os micovírus podem ser usados como ferramentas para explorar a fisiologia de seus hospedeiros fúngicos (Ghabrial & Suzuki, 2009).

Incidência de micovírus em *Colletotrichum* spp.

As informações sobre os micovírus isolados de *Colletotrichum* spp. encontram-se sumarizadas na tabela 2. Serão abordados primeiramente os trabalhos em que os micovírus ainda não foram classificados dentre as principais famílias atualmente atribuídas.

Tabela 2 – Micovírus isolados de *Colletotrichum* spp.

Hospedeiro	Micovírus	Ácido nucleico	Família	Tamanho do genoma	Referência
<i>C. lindemuthianum</i>	-	dsRNA	-	-	Rawlinson et al. (1975)
<i>C. gloeosporioides</i>	-	dsRNA	-	-	Dale et al. (1988)
<i>C. acutatum</i> Coll-365	-	dsRNA	-	RNA1 - 1.3 kb RNA2 - 2.5 kb	Liao et al. (2012)
<i>C. acutatum</i> Coll-524	-	dsRNA	-	RNA1 - 1.4 kb RNA2 - 1.7 kb	Liao et al. (2012)
<i>C. gloeosporioides</i>	-	dsRNA	-	-	Figueirêdo et al. (2012)
<i>C. gloeosporioides</i>	-	dsRNA	-	3 kb	Lima et al. (2012)
<i>C. acutatum</i>	Colletotrichum acutatum partitivirus 1 (CaPV1)	dsRNA	<i>Partitiviridae</i>	-	Zhong et al. (2014)
<i>Colletotrichum</i> sp.	-	dsRNA	-	-	Bezerra (2015)
<i>C. truncatum</i>	Colletotrichum truncatum partitivirus 1 RNA1 (CtParV1)	dsRNA	<i>Partitiviridae</i>	RNA1 - 1.8 kb RNA2 - 1.5 kb	Marzano et al. (2016)
<i>Colletotrichum</i> sp. CNPUV 378	-	dsRNA	<i>Partitiviridae</i>	RNA1 - 1.5 kb RNA2 - 2.5 kb	Rosseto et al. (2016)
<i>C. gloeosporioides</i>	Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1 (CgCV1)	dsRNA	<i>Chrysoviridae</i>	RNA1 - 3.3 kb RNA2 - 2.8 kb RNA3 - 2.6 kb	Zhong et al. (2016)
<i>C. higginsianum</i>	Colletotrichum higginsianum non-segmented dsRNA virus 1 (ChNRV1)	dsRNA	<i>Partitiviridae</i>	-	Campo et al. (2016), Olivé & Campo (2020)
<i>C. camelliae</i>	Colletotrichum camelliae filamentous virus 1 (CcFV-1)	dsRNA	-	RNA1 - 2.4 kb RNA2 - 2.2 kb RNA3 - 2.0 kb RNA4 - 1.2 kb	Jia et al. (2017)

				RNA5 - 1.1 kb RNA6 - 1.0 kb RNA7 - 1,0 kb RNA8 - 0.9 kb	
<i>C. fructicola</i>	Colletotrichum fructicola chrysovirus 1 (CfCV1)	dsRNA	<i>Chrysoviridae</i>	RNA1 - 3.6 kb RNA2 - 2.8 kb RNA3 - 2.6 kb RNA4 - 2.4 kb RNA5 - 1.7 kb RNA6 - 1.5 kb RNA7 - 1.2 kb	Zhai et al. (2018)
<i>C. gloeosporioides</i>	Colletotrichum gloeosporioides RNA virus 1 (CgRV1)	dsRNA	<i>Partitiviridae</i>	2.9 kb	Wang et al. (2019)
<i>C. gloeosporioides</i>	Colletotrichum gloeosporioides ourmia-like virus 1 (CgOLV1)	(+)ssRNA	-	2.51 kb	Guo et al. (2019)

Fonte: elaborada pela autora

O primeiro registro de micovírus em *Colletotrichum* spp. ocorreu em 1975 nos trabalhos de Rawlinson e colaboradores (Rawlinson et al. 1975). Foram analisados 35 isolados patogênicos de *C. lindemuthianum* obtidos de feijão com o objetivo de verificar se a presença do vírus era responsável pela virulência do patógeno. Na época, a comparação de características como morfologia, taxa de crescimento, produção e viabilidade dos conídios e patogenicidade foi feita através da observação de isolados com e sem o vírus. Dentre os 35 isolados, apenas 5 eram portadores de micovírus e todos com genoma de dsRNA. Não foram visualizadas alterações significativas quanto à morfologia, taxa de crescimento, produção de conídios e patogenicidade nos fungos que continham o vírus como observado nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Características das colônias dos isolados com e sem vírus em meio de Mathur

Isolado (origem)*	Cor da colônia	Micélio aéreo	Esporo	Crescimento micelial (mm·dia ⁻¹)
Com vírus				
α 10 (B)	Rosa hialino	-	+++	4.5±0.2
α 229 (W)	Amarelo claro	-	+++	4.1±0.2
α 4 (H)	Amarelo escuro	++	++	5.4±0.04
α 5 (W)	Amarelo escuro	-	+	5.2±0.4
Sem vírus				
α 9 (H)	Marrom escuro	++	+++	4.2±0.1
α 1 (H)	Marrom escuro	+	++	4.7±0.09
α 1 (B)	Rosa hialino	-	++	3.8±0.06
α 2 (H)	Cinza	++	+	3.9±0.08

*B = Bannerot, INRA, Versailles; W = Wharton, Unilever Research Laboratory, Bedford; H = Hubbeling, IPO, Wageningen. Tabela adaptada de Rawlinson et al. (1975)

Tabela 4 – Patogenicidade em hospedeiros suscetíveis com isolados portadores e livres de micovírus

Com vírus				Sem vírus				Controle
α 10 (B)	α 229 (W)	α 4 (H)	α 5 (W)	α 9 (H)	α 1 (H)	α 1 (B)	α 2 (H)	5.0
0.83	0.32	0.66	0.78	0.96	0.29	0.30	1.14	

Pontuações médias variando de 0 = imunidade a 5 = infecção generalizada com plantas mortas. Tabela adaptada de Rawlinson et al. (1975)

A presença de micovírus também tem sido relatada como um critério afim de avaliar semelhanças existentes entre raças de um mesmo complexo de patógenos. Dale et al. (1988) verificaram a ocorrência de antracnose em *Stylosanthes guyanensis* causada por dois grupos de patógenos denominados Tipo A e Tipo B, ambos pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*. A presença de partículas virais de dsRNA foi confirmada após tratamento das amostras com DNase e S1 Nuclease. Foi observado que os isolados do Tipo A apresentaram duas bandas no gel com diferentes pesos moleculares. Já os isolados do Tipo B apresentaram uma variedade maior em número de bandas visualizadas, entretanto, todas ausentes nos isolados do Tipo A (Tabela 5). Os autores não puderam afirmar se a presença dessas partículas tinha alguma influência sobre a virulência dos isolados, como observa-se nos vírus encontrados em *C. parasitica*, porém sugeriram que os dois tipos de isolados não eram geneticamente compatíveis. Sabe-se que a incompatibilidade vegetativa é um mecanismo que limita a transferência dessas partículas virais. Wang et al. (2017) afirmam que quando hifas de duas cepas de fungos incompatíveis se fundem e não ocorre o reconhecimento, é desencadeado o processo de morte celular programada. A troca citoplasmática falha, resultando na impossibilidade de transmissão horizontal do micovírus.

Tabela 5 – Presença de bandas de dsRNA em isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de *Stylosanthes*

Banda	$M_r (\times 10^{-6})$	Isolados Tipo B							Isolado Tipo A
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	
a	2.0	-	-	+++	-	-	-	+	-
b	1.8	-	-	-	-	-	-	-	+
c	1.6	-	-	-	-	-	-	-	++
d	1.5	++	+	-	+	+	++	+	-
e	1.4	++	+	-	+	++	++	+	-
f	1.1	+++	++	+	++	++	++	++	-
g	0.8	+++	+++	+	++	++	+++	++	-
h	0.5	+++	++	+	++	++	+	++	-
i	0.3	+	-	-	-	-	+	-	-
j	0.2	+	-	-	-	-	-	-	-

Todos os isolados do Tipo A tinham o mesmo padrão de dsRNA. (+) os símbolos indicam intensidades de banda de dsRNA relativas dentro de cada amostra. Tabela adaptada de Dale et al. (1988)

Poucas são as informações sobre a real influência da infecção viral sobre a fisiologia dos fungos. Um dos fatores que interferem na obtenção desses dados é que para avaliar o impacto da

infecção é necessário obter uma linhagem isogênica livre do vírus. Após esse processo de “cura” do fungo, tanto a linhagem portadora do vírus quanto a sua linhagem isogênica curada são submetidas a diferentes ensaios para se fazer a comparação. Para a obtenção da linhagem livre do vírus podem ser utilizadas diferentes metodologias como a incorporação de determinadas substâncias ao meio de cultura - cicloheximida (Campo et al. 2016) ou ribavirina (Liu et al. 2019) que irão impedir a replicação viral. No entanto, o processo nem sempre é fácil, pois é preciso encontrar a dose correta da substância para que ela não interfira no metabolismo fúngico (Lawana et al. 2014). Outro método utilizado é a realização de repiques sucessivos ou a utilização de conídios ou esporos para aqueles fungos que não realizam a transmissão vertical das partículas virais.

Jia et al. (2017) foram os primeiros a registrar um micovírus de partículas filamentosas em *Colletotrichum camelliae*. Esse fungo é causador de antracnose em *Camellia sinensis* na China. Apesar de não conseguirem classificar o vírus em uma família definida, atribuíram o nome *Colletotrichum camelliae* filamentous virus 1 (CcFV-1). Para obter linhagens isogênicas livres das partículas virais, eles cultivaram o fungo em Potato Dextrose Agar (PDA) a 25 °C, sob fotoperíodo de 24 horas por um mês. Em seguida, as linhagens obtidas foram observadas quanto à taxa de crescimento do micélio, morfologia e capacidade de causar lesões nas folhas de *C. sinensis*. Foi observado que havia diferenças entre as colônias do patógeno portador de CcFV-1 e suas respectivas linhagens curadas que passaram a exibir anéis de hifas, redução do pigmento negro da colônia e taxa de crescimento micelial aumentada. Em relação à patogenicidade, ao contrário do que a maior parte dos estudos demonstra, a presença de CcFV-1 não causou o fenômeno de hipovirulência. Pelo contrário, os estudos demonstraram que mesmo quando o fungo foi curado do vírus, ele ainda foi capaz de causar os sintomas característicos da doença. Além de interferir com o crescimento micelial, anormalidades no conteúdo celular foram encontradas como a presença de vesículas virais e a redução no número de corpos de Woronin. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar de que forma os micovírus interferem no metabolismo fúngico a ponto de causar mudanças no fenótipo do hospedeiro. A primeira hipótese é que o vírus interfere na expressão de genes envolvidos na proliferação celular. Clancey et al. (2020) perceberam que a infecção pelo micovírus em *Malassezia sympodialis* resultava em menor expressão de genes relacionados aos processos metabólicos tais como a redução de oxidação, transporte transmembrana, ciclo celular e divisão celular. Outra hipótese é que a influência sobre o fenótipo do fungo está diretamente ligada à quantidade de partículas virais. Okada et al. (2018) estudando

as consequências da infecção por *Alternaria alternata* chrysovirus 1 (AaCV1) em *Alternaria alternata* associaram os danos celulares às altas titulações dessas partículas virais. Os isolados que exibiam crescimento micelial prejudicado e pigmentação desregulada continham maiores quantidades de partículas. Eles postularam originalmente que os isolados com o fenótipo normal estavam livres do vírus. No entanto, a triagem subsequente por RT-PCR demonstrou a presença contínua de uma molécula de dsRNA, indicando que esses isolados estavam infectados, porém correspondiam a linhagens com baixo título viral.

Liao et al. (2012) analisando três isolados de *C. acutatum* patógenos de *Capsicum* sp. perceberam que o fungo que abrigava dois diferentes vírus, apresentavam alta atividade da enzima lacase, enzima importante no papel de colonização do patógeno. No trabalho em questão, a alta taxa de colonização atribuída a este fungo foi associada ao genótipo das plantas testadas e não necessariamente à presença dos vírus no fungo em estudo.

Lima et al. (2012) em um estudo para identificação morfológica e molecular de 39 fungos classificados como *Colletotrichum* sp. verificaram a presença de dsRNA em três deles. Esse foi o primeiro registro de micovírus em *C. gloeosporioides*. No mesmo ano, Figueirêdo et al. (2012) em seus estudos com *C. gloeosporioides* causador de antracnose em cajueiro, identificou a presença de bandas características de dsRNA. Apesar de estar em pequena quantidade, a microscopia de transmissão revelou partículas isométricas características de vírus pertencentes às famílias *Chrysoviridae*, *Partitiviridae* e *Totiviridae*.

Guo et al. (2019) isolaram um novo micovírus de *C. gloeosporioides*, patógeno do algodão na China. Este vírus com genoma de 2.516 nucleotídeos foi denominado *Colletotrichum gloeosporioides ourmia-like virus 1* (CgOLV1). Com base na análise filogenética ele foi colocado no clado de micovírus cujos membros estão relacionados geneticamente ao gênero *Ourmiavirus*.

Família Chrysoviridae

Essa família é composta por vírus isométricos, sem envelope, com genomas de dsRNA segmentados e lineares. Possuem de 3-7 segmentos genômicos, cada um dos quais é encapsulado individualmente. Os crisovírus infectam fungos, plantas e possivelmente insetos e podem causar hipovirulência em seus hospedeiros fúngicos. Os crisovírus não têm vetores conhecidos e não possuem uma fase extracelular para seu ciclo de replicação. Eles são transmitidos por vias intracelulares dentro de um indivíduo durante o crescimento de hifas, em esporos assexuados ou sexuais, ou entre indivíduos por meio de anastomose de hifas (Kotta-Loizou et al., 2020).

Zhai et al. (2018) caracterizaram o vírus presente em *Colletotrichum fructicola* bem como seus efeitos na taxa de crescimento, morfologia da colônia e virulência em frutos destacados de pêra (*Pyrus bretschneideri*). O vírus foi denominado de *Colletotrichum fructicola* chrysovirus 1 (CfCV1) e trata-se de um vírus hepta-segmentado de dsRNA. Os resultados demonstraram que a presença do vírus diminuía a taxa de crescimento e os sintomas no fruto (Figura 1), mas não alterava significativamente a morfologia da colônia. A transferência vertical (esporos sexuais) e horizontal (anastomose de hifas) do vírus também foi confirmada. A taxa de transferência do micovírus através da reprodução sexuada e assexuada pode sofrer variação de um hospedeiro para outro e entre famílias virais. E para alguns autores essa tem sido a razão para que algumas estratégias como o controle biológico de algumas doenças fúngicas não seja efetivo (Hillman and Suzuki, 2004; García-Pedrajas et al. 2019). Diferente do que foi observado por Zhai et al. (2018) em *C. fructicola*, Hillman and Suzuki (2004) não encontraram evidências de micovírus em ascósporos de *C. parasitica*. Outro fato interessante é que a co-infecção por diferentes micovírus em um mesmo hospedeiro impacta significativamente na eficiência da transmissão vertical havendo declínio após subseqüentes culturas (Aulia et al. 2019). Lee et al. (2014) analisaram as taxas de transmissão para conídios de quatro vírus isolados de *Fusarium graminearum* PH1 de diferentes famílias virais. O trabalho revelou que dois micovírus que induziam hipovirulência e alterações no fenótipo do hospedeiro foram transmitidos de forma mais eficiente do que aqueles que causaram infecções assintomáticas. Para os autores, essa alta transmissibilidade sugere que os micovírus hipovirulentos são mais bem adaptados a *F. graminearum* PH1 do que os micovírus não-hipovirulentos.

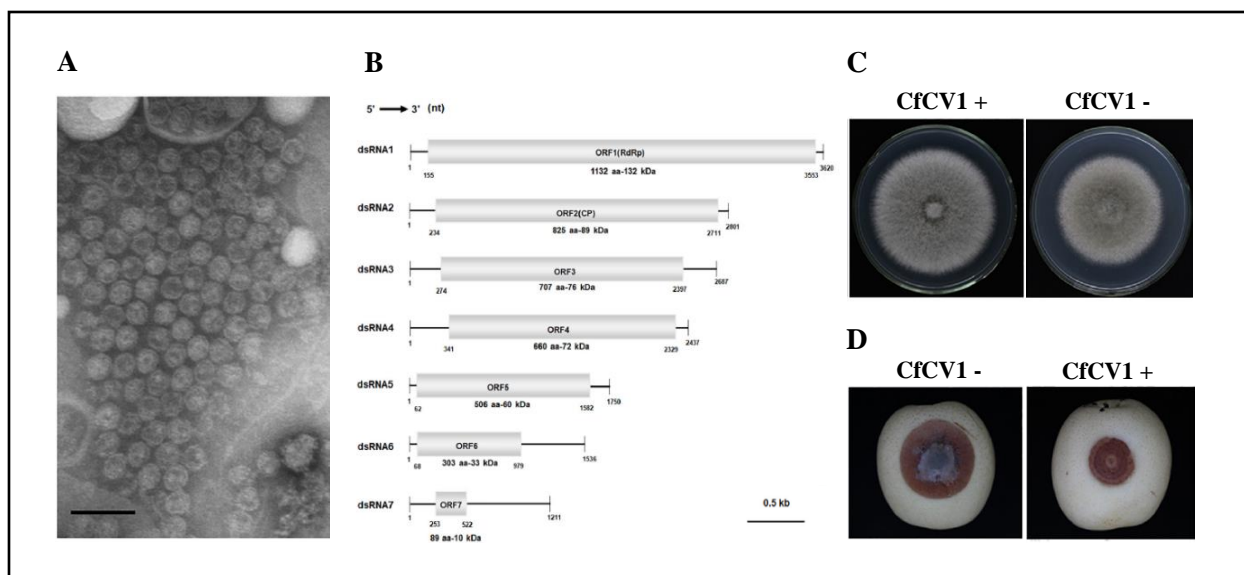


Figura 1. A Partículas semelhantes a vírus (VLP's) em microscopia eletrônica de transmissão. B Organização genômica de dsRNA1-7 de CfCV1. C Morfologia da colônia em meio PDA (25 °C, 4 dias). D Frutos de pera inoculadas com as linhagens testadas e fotografadas 6 dias após a inoculação. CfCV1 +: com vírus; CfCV1 -: sem vírus. Fonte da imagem: Zhai et al. (2018)

A partir de *C. gloeosporioides*, patógeno de *Citrus* sp. isolado de frutos doentes, Zhong et al. (2016) isolaram um novo vírus pertencente à família Chrysoviridae. Ele foi denominado de *Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1* (CgCV1) e ao contrário de CfCV1, seu genoma apresenta apenas três segmentos. Nesse trabalho, a influência da presença de CgCV1 na fisiologia de *C. gloeosporioides* não foi avaliada.

Família Partitiviridae

Essa família é composta por vírus pequenos, isométricos, sem envelope com genomas de RNA bissegmentado de fita dupla (ds) de 3-4,8 kbp. Os dois segmentos do genoma são encapsulados individualmente. A família possui cinco gêneros, com hospedeiros característicos para membros de cada gênero: plantas ou fungos para os gêneros *Alphapartitivirus* e *Betapartitivirus*, fungos para o gênero *Gammapartitivirus*, plantas para o gênero *Deltapartitivirus* e protozoários para o gênero *Cryspovirus*. Os partitivírus são transmitidos intracelularmente através de sementes (plantas), oocistos (protozoários) ou anastomose de hifas, divisão celular e esporogênese (fungos). Não há vetores naturais conhecidos (Vainio et al. 2018). Dentro dessa família se encontra a maior parte dos micovírus já caracterizados para *Colletotrichum*.

Rosseto et al. (2016) após realizarem um estudo com 26 espécies de *Colletotrichum* isolados de diferentes hospedeiros verificaram que somente um deles apresentava sinais da presença de micovírus. Após o tratamento com as enzimas DNase e nuclease foi confirmado que as bandas visualizadas no gel pertenciam a um micovírus. As características estruturais observadas na microscopia de transmissão sugeriram que ele pertencia a família *Partitiviridae*.

Marzano et al. (2016) isolaram de *Colletotrichum truncatum* dois micovírus pertencentes a família *Partitiviridae*. Eles foram denominados de *Colletotrichum partitivirus 1 RNA1* (Ct-ParV1) e *Colletotrichum partitivirus 1 RNA2* (Ct-ParV2). Esse fungo causa antracnose em diversas culturas especialmente na soja onde ele é transmitido por sementes contaminadas (Goulart, 2009).

Zhong et al. (2014) analisando o fungo *Colletotrichum acutatum* isolado de lesões de antracnose em pimenta verificaram a presença do vírus *Colletotrichum acutatum partitivirus 1* (CaPV1). Foi observado que a presença do vírus no hospedeiro aumentava a produção de conídios.

Esse dado foi constatado quando o fungo foi comparado com sua linhagem isogênica curada (Figura 2).

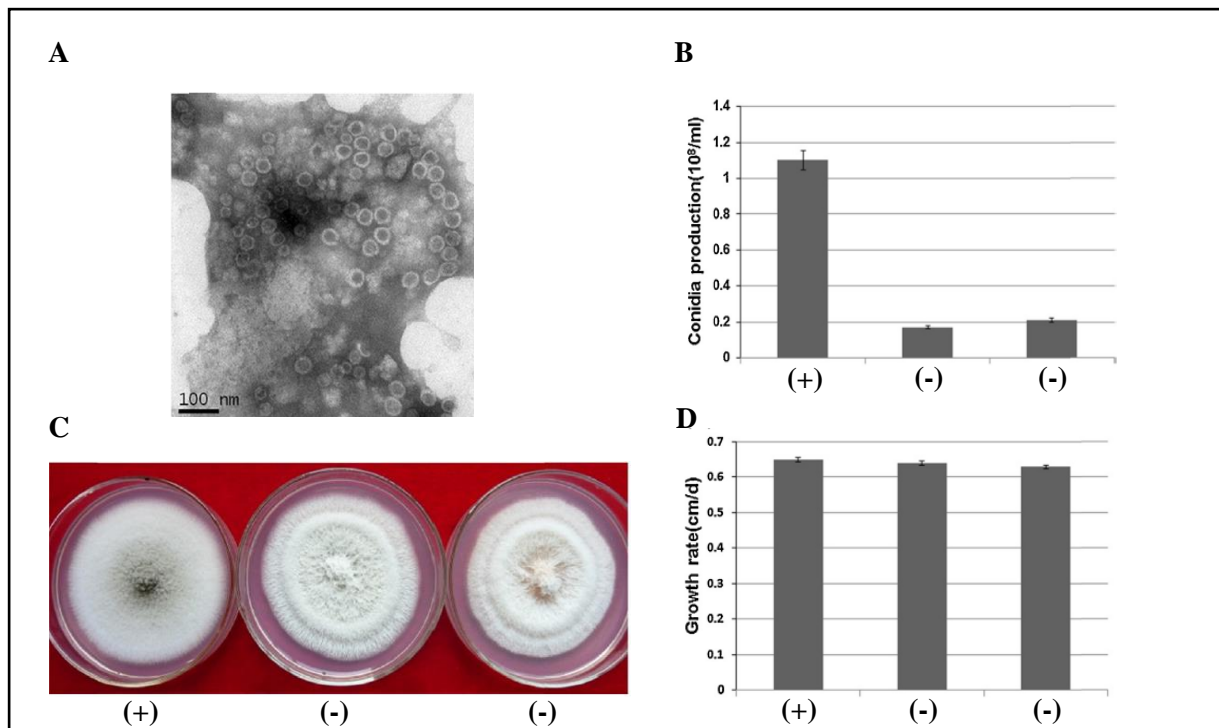


Figura 2. A Partículas virais em microscopia eletrônica de transmissão em *C. acutatum* HNZZJ001. B Produção de conídios entre HNZZJ001 (com vírus), HNZZJ001-E3 (sem vírus) e HNZZJ001-E4 (sem vírus). C Morfologia da colônia de HNZZJ00, HNZZJ001-E3 e HNZZJ001-E4 após 10 dias de crescimento em PDA. D Taxa de crescimento micelial de HNZZJ001, HNZZJ001-E3 e HNZZJ001-E4. (+) com vírus; (-) sem vírus. Fonte: Zhong et al. (2014).

Campo, Gilbert & Carrington (2016) ao analisarem o fenômeno de silenciamento de RNA em *Colletotrichum higginsianum* verificaram que, quando este mecanismo apresentava falhas, o micovírus causava diminuição na quantidade de conídios formados e alteração no tamanho dos mesmos. Em outras palavras, *C. higginsianum* emprega o silenciamento de RNA como um mecanismo antiviral para suprimir o vírus e seus efeitos debilitantes. O silenciamento de RNA é um mecanismo de defesa antiviral encontrado em fungos, plantas e em animais. Em contrapartida, a supressão desse mecanismo é uma das estratégias empregadas pelos vírus para neutralizar o arsenal antiviral do hospedeiro (Aulia et al. 2021). A capacidade dos micovírus em suprimir as defesas do fungo pode garantir o pleno estabelecimento da infecção e possibilidade de transmissão intra e interespecificamente. Apesar de ser um mecanismo importante na interação entre vírus-hospedeiro, apenas um número limitado de supressores de silenciamento de RNA foram identificados em micovírus até o momento. Dentre eles incluem-se a proteína p29 de CHV1,

proteína p.32 de *Rosellinia necatrix mycoreovirus 3* (RnMyRV3) e proteína pORF2 de *Fusarium graminearum virus 1* (FgV1) (Seger et al., 2006; Yaegashi et al., 2013; Yu et al., 2020).

A cepa IMI349063A de *C. higginsianum* é naturalmente infectada com um vírus dsRNA, denominado *Colletotrichum higginsianum non-segmented dsRNA vírus 1* (ChNRV1). Olivé & Campo (2020) investigaram o efeito biológico da presença de ChNRV1 em *C. higginsianum* fazendo comparação de isolados com e sem o vírus. Elas analisaram a produção e a morfologia de conídios, patogenicidade em *Arabidopsis*, crescimento vegetativo em meio de Marthur e PDA e crescimento vegetativo sob condições específicas de estresse osmótico e térmico. Após os ensaios foi possível verificar que ChNRV1 não interfere na conidiogênese, no entanto, pode induzir a formação de conídios mais estreitos (Figura 3B). Além disso, ChNRV1 aumentou ligeiramente a virulência de *C. higginsianum* (hipervirulência) ao infectar *Arabidopsis*. Observou-se que ChNRV1 não afetou o crescimento vegetativo de *C. higginsianum* sob estresse osmótico, porém, suprimiu o crescimento de fungos sob estresse térmico e esse efeito foi mais evidente no isolado portador de micovírus. Esses achados indicam que embora o ChNRV1 não tenha prejudicado o crescimento e a conidiogênese do fungo, ele pode causar hipervirulência no hospedeiro.

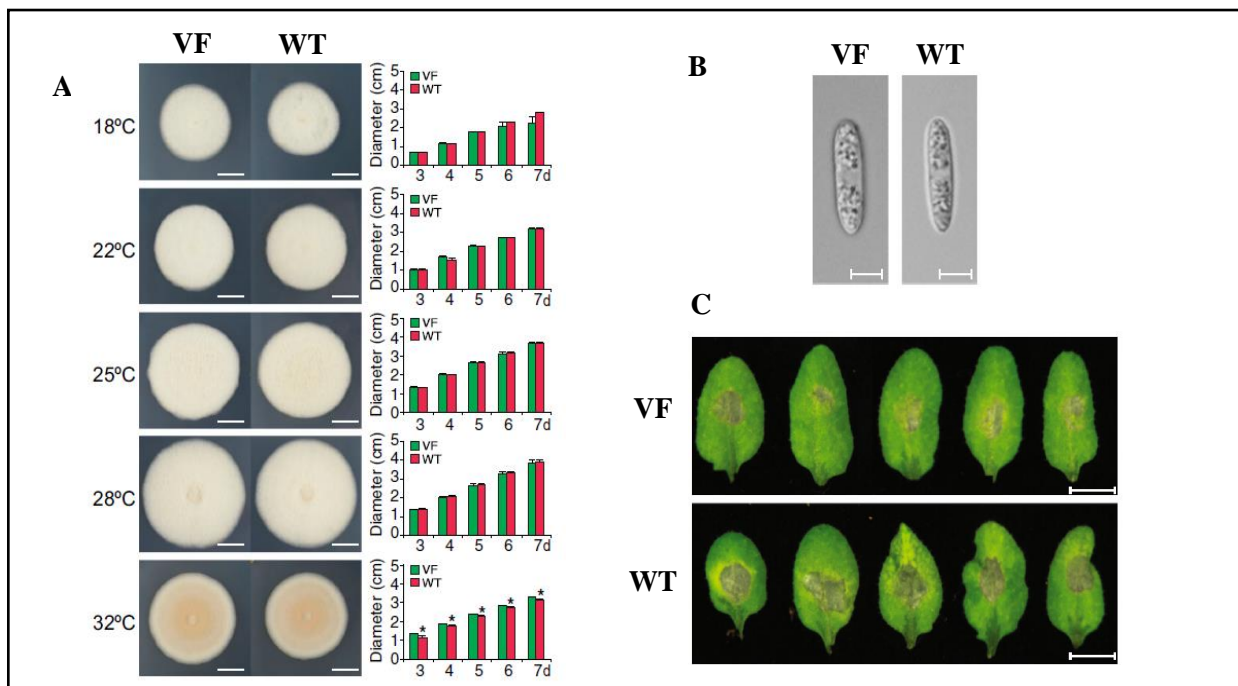


Figura 3. A Morfologia da colônia (painéis da esquerda) e taxa de crescimento (painéis da direita) dos isolados de *C. higginsianum* livre de vírus (VF) e infectado por ChNRV1 (WT) sob diferentes temperaturas. B Imagens confocais de conídios de *C. higginsianum* VF e WT. C Folhas de *Arabidopsis* infectadas com *C. higginsianum* VF e WT. Fonte: Olivé & Campo (2020)

A hipervirulência caracteriza-se pelo aumento da capacidade de um fitopatógeno em causar determinada doença. Normalmente, esse fenômeno é mais bem associado à esporulação, crescimento vegetativo e capacidade de causar lesões superiores quando se comparam à linhagem isogênica (Tran et al. 2019). Apesar da hipervirulência ser mais incomum, algumas características observadas em *C. higginsianum* também estavam presentes em outros fitopatógenos como *Phytophthora infestans*, *Nectria radicumicola*, *Aspergillus fumigatus* e *Leptosphaeria biglobosa* (Cai and Hillman 2013; Ahn and Lee, 2001; Öskan and Coutts, 2015; Shah et al., 2020). Estudos mais aprofundados precisam ser realizados para desvendar os mecanismos de interferência utilizados pelo micovírus que potencializam a patogenicidade de seus hospedeiros.

Whang et al. (2019) identificaram a presença de um micovírus em *C. gloeosporioides* patógeno de folhas de citrus, na China. Eles denominaram o vírus de *Colletotrichum gloeosporioides* RNA virus 1 (CgRV1) que possui um genoma de dsRNA de 2975 pb com dois segmentos. Nesse trabalho, a influência da presença de CgCV1 na fisiologia de *C. gloeosporioides* não foi avaliada.

Conclusões e perspectivas futuras

O impacto da infecção por micovírus em *Colletotrichum* spp. tem sido pouco explorado considerando a importância desse fungo como fitopatógeno em diferentes culturas ao redor do mundo.

O fenômeno da hipovirulência, extensamente estudado no fungo *C. parasitica*, é uma estratégia interessante quando se pensa em controle biológico de doenças fúngicas. A descoberta de que alguns micovírus podem causar o mesmo impacto sobre espécies patogênicas de *Colletotrichum* lança um convite à busca pela elucidação dos mecanismos moleculares dessa interação, especialmente os efeitos da infecção no hospedeiro fúngico. Um dos possíveis caminhos para a compreensão desse processo é o silenciamento de RNA. Esse mecanismo de defesa antiviral encontrado em fungos, plantas e animais pode ser suprimido como estratégia empregada pelos micovírus para neutralizar o arsenal antiviral do hospedeiro, como observado em *C. higginsianum*.

Como observado em outros fitopatógenos, os micovírus já caracterizados em *Colletotrichum* possuem genoma de dsRNA e pertencem à família Partitiviridae. No entanto, a maioria permanece ainda sem definição quanto à classificação taxonômica. Mais estudos são necessários para o estudo completo dos micovírus já detectados em espécies fitopatogênicas, visando o controle biológico de doenças causadas por elas. Além disso, é necessário compreender como esses fungos infectados

se estabelecem no ambiente e se essa infecção viral pode ser aproveitada sob o ponto de vista agrônomo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM 002/2018 - UNIVERSAL AMAZONAS). Agradecemos também à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e à Universidade do Estado do Amazonas pelo apoio técnico e consultoria.

Referências

- AHN, I.P. and LEE, Y.H., 2001. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol.14, n.4, pp.496–507. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.4.496>
- ANAGNOSTAKIS, S.L. and DAY, P.R., 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* vol.69, pp.1226–1229. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-1226>
- ASENSIO, N.H., MÁRQUEZ, S.S, ZABALGOGEAZCOA, I., 2013. Mycovirus effect on the endophytic establishment of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in tomato and bean plants. *Bio Control*, vol.58, pp.225–232. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9476-9>
- AULIA, A.; ANDIKA, I.B.; KONDO, H.; HILLMAN, B.I.; SUZUKI, N., 2019. A symptomless hypovirus, CHV4, facilitates stable infection of the chestnut blight fungus by a coinfecting reovirus likely through suppression of antiviral RNA silencing. *Virology*, vol.533, pp.99-107. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.05.004>
- AULIA, A.; HYODO, K.; HISANO, S.; KONDO, H.; HILLMAN, B.I; SUZUKI, N., 2021. Identification of an RNA silencing suppressor encoded by a symptomless fungal hypovirus, *Cryphonectria* Hypovirus 4. *Biology*, v.10, n.100, pp.1-16. <https://doi.org/10.3390/biology10020100>
- BAILEY, J.A. AND JEGER, M.J., 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International.
- BANKS, G.T., BUCK, K.W., CHAIN, E.B., HIMMELWEIT, F., MARKS, J.E., TYLER, J.M., 1968. Viruses in fungi and interferon stimulation. *Nature*, vol.218, pp.542-545. <https://doi.org/10.1038/218542a0>

- BEZERRA, T.E., 2015. Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) no controle biológico da antracnose. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 101p. Tese de doutorado em Biotecnologia.
- BUCK, K.W., 1988. From interferon induction to fungal viruses. *European Journal of Epidemiology*, vol.4, pp.395-399. <https://doi.org/10.1007/bf00146388>
- CAMPO, S., GILBERT, K.B., CARRINGTON, J.C., 2016. Small RNA-Based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *PLOS Pathogens*, vol.12, pp.1-36. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005640>
- CAO, C., LI, H., JONES, M.G.K., WYLIE, S.J., 2019. Challenges to elucidating how endornaviruses influence fungal hosts: Creating mycovirus-free isogenic fungal lines and testing them. *Journal of Virological Methods*, vol.274, pp.1-21. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113745>
- CAI, G. and HILLMAN, B.I., 2013. *Phytophthora* viruses. *Advances on Virus Research*, vol.86, pp.327–350. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00012-X>
- CHEN, B. and NUSS DL., 1999. Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology*, vol.73, pp.985–992. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.2.985-992.1999>
- CHOI, G.H and NUSS, D.L., 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* vol.257, no.5071, pp.800–803. <https://doi.org/10.1126/science.1496400>
- CHU, Y.M., JEON, J., YEA, S., KIM, Y., YUN, S., LEE, Y., KIM, K., 2002. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.68, no.5, pp.2529–2534. <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.68.5.2529-2534.2002>
- CLANCEY, S.A.; RUCHTI, F.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; HEITMAN, J.; IANIRI, G., 2020. A novel mycovirus evokes transcriptional rewiring in the fungus *Malassezia* and stimulates beta interferon production in macrophages. *MBio*, vol.11, no.5, pp.1-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01534-20>.
- DALE, J.L., MANNERS, J.M., IRWIN, J.A.G., 1988. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double-stranded RNAs. *Transactions of the British Mycological Society*, vol.91, no.4, pp.671-676. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(88\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80043-3)
- DOWLING, M., PERES, N., VILLANI, S., SCHNABEL, G., 2020. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: a “complex” challenge. *Plant Disease* vol.104, no.9, pp.2301-2316. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-19-2378-fe>

- EUSEBIO-COPE, A., SUN, L., TANAKA, T., CHIBA, S., KASAHARA, S., SUZUKI, N., 2015. The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. *Virology*, vol.477, pp.164-175. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.024>
- FIGUEIRÊDO, L.C., FIGUEIRÊDO, G.S., GIANCOLI, A.C.H., TANAKA, F.A.O., SILVA, L.A.O., KITAJIMA, E.W., ASTOLFI-FILHO, S., AZEVEDO, J.L., 2012. Detection of isometric, dsRNA-containing viral particles in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cashew tree. *Tropical Plant Pathology* vol.37, no.2, pp.142-145. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762012000200007>
- GARCÍA-PEDRAJAS, M.D.; CAÑIZARES, M.C.; SARMIENTO-VILLAMIL, J.L.; JACQUAT, A.G.; DAMBOLENA, J.S., 2019. Mycoviruses in biological control: from basic research to field implementation. *Phytopathology*, p.109, pp.1828-183. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0166-RVW>
- GHABRIAL, S.A., CASTÓN, J.R., JIANG, D., NILBERT, M.L., SUZUKI, N., 2015. 50-plus years of fungal viroses. *Virology*, vol.479, pp.356-368. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
- GHABRIAL, S.A. and SUZUKI, N., 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, vol.47, pp.353-384. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081932>
- GOULART, A.C.P., 2009. Detecção e controle químico de *Colletotrichum* em sementes de soja e algodão. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, vol.100, pp.1-33.
- GUO, J., ZHU, J.Z., ZHOU, X.Y., ZHONG, J., LI, CH., ZHANG, Z.G., ZHU, H.J., 2019. A novel ourmia-like mycovirus isolated from the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Virology*, vol.164, no.10, pp.2631-2635. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04346-2>
- HEINIGER, U. and RIGLING, D., 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, vol.32, pp.581-599. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.003053>
- HILLMAN, B.I. and SUZUKI, N., 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances Virus Research*, vol.63, pp.423-473. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(04\)63007-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(04)63007-7)
- HOLLINGS, M., 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, vol.196, pp.962-965. <https://doi.org/10.1038/196962a0>
- HYDE, K.D., CAI, L., CANNON, P.F., CROUCH, J.A., CROUS, P.W., DAMM, U., GOODWIN, P.H., CHEN, H., JOHNSTON, P.R., et al., 2009. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity*, vol.39, pp.147-183. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-7.pdf>
- JAMAL A., 2010. Incidence and characterization of mycoviruses from *Aspergillus fumigatus*. London: Imperial College University, 243p.

- JIA, H., DONG, K., ZHOU, L., WANG, G., HONG, N., JIANG, D., XU, W., 2017. A dsRNA virus with filamentous viral particles. *Nature Communications*, vol.8, n.168, pp.1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00237-9>
- KIRICHENKO, A.N., TSYGANENKO, K.S., OLISHEVSKAYA, S.V., 2018. Hypovirulence of mycoviruses as a tool for biotechnological control of phytopathogenic fungi. *Cytology and Genetics*, vol.52, pp.374–384. <https://doi.org/10.3103/S0095452718050043>
- KOTTA-LOIZOU, I., CASTÓN, J.R., COUTTS, R.H.A., HILLMAN, B.I., JIANG, D., KIM, D., MORIYAMA, H., SUZUKI, N., ICTV Report Consortium, 2020. ICTV Virus Taxonomy Profile: Chrysoviridae. *Journal of General Virology*, vol.101, no.2, pp.143–144. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001383>
- KOTTA-LOIZOU, I. and COUTTS, R.H.A., 2017. Mycoviruses in *Aspergilli*: a comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, vol.8, pp.1-15. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2017.01699>
- LAWANA, V., KORRAPATI, M.C., MEHENDALE, H.M., 2014. Cycloheximide. In: Wexler P (ed) *Encyclopedia of Toxicology*, 3 third. Academic Press, London, UK, pp.1103-1105.
- LECOQ, H., BOISSONNET-MENES, M., DELHOTAL, P., 1979. Infectivity and transmission of fungal viruses. In: H.P. Molitoris, M. Hollings, H.A Wood (eds.) *Fungal Viruses*. Berlin: Springer-Verlag, pp 34–47.
- LEE, K.M.; CHO, W.K.; YU, J.; SON, M.; CHOI, H.; MIN, K.; LEE, Y.W.; KIM, K.H., 2014. A comparison of transcriptional patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. *Plos One*, vol.9, n.6, pp.1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100989>
- LEFKOWITZ, E.J., DEMPSEY, D.M., HENDRICKSON, R.C., ORTON, R.J., SIDDELL, S.J., SMITH, D.B., 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, vol.46, no.D1, pp.708-717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- LIAO, C., CHEN, M., CHEN, Y., WANG, T., SHEU, Z., KUO, K., CHANG, P.L., CHUNG, K., LEE, M., 2012. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. *European Journal of Plant Pathology*, vol.133, pp.599–608. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9935-7>
- LIMA, J.S., FIGUEIREDO, J.G., GOMES, R.G., STRINGARI, D., GOULIN, E.H., ADAMOSKI, D., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.V., GLIENKE, C., 2012. Genetic diversity of *Colletotrichum* spp. an endophytic fungi in a medicinal plant, brazilian pepper tree. *International Scholarly Research Network*, pp.1-7. <https://dx.doi.org/10.5402%2F2012%2F215716>
- LIU, C., LI, M., REDDA, E.T., MEI, J., ZHANG, J., WU, B., JIANG, X., 2019. A novel double-stranded RNA mycovirus isolated from *Trichoderma harzianum*. *Virology Journal*, vol.16, no.113, pp.1-10. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1213-x>

- 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*, vol.315, no.5811, pp.513-515. <https://doi.org/10.1126/science.1136237>
- MARZANO, S.L., NELSON, B.D., AJAYI-OYETUNDE, O., BRADLEY, C.A., HUGHES, T.J., HARTMAN, G.L., EASTBURN, D.M., DOMIER, L.L., 2016. Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. *Journal of Virology*, vol.90, no.15, pp.6846-6863. <https://doi.org/10.1128/JVI.00357-16>
- MILGROOM, M.G. and HILLMAN, B.I., 2011. Cap. 9 - The ecology and evolution of fungal viruses. In: Hurst DJ. (Ed.) *Studies in viral ecology: microbial and botanical host systems* Vol 1. New Jersey: Wiley-Blackwell, pp.217-253.
- NUSS, D.L., 2005. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology* vol.3, no.8, pp.632–642. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1206>
- OKADA, R.; ICHINOSE, S.; TAKESHITA, T.; URAYAMA, S.; FUKUHARA, T.; KOMATSU, K.; ARIE, T.; ISHIHARA, A.; EGUSA, M.; KODAMA, M.; MORIYAMA, H., 2018. Molecular characterization of a novel mycovirus in *Alternaria alternata* manifesting two-sided effects: Down-regulation of host growth and upregulation of host plant pathogenicity. *Virology*, vol.519, pp.23–32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.027>
- OLIVÉ, M. and CAMPO, S., 2020. The dsRNA mycovirus ChNRV1 causes mild hypervirulence in the fungal phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Archives of Microbiology*, vol.203, pp.1-9. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02030-7>
- ÖSKAN, S. and COUTTS, R.H.A., 2015. *Aspergillus fumigatus* mycovirus causes mild hypervirulent effect on pathogenicity when tested on *Galleria mellonella*. *Fungal Genetics and Biology*, vol.76, pp.20-26. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.01.003>
- PAOLETTI M. and SAUPE, S.J., 2009. Fungal incompatibility: evolutionary origin in pathogen defense? *Bioessays* vol.31, no.11, pp.1201-1210. <https://doi.org/10.1002/bies.200900085>
- PICARELLI, M.A.S.C., GOBATO, D., PATRÍCIO, F., RIVAS, E.B., COLARICCIO, A., 2017. Virus infecting phytopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, vol.84 pp.1-15. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000162016>
- RAWLINSON, C.J., CARPENTER, J.M., MUTHYALU, D.G., 1975. Double-stranded RNA virus in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Transactions of the British Mycological Society* vol.65, no.2, pp.305-341. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(75\)80014-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80014-3)
- ROBIN, C. and HEINIGER, U., 2001. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*, vol.76, no.3, pp.361–367. https://www.dora.lib4ri.ch/wsl/islandora/object/wsl%3A15319/datastream/PDF/Robin-2001-Chestnut_blight_in_Europe-%28published_version%29.pdf

- ROSSETO, P., COSTA, A.T., POLONIO, J.C., SILVA, A.A., PAMPHILE, J.A., AZEVEDO, J.L., 2016. Investigation of mycoviruses in endophytic and phytopathogenic strains of *Colletotrichum* from different hosts. *Genetics and Molecular Research*, vol.15, no.1, pp.1-11. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017651>
- 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*, vol.5, n.6, pp.896–904. <https://doi.org/10.1128/ec.00373-05>
- SHAH, U.A.; KOTTA-LOIZOU, I.; FITT, B.D.L.; COUTTS, R.H.A., 2020. Mycovirus-induced hypervirulence of *Leptosphaeria biglobosa* enhances systemic acquired resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 33, n.1, pp. 98–107. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-19-0254-R>
- SON, M., YU, J., KIM, K.H., 2015. Five questions about mycoviruses. *Plos Pathogens*, vol.11, no.11, pp.1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005172>
- SUTTON, B.C., 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: J.A Bailey and M.J. Jeger (eds.), *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford: p.1-26.
- TRAN, T.T.; LI, H.; NGUYEN, D.Q.; JONES M.G.K.; WYLIE, S.J., 2019. Co-infection with three mycoviruses stimulates growth of a *Monilinia fructicola* isolate on nutrient medium, but does not induce hypervirulence in a natural host. *Viruses*, vol.11, n.89, pp. 1-11. <https://doi.org/10.3390/v11010089>
- VAINIO, E.J., CHIBA, S., GHABRIAL, S.A., MAISS, E., ROOSSINCK, M., SABANADZOVIC, S., SUZUKI, N., XIE, J., NIBERT, M., ICTV Report Consortium. 2018 – ICTV Virus Taxonomy Profile: Partitiviridae. *Journal of General Virology*, vol.99, no.1, pp.17–18. <https://dx.doi.org/10.1099%2Fjgv.0.000985>
- VAN DIEPENINGEN, A.D., DEBETES, A.J.M., HOEKSTRA, R.F., 2006. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. *Fungal Genetics and Biology*, vol.43, no.6, pp.446-452. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.01.014>
- WANG, S., ONGENA, M., QIU, D., GUO, L., 2017. Fungal viruses: promising fundamental research and biological control agents of fungi. *SM Virology*, vol.2, no.1, pp.1011-1015. <https://smjournals.com/virology/fulltext/smjv-v2-1011.php>
- WANG, S., ZHANG, J., LI, P., QIU, D., GUO, L., 2016. Transcriptome-Based discovery of *Fusarium graminearum* stress responses to FgHV1 infection. *International Journal of Molecular Science*, vol.17, no.11, p.1-15. <https://doi.org/10.3390/ijms17111922>
- WANG, Y., LIU, S., ZHU, H.J., ZHONG, J., 2019. Molecular characterization of a novel mycovirus from the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Virology*, vol.164, pp.2859–2863. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04354-2>
- WU, M., ZHANG, L., LI, G., JIANG, D., GHABRIAL, S.A., 2010. Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology*, vol.406, no.1, pp.117-126. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.010>

- YAEGASHI, H.; YOSHIKAWA, N.; ITO, T.; KANEMATSU, S., 2013. A mycoreovirus suppresses RNA silencing in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology*, vol.444, n.1-2, pp.409–416. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.010>
- YU, X., LI, B., FU, Y., XIE, J., CHENG, J., GHABRIAL, S.A., LI, G., YI, X., JIANG, D., 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*, vol.107, no.18, pp.8387-8392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913535107>
- YU, J.; PARK, J.Y.; HEO, J.I.; KIM, K.H., 2020. The ORF2 protein of *Fusarium graminearum* virus 1 suppresses the transcription of FgDICER2 and FgAGO1 to limit host antiviral defences. *Molecular Plant Pathology*, vol.21, n.2, pp.230–243. <https://doi.org/10.1111/mpp.12895>
- ZHAI, L., ZHANG, M., HONG, N., XIAO, F., FU, M., XIANG, J., WANG, G., 2018. Identification and characterization of a novel hepta-segmented dsRNA virus from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum fructicola*. *Frontiers in Microbiology*, vol.9, no.754, pp.1-13. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00754>
- ZHONG, J., CHEN, D., LEI, X.H., ZHU, H.J., ZHU, J.Z., GAO, B.D., 2014. Detection and characterization of a novel *Gammahpartitivirus* in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* strain HNZZ001. *Virus Research*, vol.190, pp.104–109. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.05.028>
- ZHONG J., PANG, X.D., ZHU, H.J., GAO, B.D., HUANG, W.K., ZHOU, Q., 2016. Molecular characterization of a trisegmented mycovirus from the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Viruses*, vol.8, pp.1-12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.05.028>
- ZHOU, T. and BOLAND, G.J., 1997. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homeocarpa*. *Phytopathology*, vol.87, no.2, pp.147-153. <https://doi.org/10.1094/phyto.1997.87.2.147>

CAPÍTULO 2

Colletotrichum siamense, endófito portador de micovírus como estratégia de controle biológico da antracnose em guaranazeiro

Artigo aceito para publicação na Revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*

Casas L.L., Almeida L.N., Pereira J.O., Costa Neto P.Q., Azevedo J.L. *Colletotrichum siamense*, a mycovirus-carrying endophyte, as a biological control strategy for anthracnose in guarana plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.64, 2021.

***Colletotrichum siamense*, endófito portador de micovírus, como estratégia de controle biológico da antracnose em guaranazeiro**

L.L. Casas¹, L. N. Almeida², J. O. Pereira², P.Q. Costa Neto², J. L. Azevedo³

¹Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Ciências da Saúde, Manaus, Amazonas, Brasil;

²Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Manaus, Amazonas, Brasil;

³Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Resumo

O guaraná, fruto de *Paullinia cupana*, é conhecido por suas propriedades estimulantes e medicinais pela população e comunidades indígenas da Amazônia. Porém, apresenta sérios problemas fitopatológicos como a doença antracnose causada por *Colletotrichum* spp. O objetivo deste trabalho foi verificar se *C. siamense*, um fungo endófito portador de micovírus, poderia proteger mudas de guaranazeiro reduzindo ou eliminando sintomas característicos da doença. Avaliou-se também outras alterações fisiológicas na planta causadas pela presença desse endófito. As estacas da cultivar Cereçaporanga foram mergulhadas em suspensão de conídios do agente de controle biológico e plantadas em substrato específico. Após quatro meses em casa de vegetação, as mudas foram borrifadas com suspensão de conídios do fitopatógeno e parte dessas mudas recebeu o fungicida indicado para a cultura a fim de comparar com a testemunha. Após 28 dias, foi avaliada a quantidade de lesões, caracteres morfofisiológicos e macro e micronutrientes foliares. As mudas tratadas com *C. siamense* apresentaram menor percentual de lesões, aumento da parte aérea e do sistema radicular quando comparadas aos demais tratamentos. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao percentual de macro e micronutrientes foliares.

Palavras-chave: Micovírus; Amazônia; *Paullinia cupana*

INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunt. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke), também chamado guaraná-da-Amazônia, guaranaina, guaranauva, uarana ou narana, é uma espécie nativa da região Amazônica conhecida por suas propriedades estimulantes e medicinais e usada há séculos por comunidades indígenas da Amazônia e mais recentemente pela população local [1]. O guaranazeiro é comercialmente cultivado apenas no Brasil, onde a produção anual chega a 2.660 toneladas de sementes [2], das quais 70% são utilizadas por indústrias de refrigerantes para produzir bebidas carbonatadas não alcoólicas. Drogarias e lojas alternativas de produtos naturais vendem o restante, principalmente na forma de sementes torradas em pó [3,4].

Os estados do Amazonas e da Bahia, juntos, representam 95% da área plantada de guaranazeiro no Brasil, no entanto, nos últimos dez anos, o rendimento médio na Bahia foi maior do que no Amazonas. Vários fatores contribuem para a menor produtividade na região Amazônica, tais como baixa qualificação técnica dos produtores, tratos culturais inadequados, plantas matrizes

que não passaram por processos de melhoramento genético e doenças fúngicas como superbrotamento e antracnose [1,4]. Mesmo com o desenvolvimento de cultivares resistentes a pragas e doenças para a região Amazônica, a produtividade permanece baixa.

A antracnose do guaranazeiro é causada por *Colletotrichum* spp., que causam o crestamento das folhas jovens, seguido da queda das mesmas. Em folhas novas ainda em crescimento e antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico. Quando numerosas, essas lesões causam deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendente dos ramos e por fim, a da planta [5].

O controle biológico de plantas é um método alternativo ao uso de agroquímicos, pode ser eficiente, com menor custo de manutenção, menor agressividade ao ecossistema e vem ganhando espaço no mundo [6]. Uma alternativa que suscitou inúmeros estudos nos últimos anos é a utilização de fungos infectados com micovírus para controle de fitopatógenos. O estudo relacionado à infecção por micovírus no fungo filamentosso *Cryphonectria parasitica* forneceu forte base para futuras pesquisas em hipovirulência fúngica ou debilitação em outras espécies de fungos [7,8]. A interação do micovírus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) com seu hospedeiro fúngico *C. parasitica* é bem estudada e tem sido modelo para diversos estudos com outros fungos patogênicos [9,10,11]. A presença do vírus no fungo hospedeiro pode conduzir várias alterações fisiológicas, dentre elas, a diminuição da virulência em fungos fitopatogênicos conduzindo ao fenômeno da hipovirulência. A hipovirulência associada aos micovírus em fungos patógenos de plantas pode ser transmissível intraespecificamente por meio de anastomose de hifas em isolados compatíveis [12].

Em 2015, a partir de pesquisas com fungos endofíticos obtidos de folhas de guaranazeiro em Maués (Amazonas-Brasil), foi detectada a presença de micovírus em uma espécie de *Colletotrichum* usando microscopia eletrônica de transmissão (MET) [13]. Em estudos preliminares (dados não publicados) a redução de sintomas da antracnose foi verificada em mudas de guaranazeiro inoculadas com o fungo portador do micovírus.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o fungo endofítico *C. siamense* portador de um micovírus, é capaz de conferir proteção em mudas de guaranazeiro do clone BRS-Cereçaporanga reduzindo ou eliminando os sintomas característicos da doença. Além disso, foi avaliado se este fungo causa alterações fisiológicas na planta quanto ao potencial de enraizamento e absorção de macro e micronutrientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos

O fungo endofítico *C. siamense* contendo micovírus foi isolado de folhas sadias de guaranazeiro na Fazenda Santa Helena em Maués, Amazonas (3°25'18.1"S, 57°40'40.8"W) e seu potencial de inibição do crescimento do fitopatógeno foi analisado *in vitro* [13]. *Colletotrichum fructicola* patogênico foi isolado de folhas de guaranazeiro apresentando lesões necróticas e depositado na Coleção de Culturas do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A patogenicidade de *C. fructicola* foi comprovada através do Postulado de Koch [14].

Caracterização molecular

Extração de ácidos nucleicos totais

Os fungos foram cultivados em meio Potato Dextrose Agar (PDA) por cinco dias em BOD a 28 °C sob alternância luminosa (12/12 h). O micélio foi coletado e submetido a extração de ácidos nucleicos totais conforme a metodologia de Doyle & Doyle (1990), com modificações [15].

Amplificação do DNA por PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificação dos genes β -tubulina (*tub*), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*gapdh*) e espaço interno transcrito (ITS) (tabela 1). A reação de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95 °C por 3 min., seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 58 °C por 20 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo por 20 min. a 80 V. A purificação foi feita com solução de polietilenoglicol (PEG) 20% [16].

Tabela 1 - Primers utilizados na reação de amplificação

Gene	Primer	Sequência do primer	Referências
β -Tubulina	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	[17]
	Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GDF	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	[17]
	GDR	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	
Espaçadores internos transcritos	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	[18]
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

Sequenciamento

Após a purificação, as amostras foram preparadas para o sequenciamento usando os respectivos primers (tabela 1) e o Kit Big Dye (Applied Biosystems, Big Dye V. 3.1), conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram submetidas e comparadas com aquelas depositadas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide). O alinhamento foi realizado com sequências que apresentaram identidade $\geq 97\%$.

Análise de sequência multilocus (MLSA)

As sequências foram tratadas e alinhadas usando o software Geneious Prime v. 2020.2.2. Uma vez que as sequências apresentaram identidades elevadas no Genbank (98%) com outras cepas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* uma análise filogenética foi realizada com base em sequências de fungos presentes nesse complexo. Uma cepa de *C. boninense* foi usada como grupo externo. As sequências foram alinhadas utilizando o software MAFFT v.7.450 [19]. Após o alinhamento, uma montagem multigênica foi realizada. Para a análise filogenética baseada na máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, MrModelTest v. 2.3 [20] foi usado para escolher o melhor modelo evolutivo. A árvore filogenética foi construída utilizando MrBayes v. 2.2.4 [21], levando em consideração os parâmetros gerados pelo MrModelTest, com cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), que durou até que o desvio padrão médio das frequências de divisão fosse inferior a 0,01 (1,000.000 gerações). A probabilidade bayesiana foi demonstrada nos nós entre cada indivíduo. A árvore foi editada com o FigTree v. 1.4.2 [22].

Produção de conídios para os ensaios

O endófito *C. siamense* foi cultivado em tubos de ensaio por sete dias em meio Synthetic Nutrient Agar (SNA) (KH_2PO_4 1 g.L⁻¹, KNO_3 1,0 g.L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g.L⁻¹, KCl 0,2 g.L⁻¹, Glicose 0,2 g.L⁻¹, Sacarose 0,2 g.L⁻¹, ágar 20 g.L⁻¹) sob regime de alternância luminosa (12/12 h) a 30 °C. Em cada tubo foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada com Tween 80 1% e, posteriormente, foi realizada fricção na superfície do meio com pincel de cerdas macias para liberação dos conídios. Os conídios foram quantificados utilizando câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para a concentração de 5.0×10^3 conídios mL⁻¹. O fitopatógeno *C. fructicola* foi cultivado em PDA, nas mesmas condições, e a concentração de conídios 1.0×10^6 conídios

mL⁻¹ foi obtida seguindo o padrão utilizado para espécies de *Colletotrichum* fitopatogênicas [23,24].

Ensaio *in vivo*

Preparo das estacas e inoculação do agente de controle biológico

A inoculação do fungo foi realizada no momento do plantio das estacas de ramos recém coletados da cultivar do guaranazeiro BRS-Cereçaporanga, cedidos pela EMBRAPA Amazônia Ocidental (Manaus-Amazonas). As estacas foram cortadas em forma de bisel e imersas na suspensão de conídios de *C. siamense* por 30 min. Foram plantadas em sacos pretos (23 x 18 x 0.15 cm) no substrato composto de terriço e areia (4:1) e acondicionadas em casa de vegetação por cerca de 120 dias, localizada no Projeto de Produção da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A adubação foi realizada a cada 30 dias conforme indicação para a cultura [4]. As estacas foram mantidas sob nebulização intermitente, no período de setembro/2018 a janeiro/2019. O delineamento experimental deste ensaio foi inteiramente ao acaso com três repetições e 12 estacas por repetição.

Preparo das estacas destinadas ao controle químico

As estacas destinadas ao controle químico e as testemunhas foram imersas apenas em água destilada esterilizada por 30 min. Foram plantadas em sacos e acondicionadas em casa de vegetação por cerca de 120 dias. O delineamento experimental deste ensaio foi igual ao ensaio anterior. As mudas destinadas ao controle químico foram pulverizadas com solução do fungicida Impact 125® (Flutriafol) preparado de acordo com as instruções do fabricante. No preparo da calda foi adicionado 2.5% (v/v) de espalhante adesivo Agral. A aplicação foi realizada com pulverizador costal elétrico de 20 L entre 7h00 e 9h00. A efetividade da cobertura do fungicida sobre a superfície foliar foi avaliada utilizando papel indicador que ao receber gotas do produto altera sua coloração de amarelo para azul. Foram realizadas três aplicações de fungicida com intervalo de 15 dias.

Aplicação do fitopatógeno

Dois dias após a aplicação do fungicida no grupo de estacas que recebeu o tratamento químico, as mudas de todos os tratamentos (mudas com o agente de controle biológico, mudas

destinadas ao controle químico e mudas testemunhas) foram pulverizadas com uma suspensão do fitopatígeno. A suspensão de conídios do *C. fruticola* foi ajustada para 1.0×10^6 conídios mL⁻¹. Após inoculação do fitopatígeno as mudas foram submetidas a 48 horas de incubação em câmara úmida com o objetivo de viabilizar a germinação dos conídios e a sua colonização. A avaliação da severidade nas cultivares foi realizada diariamente durante 28 dias e mensurada utilizando a escala diagramática de antracnose em guaranazeiro [25].

Análise morfológica das mudas

A influência dos tratamentos sobre os caracteres morfológicos das plantas foi avaliada ao término dos ensaios por meio da análise do sistema radicular e parte aérea. No mesmo dia, foram coletados os valores de massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da raiz fresca (MRF), altura da parte aérea (APA) e comprimento da raiz (CR) com trena milimetrada. O sistema radicular e a parte aérea de cada planta foram colocados em sacos de papel para posterior secagem em estufa, com ventilação forçada a 60 °C, até apresentar peso constante. Foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca do sistema radicular (MSSR) em balança analítica.

Análise de macro e micronutrientes

Após 28 dias de experimento, foram retiradas aleatoriamente 20 folhas de cada tratamento (controle químico, controle biológico e testemunha) para determinação de macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (boro, cobre, ferro, manganês e zinco) [26]. As análises do tecido vegetal foram realizadas no Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal de Lavras seguindo o protocolo padrão de análise de macro e micronutrientes foliares [27].

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de média de Tukey a 1 e 5% de significância, utilizando o programa SISVAR 5.7 [28]. Os dados de lesão e avaliação morfológica foram transformados (x+1) e submetidos à análise de variância.

RESULTADOS

Caracterização molecular

A partir da amplificação de genes com os primers ITS, *TUB* e *GAPDH* e submissão ao banco de dados de nucleotídeos o fungo utilizado como controle biológico foi confirmado como *C. siamense* e a linhagem fitopatogênica *C. fructicola* [29]. As sequências foram comparadas com aquelas presentes no banco do NCBI (Tabela 2) e a árvore filogenética foi elaborada (Figura 1).

Tabela 2 – Microrganismos identificados por sequências dos genes tub, gapdh, ITS após comparação com aquelas depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Identificação	Número de acesso no GenBank		
	<i>TUB</i>	<i>GAPDH</i>	ITS
<i>Colletotrichum siamense</i>	MH622636.1	MH681376.1	KP703364.1
<i>Colletotrichum fructicola</i>	MH622670.1	MH681411.1	MK041517.1

Ensaio de controle da antracnose

As folhas das mudas que apresentaram lesões características da antracnose foram classificadas quanto ao percentual de área foliar lesionada de acordo com a escala diagramática para antracnose em guaranazeiro [25]. Os dados foram analisados e as médias encontram-se na tabela 3.

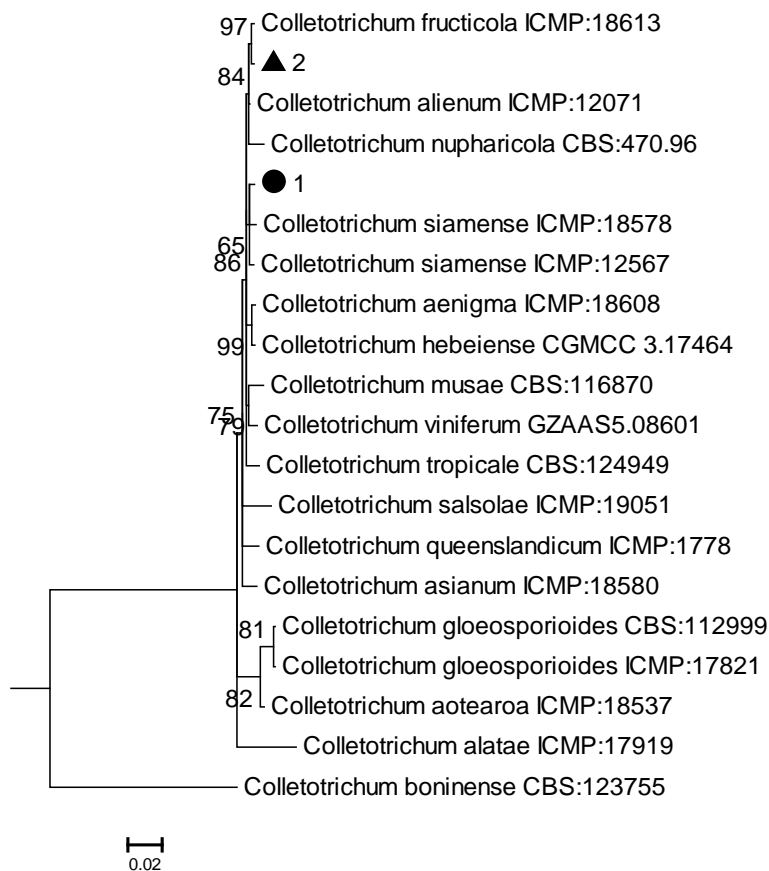


Figura 1. Resultados do dendograma da análise bayesiana. A análise de MLSA foi feita com o alinhamento de três genes combinados (ITS, GAPDH e TUB). A probabilidade bayesiana foi demonstrada nos nós entre cada indivíduo. As sequências de *Colletotrichum boninense* (CBS 123755) foram utilizadas como grupo externo. Fungos: 1 - *C. siamense*, 2 - *C. fructicola*.

Tabela 3 - Médias obtidas após avaliação do percentual de lesões

TRATAMENTOS	LESÕES
<i>Colletotrichum siamense</i>	5% b
Testemunha	7% ab
Químico	8% a
C.V. (%)	2.02
p-valor	0,0019

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo Teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

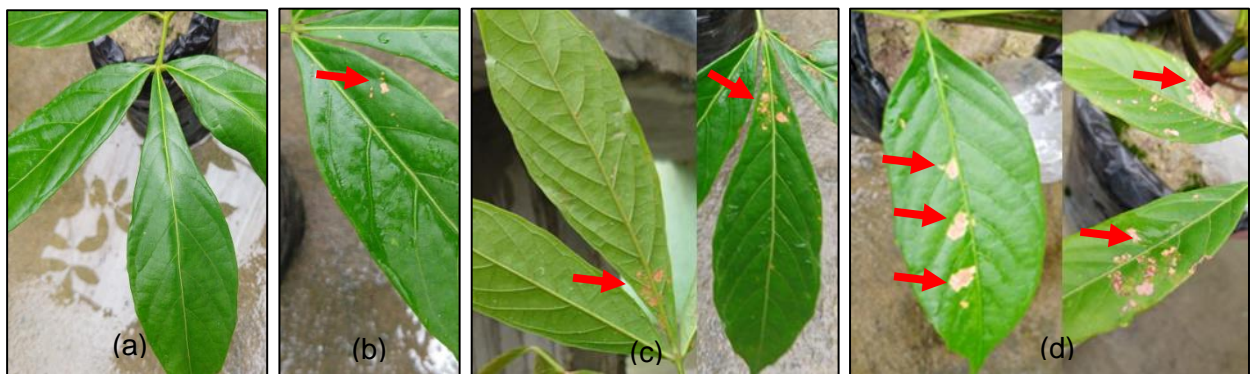


Figura 2. Folhas de guarazeiro: (a) Não-inoculada; (b) Mudas tratadas com o agente de controle biológico *C. siamense*; (c) Mudas tratadas somente com o patógeno *C. fructicola*; (d) Mudas tratadas com fungicida. As setas indicam os sintomas foliares causados por *C. fructicola*.

Análise de macro e micronutrientes das folhas

O resultado da análise de macro e micronutrientes foliares encontra-se na tabela 4. Algumas lesões que não estavam relacionadas especificamente ao ataque do fitopatógeno foram observadas em mudas de todos os tratamentos.

Tabela 4 - Resultado da análise foliar após experimento em casa de vegetação

	Macronutrientes (g Kg ⁻¹)					
	N	P	K	Ca	Mg**	S*
Testemunha	27,8 c	2,8 a	21,4 c	2,6 b	1,5 a	1,6 a
Químico	30,2 b	2,8 a	23,3 b	2,7 a	1,5 a	1,6 a
<i>Colletotrichum siamense</i>	31,0 a	2,2 b	24,0 a	2,3 c	1,4 a	1,3 b
C.V (%)	0,53	5,44	0,62	3,95	6,82	6,67
p-valor	0,000	0,0029	0,0000	0,0066	0,4219	0,0156
	Micronutrientes (mg Kg ⁻¹)					
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
Testemunha	17,6 b	11,1 a	59,6 a	117,9 a	36,3 b	
Químico	16,8 c	11,3 a	67,3 a	113,0 b	37,9 a	

<i>Colletotrichum siamense</i>	19,0 a	9,40 b	52,3 b	95,1 c	32,5 c
C.V (%)	0,56	1,63	0,29	0,13	0,49
p-valor	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo Teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Efeito significativo a 1% ($p < 0,01$); **Efeito significativo a 5% ($p < 0,05$)

Avaliação morfológica das mudas

Verificou-se que houve diferença significativa entre os três tratamentos quanto aos parâmetros massa fresca e seca da parte aérea e massa seca da raiz (Tabela 5). No parâmetro altura da parte aérea, as mudas do controle químico e as testemunhas apresentaram médias iguais, enquanto naquelas que receberam *C. siamense* houve desenvolvimento maior. Quanto ao comprimento da raiz não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 5 - Resultado dos parâmetros morfológicos obtidos após 150 dias de experimento

	Massa fresca (PA) g	Massa fresca (R) g	Massa seca (PA) g	Massa seca (R) g	Altura (PA) cm	Comprimento (R) cm**
Testemunha	28.28 c	5.72 c	8.94 c	1.69 b	53.83 b	25.27 a
Químico	33.36 b	8.11 b	11.64 b	2.69 a	55.33 b	26.06 a
<i>Colletotrichum siamense</i>	39.42 a	9.53 a	12.97 a	2.69 a	59.94 a	27.61 a
C.V. (%)	13.86	20.44	14.20	15.38	6.15	8.11
p-valor	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0007	0.0885

PA – parte aérea; R – raiz

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo Teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

*Efeito significativo a 1% ($p < 0,01$); **Efeito significativo a 5% ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

Espécies de *Colletotrichum* podem ser encontradas na natureza como patógenos, endófitos e eventualmente como saprófitas [30]. Tanto *C. siamense* quanto *C. fructicola* já foram isolados como fitopatógenos [31,32] e como endófitos em diferentes hospedeiros [33,34]. Sabe-se que o comportamento das espécies de *Colletotrichum* é altamente regulado por famílias de genes específicos e interações bioquímicas que ocorrem através de enzimas específicas e metabólitos secundários produzidos na interface hospedeiro-patógeno. Essa interação define, de maneira geral, a forma como o fungo irá se apresentar podendo estabelecer relações necrotróficas, hemibiotróficas, latentes ou quiescentes e endofíticas [30]. Nesta pesquisa, *C. siamense* comportou-se como endófito e *C. fructicola* como fitopatógeno e ambos foram registrados pela primeira vez em guaranazeiro.

A proposta de se utilizar fungos endofíticos como agentes de controle biológico tem sido considerada para diferentes culturas. Aliada à capacidade natural de endófitos em protegerem a

planta, diversas pesquisas têm optado por utilizarem potenciais agentes de controle portadores de micovírus graças a sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas [35]. O uso de *C. siamense* possibilitou o desenvolvimento de menor número de lesões nas mudas avaliadas (Tabela 3) quando comparadas às que receberam o tratamento químico. Três hipóteses podem ser consideradas para explicar esse fato. A primeira está relacionada à capacidade de transmissão do micovírus para a linhagem fitopatogênica, como sugerido por alguns autores [36]. Ao estudarem os efeitos do vírus *Colletotrichum fructicola chrysovirus 1* (CfCV1) em *C. fructicola* foi verificado que a sua presença diminuía a taxa de crescimento e a virulência dos sintomas nos frutos de pêra. Espécies de *Colletotrichum* portadoras de micovírus como *C. higginsianum*, *C. truncatum* e *C. camelliae* também apresentaram comportamento fitopatogênico alterado devido a presença do micovírus [37-39]. Outro mecanismo também sugerido é que colonização dos tecidos do hospedeiro pela linhagem endofítica tenha diminuído a capacidade de estabelecimento do fitopatógeno. Dentre as vantagens do uso de endófitos e linhagens hipovirulentas como agentes de controle biológico destaca-se a capacidade que esses microrganismos têm de ocupar o mesmo nicho que o fitopatógeno [40]. Ao ocupar o mesmo nicho, colonizar pontos de entrada e utilizar os mesmos nutrientes que seriam utilizados pelo fitopatógeno, o agente de controle biológico previne o hospedeiro da infecção [41]. A terceira hipótese está baseada no estímulo da planta para produção de substâncias protetoras, fenômeno denominado de resistência sistêmica induzida. Várias substâncias, dentre elas o ácido indolacético (AIA) também produzido por *C. siamense* [42], promovem nas células vegetais estímulo à produção de proteínas específicas relacionadas à patogênese que são capazes de degradar a parede celular dos fungos e bactérias.

Vale ressaltar que os benefícios de inibição do fitopatógeno foram testados apenas na cultivar BRS-Cereçaporanga. No entanto, é importante destacar que essas respostas benéficas podem sofrer variações conforme a genética do hospedeiro [43,44]. Isso sugere que resultados distintos podem ser esperados ao utilizar o mesmo agente de controle em cultivares diferentes do guaranazeiro. Os diferentes processos de melhoramento aplicados na cultura do guaranazeiro resultaram em discretas mudanças nos caracteres morfológicos da planta tais como espessura da cutícula, densidade estomática, presença de tricomas etc. [43]. Essas características também podem influenciar no processo de colonização do fitopatógeno facilitando ou não sua entrada no hospedeiro. As cultivares melhoradas apresentaram bons resultados no que se refere à tolerância em campo ao fitopatógeno. É o caso da cultivar BRS-Maués, atualmente selecionada como a cultivar mais promissora devido sua produtividade e tolerância à antracnose [44]. Porém, ainda

não há estudos que expliquem qual gene ou conjunto de genes estão envolvidos nesse processo de tolerância.

As mudas que foram tratadas com o fungicida e as testemunhas, apresentaram percentual de sintomas um pouco maior (Tabela 3). Isso mostra de forma preliminar que o fungicida indicado para o controle da doença na cultura não minimizou os efeitos do fitopatógeno sobre a planta. Apesar de já haver indicação desse princípio ativo para o controle da antracnose em guaranazeiro, esta não é uma prática comum adotada pelos agricultores devido os custos elevados agregados ao uso do produto.

Em relação à análise de macro e micronutrientes do material vegetal, constatou-se que em relação à testemunha, as mudas tratadas com *C. siamense* apresentaram maiores teores de N e K nos tecidos foliares (Tabela 4). O elemento K, além de constituir cerca de 2 a 5% da massa seca do vegetal, contribui juntamente com o N para o crescimento vegetativo da planta [45,46]. Os resultados obtidos podem estar diretamente relacionados ao fato de que as mudas tratadas com *C. siamense* apresentaram maiores médias de massa fresca e seca da parte aérea e de comprimento da raiz quando comparadas às testemunhas e às mudas do controle químico (Tabela 5). Trabalhos realizados em mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) evidenciaram que microrganismos endofíticos aumentaram os teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu e Zn na parte aérea e N, P, Mg e Mn nas raízes contribuindo para a eficiência nutricional [47].

Ao longo do experimento foram verificadas alterações foliares que não estavam relacionadas diretamente ao ataque do fitopatógeno. Sintomas como enrolamento, clorose e manchas foliares são, na maioria das vezes, características relacionadas a ausência ou ao excesso de nutrientes. Para mudas de guaranazeiro as poucas recomendações existentes quanto à adubação estão relacionadas à adição, a cada 30 dias, diretamente no substrato de 25 mL de solução de KCl e Ureia. No entanto, sabe-se que as mudas em fase de desenvolvimento podem exigir uma quantidade maior de nutrientes, mais especificamente micronutrientes, que irão auxiliar no processo de lançamento de folhas novas, por exemplo. A tabela 4 apresenta os valores de macro e micronutrientes encontrados nas folhas. Percebe-se que, apesar de haver discretas diferenças entre os teores de nutrientes, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

O efeito como promotor de crescimento de diversos microrganismos é reconhecido há bastante tempo e explorado em diferentes culturas [48-50]. Entretanto, estudos com espécies amazônicas e, em especial, com o guaranazeiro, são raros na literatura. Neste trabalho verificou-se que as mudas tratadas com *C. siamense* apresentaram crescimento vegetativo maior quando

comparado com a testemunha, mais particularmente um incremento da matéria seca e altura da parte aérea (Tabela 5). Em pesquisa com *Arabidopsis thaliana* foi observado que o tratamento com o *C. tofieldiae* promoveu incremento da massa seca da planta [51]. Além disso, a presença de *C. tofieldiae* promoveu maior absorção de fosfato do solo, contribuindo diretamente no crescimento vegetativo da planta. Desta forma, é interessante o uso de microrganismos considerados bioestimulantes na fase de produção de mudas devido esta ser uma das etapas mais importantes do sistema de produção agrícola, uma vez que dela depende o desempenho final das plantas no campo [52]. Sob este ponto de vista, várias literaturas confirmam o efeito estimulante de alguns fungos sobre as plantas, sendo o *Trichoderma* o gênero mais amplamente utilizado [50,53,54].

Em guaranazeiro, este incremento na massa seca do vegetal em mudas tratadas com o agente de controle biológico pode ser consequência da produção de AIA pelo próprio fungo. O AIA é um tipo dominante de auxina encontrado nas plantas e está envolvido nas respostas de crescimento e alongamento celular, diferenciação celular e iniciação radicular. Esse hormônio é produzido também por microrganismos associados a plantas, incluindo ectomicorrízicos, endófitos e fitopatogênicos. A produção de AIA por *C. siamense* foi testada *in vitro* e comprovada corroborando os achados da literatura no que diz respeito a produção deste hormônio por espécies de *Colletotrichum* [42,55].

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a inoculação de *C. siamense* em mudas de guaranazeiro auxiliou na redução do percentual de lesões causadas pelo fitopatógeno. Além disso, a presença do fungo auxiliou no crescimento vegetativo da planta refletindo no aumento da parte aérea da muda. Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto aos teores de micronutrientes nos tecidos foliares. Novos estudos são necessários para o entendimento dos mecanismos de proteção conferidos por *C. siamense* em guaranazeiro.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM 002/2018 - UNIVERSAL AMAZONAS). Agradecemos também à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e a Embrapa Amazônia Ocidental pelo apoio técnico e consultoria.

CONFLITO DE INTERESSES

“Os autores declaram não haver conflito de interesses”. “Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, na coleta, análise ou interpretação de dados, na redação do manuscrito ou na decisão de publicar os resultados”.

REFERÊNCIAS

- Schimpl FC, Silva JF, Gonçalves JFC, Mazzafera P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* 2013 Oct 28;150(1):14-31.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [cited 2019 Jan 10]. Available from: <https://sidra.ibge.gov.br/>
- Ângelo PCS, Nunes-Silva CG, Brígido MM, Azevedo JSN, Assunção EN, Sousa ARB et al. Brazilian Amazon Consortium for Genomic Research (REALGENE). Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Rep.* 2008 Jan;27(1):117-24.
- Pereira JCR. *Sistemas de Produção 2: Cultura do guaranazeiro no Amazonas*. 4th ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; 2005.
- Tavares AM, Atroch AL, Nascimento Filho FJ, Pereira JCR, Araújo JCA, Moraes LAC. *Cultura do Guaranazeiro no Amazonas*. 4th ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; 2005.
- Azevedo JL, Maccheroni Junior W, Pereira JO, Araújo WL. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron J Biotechn.* 2000 Apr 15;3(1):40-65.
- Ghabrial SA, Suzuki N. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 2009 47:353-84.
- Eusebio-Cope A, Sun L, Tanaka T, Chiba S, Kasahara S, Suzuki N. The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. *Virology* 2015 Mar;477:164-175.
- Chu YM, Jeon J, Yea S, Kim Y, Yun S, Lee Y et al. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Appl Environ Microbiol.* 2002 May;68(5):2529-34.
- Zhou T, Boland GJ. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homeocarpa*. *Phytopathology* 1997 Feb;87(2):147-53.
- Wu M, Zhang L, Li G, Jiang D, Ghabrial SA. Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology* 2010 Oct 10;406(1):117-26.
- Anagnostakis SL, Day PR. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 1979 69:1226-29.
- Bezerra TE. Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) no controle biológico da antracnose [thesis]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2015.
- Bezerra CS. Caracterização enzimática de *Colletotrichum* spp. isolados de *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.) [dissertation]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 2017.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1990 12:13-15.
- Teles YV. Seleção e isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente endêmicas do igarapé do quarenta [thesis]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2017.

17. Silva BNS, Ferreira AFTAF, Mota AJ, Bentes JLS. Occurrence of noni anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in Amazonas, Brazil. *Agrarian Academic J.* 2019 Mai/Jun;2(3):7-9.
18. White J, Bruns T, Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* New York: Academic Press Inc; 1990. p.315-322.
19. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 2013 30(4):772–780.
20. Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University 2004.
21. Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 2012 61(3):539-542.
22. Rambaut A. 2009. FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool. Website: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>
23. Lins SRO, Abreu MS, Alves E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. *Fitopatol Bras.* 2007 Nov/Dez;32(6):488-95.
24. Souza LCR. Resistência de genótipos de pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.) à antracnose (*Colletotrichum brevisporum*) [dissertation]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 2018.
25. Pereira JCR, Araújo JCA. Escala diagramática para quantificar a antracnose do guaranazeiro. Comunicado Técnico 70. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; 2009.
26. Batista BD. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas a cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) [dissertation]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2012.
27. Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Potafos; 1997.
28. Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 2011 Nov 30;35(6):1039-42.
29. Prihastuti H, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Hyde KD. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* 2009 Dec 9;39:89–109.
30. Silva DD, Crous PW, Ades PK, Hyde KD, Taylor PWJ. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biol Rev.* 2017 May;31:155-68.
31. Dwarka DJ, Sharma G, Rajasab AH. *Colletotrichum siamense* causes anthracnose on the fruits of *Pongamia pinnata* in India. *Mycosphere* 2016 Aug 21;7(4):492-98.
32. Mo J, Zhao G, Li Q, Solange GS, Tang L, Guo, T et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. *Plant Dis.* 2018 Jul;102:1283-89.
33. Zakaria L, Aziz WNW. Molecular identification of endophytic fungi from banana leaves (*Musa* spp.). *Trop Life Sci Res.* 2018 Jul 6;29(2):201–11.
34. Ma X, Nontachaiyapoom S, Jayawardena RS, Hyde KD, Gentekaki E, Zhou S. Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. *MycKeys* 2018 Dec 4;43:23-57.
35. Rosseto P, Costa AT, Polonio JC, Silva AA da, Pamphile JA, Azevedo JL. Investigation of mycoviruses in endophytic and phytopathogenic strains of *Colletotrichum* from different hosts. *Genetics and Molecular Research* 2016 15(1):1-8.

36. Zhai L, Zhang M, Hong N, Xiao F, Fu M, Xiang J et al. Identification and characterization of a novel hepta-segmented dsRNA virus from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum fructicola*. *Front Microbiol* 2018 Apr 19;9(754):1-13.
37. Campo S, Gilbert KB, Carrington JC. Small RNA-Based Antiviral Defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *PLOS Pathog*. 2016 Jun 2;12(6):1-36.
38. Marzano SL, Nelson BD, Ajayi-Oyetunde O, Bradley CA, Hughes TJ, Hartman GL et al. Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. *J Virol*. 2016 Aug;90(15):6846-63.
39. Jia H, Dong K, Zhou L, Wang G, Hong N, Jiang D. A dsRNA virus with filamentous viral particles. *Nat Commun*. 2017 Aug 1;8(168):1-12.
40. O'Brien PA. Biological control of plant diseases. *Australas Plant Pathol*. 2017 Mar 23;46(4):293–304.
41. Sneh B. Use of non-pathogenic or hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal pathogens. *Biotechnol Adv*. 1998 Jan;16(1):1–32.
42. Munasinghe MVK, Kumar NS, Jayasinghe L, Fujimoto Y. Indole-3-Acetic Acid production by *Colletotrichum siamense*, an endophytic fungus from *Piper nigrum* leaves. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 2017 Dec 28;79(6):475-79.
43. Oliveira ERN. Características morfofisiológicas e bioquímicas de clones de guaraná *Paullinia cupana* Kunt. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke cultivados sob plantio comercial na Amazônia [thesis]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 2014.
44. Pinto CEDL, Atroch AL, Fajardo JDV, Nascimento Filho FJ. Seleção de clones de guaranzeiro para adaptabilidade e estabilidade no estado do Amazonas. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2018 61:1-7.
45. Silveira RLVA, Malavolta E. Nutrição e adubação potássica em Eucalyptus. Piracicaba: Potafos; 2009.
46. Santos KG. Efeito da adubação foliar e condicionadores de solo no enraizamento, crescimento e rustificação de mudas clonais de *Pinus* sp. [dissertation]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2015.
47. Barretti PB, Souza RM, Pozza AAA, Pozza EA, Carvalho JG, Souza JT. Aumento da eficiência nutricional de tomateiros inoculados com bactérias endofíticas promotoras de crescimento. *R Bras Ci Solo* 2008 July/Aug;32(4):1541-48.
48. Harman GE. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis*. 2000 Feb 23;84(4):377-93.
49. Resende ML, Oliveira JA, Guimarães RM, Pinho RGV, VIEIRA AR. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Cienc Agrotec*. 2004 Aug;28(4):793-98.
50. Singh V, Singh PN, Yadav RL, Awasthi SK, Joshi BB, Singh RK et al. Increasing the efficacy of *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of red rot in sugarcane. *J Hortic For*. 2010 Apr;2(4):66-71.
51. Hiruma K, Gerlach N, Sacrista S, Nakano RT, Hacquard S, Kracher B et al. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell* 2016 Apr 7;165:464–74.
52. Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve R. *Plant propagation: Principles and practices*. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall; 2010.
53. Yadav J, Verma JP, Tiwari KN. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian J Biol Sci*. 2011 Feb;4(3):291–99.

54. Azevedo GB, Novaes QS, Azevedo GTOS, Silva HF, Sobrinho GGR, Novaes AB. Efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus camaldulensis*. *Sci For.* 2017 Jun;45(114):343-52.
55. Numponsak T, Kumla J, Suwannarach N, Matsui K, Lumyong S. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fruticola* CMU-A109. *Plos One* 2018 Oct 18;13(10):1-17.

CAPÍTULO 3

Controle biológico e indução de resistência em guaranazeiro: eficiência da aplicação do fungo endofítico *Colletotrichum siamense*

Artigo publicado na Revista *International Journal of Microbiology*

Casas L.L., Pereira J.O., Costa Neto P.Q., Silva J.F., Almeida L.N., Bianco R.A., Azevedo J.L. Endophytic *Colletotrichum siamense* for biocontrol and resistance induction in guarana seedlings. *International Journal of Microbiology*, Article ID 1925226, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1925226>

Controle biológico e indução de resistência em guaranazeiro: eficiência da aplicação do fungo endofítico *Colletotrichum siamense*

L. L. Casas^a, J. O. Pereira^b, P. Q. Costa-Neto^b, J. F. Silva^b, L. N. Almeida^b, R. A. Bianco^c, J. L. Azevedo^d

^a Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Ciências da Saúde, 69095-001, Manaus, Amazonas, Brasil

^b Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, 69067-005, Manaus, Amazonas, Brasil

^c Uninorte – Laureate International Universities, 69020-030, Manaus, Amazonas, Brasil

^d Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil

Resumo

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é um importante e tradicional cultivo no Estado do Amazonas. É uma planta genuinamente brasileira de grande importância econômica e social, especialmente na Região Amazônica. Porém, apresenta sérios problemas fitopatológicos como a doença antracnose causada por *Colletotrichum* spp. O objetivo deste trabalho foi verificar se *C. siamense*, um fungo endofítico isolado de folhas sadias de guaranazeiro portador de micovírus, poderia proteger mudas de guaranazeiro reduzindo ou eliminando sintomas característicos da doença. Avaliou-se também a produção de proteínas totais e enzimas relacionadas à patogênese como peroxidase (POX), quitinase (CHI) e fenilalanina amônia-liase (PAL). Mudas de guaranazeiro da cultivar Maués foram aspergidas com uma suspensão de conídios do agente de controle biológico (5.0×10^3 conidia/mL). Após dez dias, as mudas foram borrifadas com suspensão de conídios do fitopatógeno (1.0×10^6 conidia/mL) e parte dessas mudas recebeu o fungicida indicado para a cultura. O fungicida foi aplicado duas vezes com intervalo de 15 entre as aplicações. As mudas do controle negativo não receberam nenhum tratamento (exceto água e adubação) enquanto as do controle positivo foram tratadas apenas com o fitopatógeno. O experimento ocorreu entre dezembro de 2019 e fevereiro de 2020 em casa de vegetação. Os tratamentos foram aplicados em temperatura média de 25°C e umidade relativa de 85%. Folíolos foram coletados aleatoriamente de cada tratamento nos tempos 0, 48, 72 e 96 horas após a inoculação do patógeno e analisados quanto a produção de proteínas totais e enzimas (POX, PAL, CHI). Passados 28 dias, foi avaliado o percentual de lesões foliares nas mudas. Os resultados demonstraram que a inoculação de *C. siamense* em mudas de guaranazeiro auxiliou na redução do percentual de lesões causadas pelo fitopatógeno. Além disso, a presença do fungo resultou na produção de proteínas totais e PRP em diferentes tempos após a inoculação do fitopatógeno. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto à quantidade de quitinase. Esse é o primeiro registro de indução de resistência em guaranazeiro.

Palavras-chave: fitopatologia, biocontrole, Amazônia, *Paullinia cupana*

INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunt. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da região Amazônica pertencente à família Sapindaceae. É conhecida por suas propriedades estimulantes e medicinais e usada há séculos por comunidades indígenas da Amazônia e mais recentemente pela população local [1]. Após o procedimento de torra e trituração das sementes, o pó obtido pode ser dissolvido em água, ingerido sozinho ou em combinação com outros medicamentos fitoterápicos comercialmente disponíveis [2]. Atualmente, é explorado principalmente pela indústria de refrigerantes [3], embora também seja matéria-prima para indústrias farmacêuticas e de cosméticos no Brasil e no exterior [4].

A antracnose do guaranazeiro é causada por *Colletotrichum* spp., que causam o crestamento das folhas jovens, seguido da queda das mesmas. Dentro das lesões necróticas acérvulos são formados sob condições favoráveis produzindo massas mucilaginosas de conídios [5]. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendente dos ramos e por fim, a da planta [6]. Embora uma variedade de métodos tenha sido testada ao longo dos anos para combater espécies patogênicas nas culturas, o controle químico continua sendo o principal método de controle das antracnoses [5].

O controle biológico de plantas é um método alternativo ao uso de agroquímicos devido a eficiência, com menor custo de manutenção, menor agressividade ao ecossistema e vem ganhando espaço no mundo [7]. Pesquisas têm demonstrado que a interação íntima entre plantas e microrganismos benéficos (fungos e bactérias) podem trazer inúmeros benefícios como a promoção de crescimento e resistência a patógenos e parasitas [8].

A resistência induzida caracteriza-se como o fenômeno de proteção em plantas a organismos fitopatogênicos mediante o uso de indutores bióticos e abióticos. Em relação aos indutores bióticos, diferentes microrganismos (incluindo fungos, bactérias e vírus) são capazes de induzir resistência em uma planta [9,10]. Fungos como indutores bióticos já foram testados em culturas como a uva [11], pepino [12], tomate [13] e cevada [14].

O fungo *Colletotrichum siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D.Hyde já foi isolado como endófito em diferentes hospedeiros [15,16], testado quanto a produção de substâncias antimicrobianas [17], anticolinérgicas [18] e como bio-herbicida [19]. Em trabalhos anteriores [20] foram observadas reduções dos sintomas de antracnose após a inoculação de *C. siamense* infectado com um micovírus na época do plantio em mudas de guaraná do clone BRS-Cereçaporanga. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o fungo endofítico *C. siamense*, isolado de folhas

sadias de guaranazeiro, quando inoculado em mudas de guaranazeiro é capaz de induzir a resistência em plantas do clone BRS-Maués reduzindo ou eliminando os sintomas característicos da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microrganismos

O fungo endofítico *C. siamense* contendo micovírus foi isolado de folhas sadias de guaranazeiro na Fazenda Santa Helena em Maués, Amazonas (3°25'18.1"S, 57°40'40.8"W) e seu potencial de inibição do crescimento do fitopatógeno foi analisado *in vitro* [20,21]. *Colletotrichum fructicola* Prihastuti, L. Cai & K.D.Hyde patogênico foi isolado de folhas de guaranazeiro apresentando lesões necróticas e depositado na Coleção de Culturas do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A patogenicidade de *C. fructicola* foi comprovada através do Postulado de Koch [22].

2. Produção de conídios para o ensaio

O endófito *C. siamense* foi cultivado em tubos de ensaio por sete dias em meio Synthetic Nutrient Agar (SNA) sob regime de alternância luminosa (12/12 h) a 30 °C. Em cada tubo foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada com Tween 80 1% e, posteriormente, foi realizada fricção na superfície do meio com pincel de cerdas macias para liberação dos conídios. Os conídios foram quantificados utilizando câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para a concentração de 5.0×10^3 conídios mL⁻¹. O fitopatógeno *C. fructicola* foi cultivado em PDA, nas mesmas condições, e a concentração de conídios 1.0×10^6 conídios mL⁻¹ foi obtida seguindo o padrão utilizado para espécies de *Colletotrichum* fitopatogênicas [23,24].

3. Ensaio *in vivo*

3.1 Preparo das mudas

As mudas de guaranazeiro selecionadas foram as da cultivar BRS-Maués, gentilmente cedidas pela Empresa Agropecuária Jayoro (Presidente Figueiredo – Amazonas, Brasil). O substrato utilizado era composto por terriço e areia (4:1) e a adubação mineral foi feita com ureia (0.56 kg/m³), KCl (0.3 kg m⁻³) e Fte Br12 (0.2 kg m⁻³). Cerca de 3 kg de substrato foram adicionados em cada saco preto e a adubação de cobertura foi feita mensalmente seguindo as recomendações para a cultura (Pereira 2005). As mudas foram acondicionadas em casa de

vegetação localizada na Área Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da UFAM. O experimento ocorreu no período de dezembro de 2019 a fevereiro de 2020. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos (controle negativo, controle positivo, muda com agente de controle + patógeno, muda com fungicida + patógeno) e 5 repetições onde cada repetição era composta por 10 plantas. Caracterizaram-se como controle negativo as mudas que receberam apenas água e adubação dentro do período do ensaio. As mudas do controle positivo foram as inoculadas apenas com o patógeno.

3.2 Inoculação do agente de controle biológico

As mudas utilizadas nesse ensaio possuíam entre três e quatro folhas completas com folíolos recém-lançados e completamente expandidos. A suspensão fúngica foi aplicada sobre todos os folíolos utilizando um pulverizador elétrico acoplado a um compressor rotativo com 40 lbf/pol² de pressão. Em seguida foi preparada uma câmara úmida com sacos plásticos transparentes que permaneceram por 48 horas. Após esse período, os sacos foram retirados e as mudas foram avaliadas por dez dias até serem desafiadas com a inoculação do fitopatógeno. As mudas do controle negativo foram pulverizadas apenas com água destilada esterilizada.

3.3 Preparo das mudas destinadas ao controle químico

As mudas destinadas ao controle químico foram pulverizadas com uma solução do fungicida Flutriafol com 12,5% m/v de ingrediente ativo preparado de acordo com as instruções do fabricante. No preparo da calda foi adicionado 2,5% (v/v) de espalhante adesivo Agral. A aplicação foi realizada com pulverizador costal elétrico de 20 L entre 7h e 9h da manhã (24 °C, umidade relativa do ar de 90%). A primeira aplicação foi dois dias antes da aplicação do fitopatógeno e a segunda aplicação realizada com intervalo de 15 dias (25°C, umidade relativa do ar de 86%).

3.4 Aplicação do fitopatógeno

A suspensão de *C. fructicola* foi ajustada para a concentração de 1.0×10^6 conídios mL⁻¹. A inoculação do fitopatógeno foi realizada em um único dia em todas as mudas com exceção do controle negativo. Após inoculação do fitopatógeno as mudas foram submetidas durante 48 horas de incubação em câmara úmida com o objetivo de viabilizar a germinação dos conídios e a sua

colonização. A avaliação da severidade nas cultivares foi diariamente durante 28 dias e mensurada utilizando a escala diagramática de antracnose em guaranazeiro [25].

4. Ensaio enzimáticos

4.1 Preparo do extrato enzimático

Para realizar a dosagem das proteínas totais e a atividade enzimática das proteínas relacionadas à patogênese (PRP) folíolos foram coletados aleatoriamente nos tempos 0, 48, 72 e 96 horas após a inoculação do patógeno. Foram coletados 5 folíolos por tratamento de cada repetição. Amostras de 150 mg de folhas foram maceradas em almofariz, adicionando-se 1% (v/v) de polivinilpirrolidona (PVP) e 1,2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5, 1 mM de EDTA). Os extratos foram centrifugados (Centrifuge Excelsa® 4 280-R Fanem) a $17.970 \times g$ por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para microtubos e armazenados a -20 °C [26]. Todas as etapas foram realizadas a 4 °C.

4.2 Proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford em microplaca de 96 poços [27]. Em cada poço foi adicionado 10 µL do extrato enzimático e 250 µL do Reagente de Bradford. Após 2 minutos a 24 °C foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384) a 595 nm. A curva padrão foi com albumina de soro bovino (BSA) e o resultado foi expresso em mg mL^{-1} [28].

4.3 Peroxidase (POX)

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C pelo do método espectrofotométrico direto pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm [29]. Em cada poço de 10 µL foi adicionado do extrato enzimático e 290 µL da solução (250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)). As leituras foram realizadas após 5 minutos de reação. Para o cálculo da atividade enzimática usou-se o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $26.600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em unidade de atividade por mL (U.mL^{-1}) [30].

4.4 Fenilalanina amônia-liase (PAL)

A reação iniciou-se após adição de 30 μL do extrato enzimático à uma mistura contendo 115 μL tampão borato de sódio (0,1 M, pH 8,8) e 55 μL de L-fenilalanina (20 mM) [31]. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30 °C durante 30 minutos. Nas amostras-controle, o extrato foi substituído por 1 mL do tampão borato de sódio. A reação foi finalizada após adição de 6 μL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm e utilizou-se o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular a atividade da PAL, a qual foi expressa em $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ [32].

4.5 Quitinase (CHI)

A atividade da quitinase foi verificada usando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), medindo o grupo final redutor N-acetilglucosamina (NAG) usando quitina coloidal 1% (p/v) como substrato [33]. Foi utilizada a metodologia de Miller [54] com modificações [34]. A reação consistiu na adição de 0,035 mL do extrato enzimático e 0,035 mL de quitina coloidal a 1% em microplacas que foram incubados a 50 °C por 30 min. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0,1 mL de DNS e aquecida em água fervente por 10 min. Em seguida, as amostras foram rapidamente resfriadas à temperatura ambiente adicionando 0,08 mL de água e centrifugadas (Centrifuge 5430 R Eppendorf) a $2.204 \times g$ por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm. Uma unidade de atividade da quitinase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mol de N-acetilglucosamina por minuto, nas condições descritas. A curva padrão foi feita utilizando-se a NAG ($3,3 \text{ mg mL}^{-1}$) e o resultado foi expresso em $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Análise estatística

Os dados originais foram submetidos ao teste de homogeneidade para depois realizar a ANOVA. As médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa SISVAR 5.7 [35]. Os dados de lesão e quantidade de enzimas foram transformados em $\sqrt{(x+1)}$ e submetidos à análise de variância após testar a homogeneidade.

RESULTADOS

1. *Microrganismos*. *Colletotrichum siamense* e o fitopatógeno *C. fructicola* (Figura 1) foram cultivados em PDA para obtenção de inoculantes para mudas de guaraná. O endófito apresentou crescimento uniforme e coloração da colônia típica de *Colletotrichum*. O fitopatógeno apresentou crescimento micelial mais rápido e embora não tenha mostrado massa mucilaginosa de conídios,

ao microscópio mostrou intensa produção deles. Destaque para a presença de apressórios demonstrando a característica patogênica do fungo (Figura 1f).

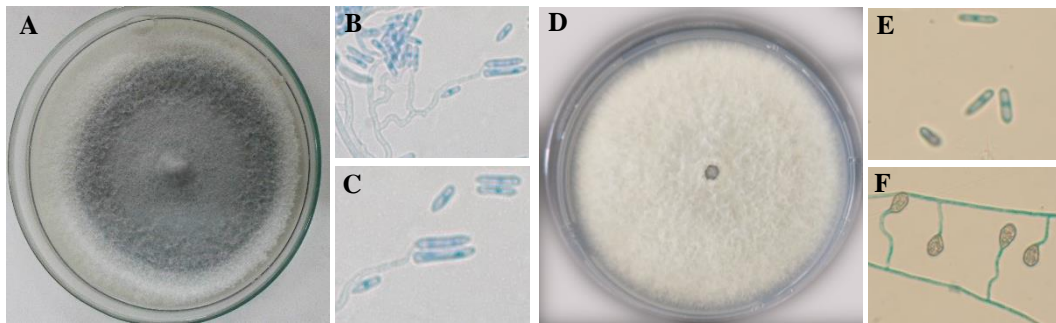


Fig. 1. Estruturas morfológicas dos microrganismos utilizados no experimento. A – Morfologia da colônia de *C. siamense* em PDA. B e C – Hifas e conídios de *C. siamense*. D – Morfologia da colônia de *C. fructicola* em PDA. E e F – Conídios, hifas com apressórios de *C. fructicola*.

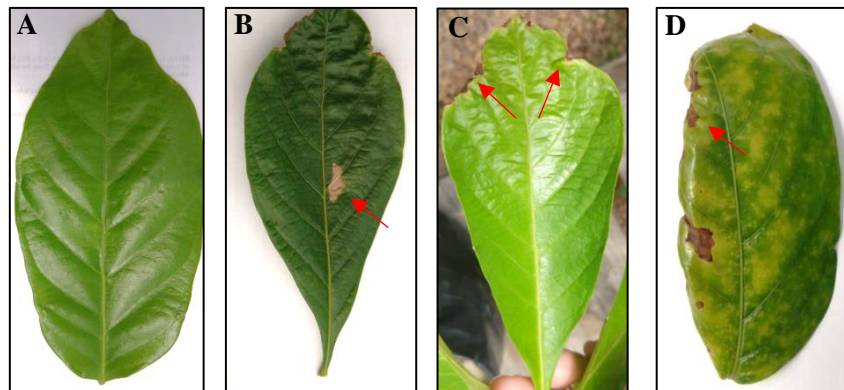


Fig. 2. Folhas de guaranazeiro após experimento. A – Controle negativo. B – Mudas tratadas apenas com o fitopatógeno. C – Tratamento com *C. siamense* + patógeno. D – Tratamento com fungicida + patógeno. As setas indicam os sintomas causados pelo patógeno em folhas de guaranazeiro após 28 dias de experimento.

2. *Ensaio in vitro*. Os primeiros sintomas (setas, Figura 2) foram observados a partir do quinto dia após a inoculação do patógeno. Sintomas como lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom-avermelhada, evoluindo com maior predominância na margem (Figura 2d), crostas no limbo foliar e, nos casos de infecção grave, ressecamento total da folha. A porcentagem de sintomas de cada tratamento pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Percentagem média de lesões em mudas de guaranazeiro após 28 dias do início do tratamento.

Tratamentos	Lesão (%)	C.V. (%)
Controle positivo	1 ± 0.023 a	2.03
<i>Colletotrichum siamense</i> + patógeno	3 ± 0.044 a	1.79
Químico + patógeno	4 ± 0.092 a	2.38

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

3. *Ensaio enzimáticos*. Proteínas totais e PRPs foram quantificadas em folhas coletadas em diferentes momentos. Não houve diferenças significativas nas proteínas totais entre o controle negativo e as mudas infectadas até 96 h após a inoculação do fitopatógeno (Tabela 2).

Tabela 2. Média da produção de proteínas totais em folhas de guaranazeiro

Tratamentos	Proteínas totais (mg mL ⁻¹)				
	Período, em horas, após a inoculação do patógeno				
	0	48	72	96	C.V (%)
CS + patógeno	0.002 ± 0.0007 b	0.003 ± 0.0010 b	0.003 ± 0.0010 a	0.003 ± 0.0007 a	0.32
Q + patógeno	0.003 ± 0.0009 a	0.002 ± 0.0006 a	0.003 ± 0.0009 a	0.003 ± 0.0009 a	0.32
Cont. positivo	0.003 ± 0.0009 a	0.002 ± 0.0010 a	0.002 ± 0.0012 b	0.003 ± 0.0013 a	0.46
Cont. negativo	0.003 ± 0.0014 a	0.003 ± 0.0011 b	0.003 ± 0.0013 a	0.002 ± 0.0011 b	0.42

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

A atividade da POX foi maior nas mudas infectadas do que no controle negativo (Tabela 3). Nos períodos de 48 e 72 horas, as mudas que receberam o endófito apresentaram maior produção de POX do que as mudas do controle negativo. Após 72 horas, houve queda na produção da enzima em todos os tratamentos.

Tabela 3. Média da produção de peroxidase (POX) em folhas de guaranazeiro

Tratamentos	Peroxidase (U.mL ⁻¹)				
	Período, em horas, após a inoculação do patógeno				
	0	48	72	96	C.V (%)
CS + patógeno	2.434 ± 0.39 a	2.533 ± 0.34 a	2.447 ± 0.38 a	2.211 ± 0.46 a	0.16
Q + patógeno	2.030 ± 0.47 b	2.325 ± 0.44 ab	2.591 ± 0.29 a	2.122 ± 0.42 ab	0.18
Cont. positivo	2.061 ± 0.46 b	2,322 ± 0.35 ab	2.577 ± 0.41 a	2.182 ± 0.51 a	0.19
Cont. negativo	1.877 ± 0.49 b	2.132 ± 0.52 b	2.092 ± 0.45 b	1.812 ± 0.52 b	0.24

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

A atividade da PAL aumentou ligeiramente após 48 e 72 h (Tabela 4).

Tabela 4. Média da produção de fenilalanina amonialise (PAL) em folhas de guaranazeiro

Tratamentos	PAL (U.mL ⁻¹)				
	Período, em horas, após a inoculação do patógeno				
	0	48	72	96	C.V (%)

CS + patógeno	0.101 ± 0.02 a	0.098 ± 0.01 ab	0.099 ± 0.01 a	0.087 ± 0.02 a	0.20
Q + patógeno	0.093 ± 0.02 a	0.103 ± 0.02 a	0.093 ± 0.02 ab	0.084 ± 0.02 a	0.23
Cont. positivo	0.097 ± 0.02 a	0.098 ± 0.02 ab	0.085 ± 0.01 bc	0.093 ± 0.02 a	0.22
Cont. negativo	0.085 ± 0.02 a	0.087 ± 0.02 b	0.072 ± 0.01 c	0.079 ± 0.02 a	0.24

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$)

A atividade de CHI aumentou após 48 e 72 h (Tabela 5). A produção de CHI foi bastante aleatória quando comparada a outras enzimas. Apesar dos dados estatísticos mostrarem uma diferença significativa entre os tratamentos ao longo de 72 h, a diferença na quantidade de enzimas foi muito pequena.

Tabela 5. Média da produção de quitinase em folhas de guaranazeiro

Tratamentos	Quitinase (U.mL ⁻¹)				
	Período, em horas, após a inoculação do patógeno				
	0	48	72	96	C.V (%)
CS + patógeno	0.0002 ± 0.00005 a	0.0002 ± 0.00003 b	0.0002 ± 0.00004 a	0.0002 ± 0.00006 a	0.26
Q + patógeno	0.0002 ± 0.00004 a	0.0003 ± 0.00007 a	0.0001 ± 0.00004 b	0.0002 ± 0.00004 a	0.27
Cont. positivo	0.0002 ± 0.00005 a	0.0003 ± 0.00006 a	0.0002 ± 0.00006 a	0.0002 ± 0.00006 a	0.32
Cont. negativo	0.0002 ± 0.00006 a	0.0002 ± 0.00008 b	0.0002 ± 0.0001 a	0.0002 ± 0.00008 a	0.37

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$)

DISCUSSÃO

Neste trabalho *C. siamense* foi inoculado em mudas de guaranazeiro para avaliar o potencial de inibição do fitopatógeno bem como o impacto no hospedeiro quanto à produção de proteínas totais e PRP. Em relação aos ensaios de controle da antracnose foi possível verificar que as mudas inoculadas com *C. siamense* apresentaram percentual menor de lesão quando comparado às mudas tratadas com o controle químico. No entanto, o controle biológico foi inferior ao controle da doença mediado pelos mecanismos de resistência pré-existentes na planta (Tabela 1). Em trabalhos anteriores este mesmo fungo foi utilizado para controle de antracnose em mudas de guaranazeiro (Cereçaporanga) e um percentual de lesões de 5% foi observado. Apesar de neste trabalho as mudas que receberam apenas o patógeno apresentarem o percentual de lesões de 1% em campo esses valores tendem a ser maiores podendo chegar ao percentual de infecção de até 50% em plantas adultas [36]. Além disso, o presente estudo foi conduzido em mudas e para esta

fase da planta não existem dados indicando o percentual de perdas por antracnose para realizar comparação.

Os resultados observados neste trabalho podem ser explicados com base nos seguintes pontos. Neste estudo, a suspensão do agente de biocontrole foi usada na concentração de $5,0 \times 10^3$ conídios/mL. Em ensaios semelhantes utilizando microrganismos para o controle biológico em outras culturas, o inóculo foi aplicado em maior concentração. Por exemplo, em estudos com *Trichoderma asperellum* [37], foi usada uma suspensão na concentração de 5×10^8 UFC para inocular sementes de sorgo, enquanto em outro estudo [38] uma suspensão na concentração de 3×10^5 conídios/mL foi utilizada. Além disso, o número de aplicações do microrganismo também pode influenciar no potencial de controle da doença. Em relação ao número de aplicações do agente de biocontrole, há relatos para outras espécies de duas aplicações com maiores concentrações do microrganismo (10^8 UFC) com intervalo de 15 dias [39].

Muitos estudos apresentam microrganismos como potenciais indutores de resistência e promotores de crescimento. Mudanças de *Camellia sinensis* tratadas com *T. asperellum* TC01 tiveram uma redução de 58.3% na severidade da antracnose causada por *C. gloeosporioides* [38]. Em outro estudo com *T. asperellum* foi verificada a redução do percentual de doença causada por *C. graminicola* para cerca de 33% em plantas de sorgo além do aumento de crescimento vegetativo da planta [37].

A resistência sistêmica induzida por microrganismos é uma característica importante do controle biológico de doenças de plantas [40]. Enzimas como POX, PAL e CHI estão associadas à resistência sistêmica induzida em tecidos vegetais [41]. No guaranazeiro, esta é a primeira investigação sobre a produção de proteínas totais e PRP. Foi verificado que a média de produção das proteínas totais manteve-se estável nas mudas tratadas com *C. siamense* ao longo dos três dias consecutivos de análise e ligeiramente mais alta no período de 48 e 72 horas quando comparada às mudas tratadas apenas com o patógeno (Tabela 2). Acredita-se que a indução da produção dessas proteínas pela planta ocorre mediante a detecção de estruturas microbianas nos tecidos vegetais. Essas estruturas funcionam como elicitores ativando uma cascata de moléculas sinalizadoras e induzindo a expressão de genes que codificam as PRP [42]. O tempo de resposta quanto à produção dessas proteínas varia de acordo com a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro ao fitopatógeno [43], fase do ciclo de vida da planta [44] e o tipo de elicitor utilizado (biótico ou abiótico) [45,46].

No presente estudo, a atividade da POX e PAL foi aumentada após 48 e 72 h em mudas de guaranazeiro infectadas com *C. fructicola* e inoculadas com *C. siamense*. Esse aumento da atividade enzimática pode ser atribuído à redução de lesões características, pois a POX está relacionada a processos de defesa, incluindo resposta de hipersensibilidade, lignificação, suberização e produção de fitoalexina [41]. Em plantas de tabaco, foi inoculada uma suspensão de *Bacillus siamensis* para o controle do fitopatógeno *Alternaria alternata*. A atividade máxima de POX foi observada 72h após a inoculação [47]. Em mudas de grão-de-bico inoculadas com rizobactérias como antagonistas do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* foi observado um aumento na atividade da POX e PAL 20 dias após a inoculação [48]. Foi observado que a inoculação de rizobactérias nas sementes de grão-de-bico promoveu imunidade inata à planta e preveniu sintomas, sugerindo que a fase de inoculação do agente de biocontrole pode interferir na eficiência da ativação da resistência contra fitopatógenos. PAL é a enzima chave na síntese de PRP. Catalisa a desaminação não oxidativa da fenilalanina em ácido trans-cinâmico e amônia, que é uma etapa inicial na biossíntese de compostos fenólicos, incluindo o ácido salicílico (AS) [49]. O AS desempenha papéis fisiológicos importantes como uma molécula sinalizadora para induzir a expressão de genes de resistência contra herbívoros e patógenos [42]. Não houve diferenças significativas na atividade de CHI entre os tratamentos.

As quitinases são geralmente encontradas em pequenas quantidades em vegetais e seu aumento é visto após a exposição a patógenos que possuem quitina em sua estrutura, como fungos, insetos e outros invertebrados [50]. Esperava-se que, após a inoculação do patógeno, houvesse aumento na expressão dessa enzima, o que não foi observado (Tabela 5). Esses resultados podem estar associados ao tipo de folíolo que foi coletado para a obtenção do extrato enzimático. Na metodologia adotada, padronizou-se a coleta aleatória de folíolos que nem sempre apresentavam lesões. Assim, inferiu-se que durante a observação da localização da resposta da planta à presença do patógeno, a quantidade de quitinase nos folíolos saudáveis pode não ser tão alta. Além disso, a atividade desta enzima *in vivo* é complexa, pois está associada a fatores como localização e nível de expressão nas plantas [51]. Por exemplo, quitinases básicas estão localizadas em vacúolos de células vegetais e, possivelmente, não entrarão em contato imediato com fungos que crescem no espaço intercelular [52]. As formas ácidas, por outro lado, são geralmente secretadas no apoplasto ou ambiente extracelular. Outra hipótese é que a resistência intrínseca da planta pode ter utilizado outros mecanismos bioquímicos para suprimir a doença e não necessariamente a produção de enzimas como a quitinase. A primeira linha de defesa da planta é representada por mecanismos

estruturais e bioquímicos que estão presentes antes mesmo do patógeno ser depositado. Cutículas, estômatos, fibras e tricomas são exemplos de mecanismos estruturais, enquanto fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos e de enxofre, fitotoxinas e proteínas / peptídeos são mecanismos bioquímicos pré-formados [53]. Essa dinâmica de fatores interagindo em sinergia explica a distribuição não homogênea das lesões foliares que variaram entre mudas assintomáticas a outras completamente afetadas.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a inoculação de *C. siamense* reduziu a porcentagem de lesões causadas por *C. fructicola* em mudas de guaranazeiro. Além disso, a presença desse endófito promoveu a síntese de proteínas totais e PRP em diferentes momentos após a inoculação do fitopatógeno. Estudos adicionais são necessários para otimizar as condições experimentais e validar o potencial de *C. siamense* para o biocontrole em mudas de guaraná.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM 002/2018 - UNIVERSAL AMAZONAS). Agradecemos também à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e à Empresa Agropecuária Jayoro pelo apoio técnico e consultoria.

REFERÊNCIAS

- [1] F.C. Schimpl, J.F. Silva, J.F.C. Gonçalves and P. Mazzafera “Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon” *Journal of Ethnopharmacology* vol.150, no.1, pp.14-31, 2013.
- [2] L.L.M. Marques, E.D.F. Ferreira, M.N. Paula, T. Klein and J.C.P Mello “*Paullinia cupana*: a multi purpose plant –a review” *Revista Brasileira de Farmacognosia* vol.29, no.1, pp.77–110, 2019.
- [3] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2019) *SIDRA – Banco de Tabelas Estatísticas*. Available on <https://sidra.ibge.gov.br/>.

- [4] M. Patrick, H.A. Kim, H. Oketch-Rabah et al., “Safety of guarana seed as a dietary ingredient: a review” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.67, no.41, pp.11281–11287, 2019.
- [5] M. Dowling, N. Peres, S. Villani and G. Schnabel “Managing *Colletotrichum* on fruit crops: a “complex” challenge” *Plant Disease* vol.104, no.9, pp.2301-2316, 2020.
- [6] J.C.R. Pereira “*Sistemas de Produção 2: Cultura do guaranazeiro no Amazonas*”. 4 ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005.
- [7] J.L. Azevedo, W. Maccheroni-Junior, J.O. Pereira, W.L. Araújo “Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants” *Electronic Journal of Biotechnology*, vol.3, no.1, pp.40-65, 2000.
- [8] T.V. Garcia, N. Knaak and L.M. Fiuza “Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura” *Arquivos do Instituto Biológico* vol.82, pp.1-9, 2015.
- [9] H. Hammerschmidt and E.K. Dann “Induced resistance to disease. In: *Environmentally safe approaches to crop disease control*” (N.A. Rechcigl, J.E. Rechcigl eds). Boca Raton FL. CRC Lewis Publishers pp.177-199, 1997.
- [10] L.P. Boava, O.J. Kuhn, S.F. Pascholati, R.M. Di Piero and E.L. Furtado “Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*” *Tropical Plant Pathology* vol.35, no.2, pp.124-128, 2010.
- [11] M. Perazzolli, S. Dagostin, A. Ferrari, Y. Elad and I. Pertot “Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole” *Biological Control* vol.47, no.2, pp.228–234, 2008.
- [12] M.G.B. Saldajeno and M. Hyakumachi “The plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* stimulate plant growth and reduce severity of anthracnose and damping-off diseases in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings” *Annals of Applied Biology* vol.159, pp.28–40, 2011.
- [13] M. Tucci, M. Ruocco, L. De Masi, M. De Palma, M. Lorito “The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by plant genotype” *Molecular Plant Pathology* vol.12, no.4, pp.341–354, 2011.
- [14] A. Molitor, D. Zajic, L.M. Voll et al., “Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew” *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol.24, no.12, pp.1427–1439, 2011.
- [15] X. Ma, S. Nontachaiyapoom, R.S Jayawardena et al., “Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand” *MycKeys*, vol.43, pp.23-57. 2018.
- [16] L. Zakaria and W.N.W. Aziz “Molecular identification of endophytic fungi from banana leaves (*Musa* spp.)” *Tropical Life Sciences Research* vol.29, no.2, pp.201–211, 2018.
- [17] J. Refaei, E.B.G. Jones, J. Sakayaroj and J. Santhanam “Endophytic fungi from *Rafflesia cantleyi*: species diversity and antimicrobial activity” *Mycosphere*, vol.2, no.4, pp.1-19, 2011.

- [18] T. Naik, S.C. Vanitha, P.K. Rajvanshi et al., “Novel microbial sources of tropane alkaloids: first report of production by endophytic fungi isolated from *Datura metel* L.” *Current Microbiology*, vol.75, no.2, pp.206–212, 2018.
- [19] B. Jongsareejit, P. Tepboonrueng, C. Srisuksam et al., “*Colletotrichum siamense* as a myco-biocontrol agent for management of the tridax daisy (*Tridax procumbens*)” *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 112, Article ID 101563, 12 pages, 2020.
- [20] L.L. Casas, L.N. Almeida, J.O. Pereira, P.Q. Costa-Neto and J.L. “Azevedo *Colletotrichum siamense*, a mycovirus-carrying endophyte, as a biological control strategy for anthracnose in guarana plants” *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol.64, *in press*, 2021.
- [21] T.E. Bezerra “*Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do guaraná (Paullinia cupana var. sorbilis) no controle biológico da antracnose*” Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2015.
- [22] C.S. Bezerra “*Caracterização enzimática de Colletotrichum spp. isolados de Paullinia cupana Kunth. var. sorbilis (Mart.)*” Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, 2017.
- [23] S.R.O Lins, M.S. Abreu and E. Alves “Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro” *Fitopatologia Brasileira*, vol.32, no.6, pp.488-495, 2007.
- [24] L.C.R. Souza “*Resistência de genótipos de pimenta-de-cheiro (Capsicum chinense Jacq.) à antracnose (Colletotrichum brevisporum)*” Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, 2018.
- [25] J.C.R. Pereira and J.C.A. Araújo “*Escala diagramática para quantificar a antracnose do guaranazeiro*” Comunicado Técnico 70. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009.
- [26] E.K. Dann and B.J. Deverall “Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not a fungal leaf spot pathogen” *Plant Pathology* vol.49, no.3, pp.324-332, 2000.
- [27] M.M. Bradford “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” *Analytical Biochemistry*, vol.72, no.1-2, pp.248-254, 1976.
- [28] L. Araújo “*Mecanismos de resistência inata e induzida por ulvana à infecção de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc., agente causal da Mancha Foliar de Glomerella em macieira (Malus domestica Borkh.)*” Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2010.
- [29] M.F.G. Lusso and S.F. Pascholati “Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation” *Summa Phytopathologica*, vol.25, pp.244-249, 1999.
- [30] C.S. Paula, V.C.D. Canteli, C.B. Silva, O.G. Miguel, M.D. Miguel “Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática

- em plântulas de alface” *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* vol.17, no.4, pp.577-584, 2015.
- [31] C.R.S. Curvêlo, F.A. Rodrigues, L.C. Silva, K.J.T. Nascimento and P.G. Berger “Mecanismos bioquímicos da defesa do algodoeiro à mancha de ramulária mediados pelo silício” *Bragantia* vol.72, no.1, pp.41-51, 2013.
- [32] M. Zucker “Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue” *Plant Physiology*, vol.40, no.5, pp.779-784, 1965.
- [33] Y.G Lee, K.C Chung, S.G. Wi, J.C. Lee and H.J. Bae “Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704” *Protein Expression and Purification*, vol.65, no.2, pp.244–250, 2009.
- [34] G.S. Narendrakumar, K.R. Namasivayam, M. Manikanta et al., “Enhancement of biocontrol potential of biocompatible bovine serum albumin (BSA) based protein nanoparticles loaded bacterial chitinase against major plant pathogenic fungi *Alternaria alternata*” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol.15, pp.219-228, 2018.
- [35] D.F. Ferreira “Sisvar: a computer statistical analysis system” *Ciência e Agrotecnologia* vol.35, no.6, pp.1039-1042, 2011.
- [36] J.R. Pereira, J.C.A. Araújo, L. Gasparotto et al., “Avaliação da frequência de infecção da antracnose em clones de guaranazeiro” In: *Pesquisa com guaranazeiro na Embrapa Amazônia Ocidental: Status atual e perspectivas* (J.C.R. Pereira, M.R. Arruda eds). *Embrapa Amazônia Ocidental*, pp.22-28, 2007.
- [37] N. Manzar, Y. Singh, A.S. Kashyap et al., “Biocontrol potential of native *Trichoderma* spp. against anthracnose of great millet (*Sorghum bicolor* L.) from Tarai and hill regions in India” *Biological Control*, vol.152, Article ID 104474, 28 pages, 2021.
- [38] J. Shang, B. Liu and Z. Xu “Efficacy of *Trichoderma asperellum* TC01 against anthracnose and growth promotion of *Camellia sinensis* seedlings” *Biological Control*, vol.143, Article ID 104205, 10 pages, 2020.
- [39] R. Vijayabharathi, S. Gopalakrishnan, A. Sathya, V. Srinivas, M. Sharma “Deciphering the tri-dimensional effect of endophytic *Streptomyces* sp. on chickpea for plant growth promotion, helper effect with *Mesorhizobium ciceri* and host-plant resistance induction against *Botrytis cinerea*” *Microbial Pathogenesis*, vol.122, pp.98–107, 2018.
- [40] L.R. Mélo-Filho and M. Guenther “A resistência sistêmica induzida como alternativa sustentável ao uso de agrotóxicos” *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, vol.8, pp.27-38, 2015.
- [41] K. Prasannath “Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review” *Journal of Agricultural Sciences* vol.11, pp.38-48, 2017.
- [42] M Kamle, R Borah, H Bora et al., “Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens” In: *Fungal*

- Biotechnology and Bioengineering* (A.E. Hesham et al. eds.) *Fungal Biology*, pp.457-470, 2020.
- [43] M. B. Amira, D. Lopez, A. T. Mohamed et al., “Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees” *Biological Control*, vol.110, pp.70–78, 2017.
- [44] A. A. Alzandi and D. M. Naguib, “*Pseudomonas fluorescens* metabolites as biopriming agent for systemic resistance induction in tomato against *Fusarium wilt*” *Rhizosphere*, vol.11, Article ID 100168, 4 pages, 2019.
- [45] G. Franzener, K.R.F. Schwan-Estrada, G.S. Moura, O.J. Kuhn and J.R. Stangarlin “Induction of defense enzymes and control of anthracnose in cucumber by *Corymbia citriodora* aqueous extract” *Summa Phytopathologica*, vol.44, no.1, pp.10-16, 2018.
- [46] M. Jangir, R. Pathak, S. Sharma and S. Sharma “Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*” *Biological Control*, vol.123, pp.60-70, 2018.
- [47] Z. Xie, M. Li, D. Wang et al., “Biocontrol efficacy of *Bacillus siamensis* LZ88 against brown spot disease of tobacco caused by *Alternaria alternata*” *Biological Control*, vol.154, Article ID 104508, 8 pages, 2021.
- [48] P. Kumari and V. Khanna “Seed bacterization stimulated resistance in chickpea against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*” *Indian Phytopathology*, vol.72, pp.689–697, 2019.
- [49] C.F. Fernandes, J.R. Vieira-Júnior, D.S.G. Silva, N.D. Reis and H. Antunes-Júnior. *Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos*. Embrapa, Rondônia. 2009.
- [50] R. Hamid, M. A. Khan, M. Ahmad et al., “Chitinases: na update” *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, vol.5, no.1, pp.21-29, 2013.
- [51] P.G.C. Landim “*Produção em Pichia pastoris de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica*” Tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2011.
- [52] J. Neuhaus, L. Sticher, F. Meins and T. Boller “A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, pp.10362-10366, 1991.
- [53] D. Debona and F. A. Rodrigues. Capítulo 5 – Alterações bioquímicas e estruturais em plantas induzidas após a detecção do patógeno. In: (L. J. Dallagnol ed.) *Resistência genética: de plantas a patógenos*. Pelotas: Ed.UFPel, 2018.
- [54] G.L. Miller “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar” *Analytical Chemistry* vol.31, no.3, pp.426-428, 1959.

CONCLUSÃO

Após os estudos conduzidos, foi possível elaborar as seguintes conclusões:

- A inoculação de *C. siamense* em estacas de guaranazeiro auxiliou na redução do percentual de lesões causadas por *C. fructicola* quando este foi inoculado na fase de muda.

- A presença do fungo auxiliou no crescimento vegetativo da planta refletindo no aumento da parte aérea da muda. Foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto aos teores de macro e micronutrientes nos tecidos foliares.

- A inoculação de *C. siamense* nas partes aéreas de mudas de guaranazeiro reduziu a porcentagem de lesões causadas por *C. fructicola* quando comparadas ao controle químico.

- A inoculação desse endófito promoveu a síntese de proteínas totais e PRP em diferentes momentos após a inoculação do fitopatógeno.

Estudos adicionais são necessários para otimizar as condições experimentais e validar o potencial de *C. siamense* para o biocontrole em mudas de guaraná.

REFERÊNCIAS

ANAGNOSTAKIS, S. L.; DAY, P. R. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, v. 69, p. 1226–1229, 1979.

ÂNGELO, P.C.S.; NUNES-SILVA, C.G.; BRIGÍDIO, M.M.; AZEVEDO, J.S.N.; ASSUNÇÃO, E.N.; SOUS, A.R.B.; PATRÍCIO, F.J.B.; REGO, M.M.; PEIXOTO, J.C.C.; OLIVEIRA-JUNIOR, W.P.; FREITAS, D.V.; ALMEIDA, E.R.P.; VIANA, A.N.H.A.; SOUZA, A.F.P.N.; ANDRADE, E.V.; ACOTA, P.O.A.; BATISTA, J.S.; WALTER, M.E.M.T.; LEOMIL, L.; ANJOS, D.A.S.; COIMBRA, R.C.M.; BARBOSA, M.H.N.; HONDA, E.; PEREIRA, S.S.; SILVA, A.; PEREIRA, J.O.; SILVA, M.L.; MARINS, M.; HOLANDA, F.J.; ABREU, R.M.M.; PANDO, S.C.; GONÇALVES, J.F.C.; CARVALHO, M.L.; LEAL-MESQUITA, E.R.R.B.P.; SILVEIRA, M.A.; BATISTA, W.C.; ATROCH, A.L.; FRANÇA, S.C; PORTO, J.I.R.; SCHNEIDER, M.P.C.; ASTOLFI-FILHO, S. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*, an anciently consumed stimulant from the Amazon rains: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v.27, p.117-124, 2008.

ARAÚJO, I.L.; FREITAS, D.V.; NUNES-SILVA, C.G.; ASTOLFI-FILHO, S. Guaraná, os segredos moleculares de uma planta lendária. **Ciência Hoje**, v.43, p.30-35, 2009.

ASENSIO, N.H.; MÁQUEZ, S.S.; ZABALGOGEAZCOA, I. Mycovirus effect on the endophytic establishment of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in tomato and bean plants, **Bio Control**, v.58, n. 2, p.225–232, 2013.

AZEVEDO, J. Micro-organismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J. (Org.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 117–137.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65, 2000.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Kew. CAB International, 1992.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A., JEGER, M.J. (Eds). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford, U.K: CAB International, 1992, p.88-120.

BANKS, G.T.; BUCK, K.W.; CHAIN, E.B.; HIMMELWEIT, F.; MARKS, J.E.; TYLER, J.M. Viruses in fungi and interferon stimulation. **Nature**, v.218, p.542-545, 1968.

BATISTA, B.D.; ALMEIDA, J.R.; BEZERRA, T.E.; AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M.C. **Describing the unexplored microorganisms associated with guarana: a typical tropical plant**. In Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics (QUECINE, M.C. & AZEVEDO, J.L eds.), Springer, cap. 13, p.293-312, 2017.

BHATTI, M.F.; JAMAL, A.; BIGNELL, E.M.; PETROU, M.A.; COUTTS, R.H.A. Incidence of dsRNA mycoviruses in a collection of *Aspergillus fumigatus* isolates. **Mycopathologica**, v.174, p.323–326, 2012.

BENTES, J.L.S. 62p. **Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque em guaranazeiro**. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.71-77, 2002.

BEZERRA, T.E. **Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) no controle biológico da antracnose**. 106f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas. 2015.

BONATELLI, M.L.; TSUI, S.; MARCON, J.; BATISTA, B.D.; KITAJIMA, E.W.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M.C. Antagonistic activity of fungi from anthracnose lesions on *Paullinia cupana* against *Colletotrichum* sp. **Journal of Plant Pathology**, v.98, p.197–205, 2016.

BUCK, K.W. From interferon induction to fungal viruses. **European Journal of Epidemiology**, v.4, p.395-399, 1988.

CAMPO, S.; GILBERT, K.B.; CARRINGTON, J.C. Small RNA-Based Antiviral Defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. **PLOS Pathogens**, v.12, n.6, p.1-36, 2016.

CARVALHO, L.V.N., CORDEIRO, M.F., LINS, T.U.L., SAMPAIO, M.C.P.D., MELLO, G.S.V., COSTA, V.C.M., MARQUES, L.L.M., KLEIN, T., MELLO, J.C.P., CAVALCANTI, I.M.F., PITTA, I.R., PITTA, M.G.R., RÊGO, M.J.B.M. Evaluation of antibacterial, antineoplastic, and immunomodulatory activity of *Paullinia cupana* seeds crude extract and ethyl-acetate fraction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-8, 2016.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; CASTILLO, A. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.228, p.87-91, 2003.

CHEN, B.; NUSS, D.L. Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Journal of Virology**, v.73, p.985–992, 1999.

CHIBA, S; SALAIPETH, L.; LIN, Y.; SASAKI, A.; KANEMATSU, S.; SUZUKI, N. A novel bipartite dsRNA mycovirus from the White root rot fungus *Rosellinea necatrix*, molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biocontrol. **Journal of Virology**, v.83, p.12801-12812, 2009.

CHOI, G.H.; NUSS, D.L. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. **Science**, v.257, p.800–803, 1992.

CHU, Y.M.; JEON, J.; YEA, S.; KIM, Y.; YUN, S.; LEE, Y.; KIM, K. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology** v.68, p.2529–2534, 2002.

COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.31-40.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Guaraná – análise mensal. Outubro de 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-guarana/item/download/29703_67257be7f2cbf5c804ed33f6f5e41c9b> Acesso em jan 2021.

CONRATH, U.; BECKERS, G.J.M.; LANGENBACH, C.J.G.; JASKIEWICZ, M.R. Priming for enhanced defense. **Annual Review of Phytopathology**, v.53, p.97–119, 2015.

COSTA, R.S.C.; FERREIRA, M.G.R. **Instruções para o cultivo do guaranazeiro em Rondônia**. Embrapa: Porto Velho, 2011. 2p.

DALE, J.L.; MANNERS, J.M.; IRWIN, J.A.G. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double-stranded RNAs. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, n.4, p.671-676, 1988.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J.Z.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v.110, p.1475–1481, 2006.

DARISSA, O.; GUNTER, A.; SCHÄFER, W. A dsRNA mycovirus causes hypovirulence of *Fusarium graminearum* to wheat and maize. **European Journal of Plant Pathology**, v.134, p.181-189, 2012.

DENG, F.; XU, R.; BOLAND, G.J. Hypovirulence-associated doublestranded RNA from *Sclerotinia homeocarpa* is conspecific with *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a-Ld. **Phytopathology**, v.93, p.1407-1414, 2003.

DOUBLE, M.L.; JAROSZ, A.M.; FULBRIGHT, D.W.; BAINES, A.D.; MACDONALD, W.L. Evaluation of two decades of *Cryphonectria parasitica* hypovirus introduction in an American chestnut stand in Wisconsin. **Phytopathology**, v.108, p.702–710, 2018.

DOWLING, M., PERES, N., VILLANI, S., SCHNABEL, G., 2020. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: a “complex” challenge. *Plant Disease* vol.104, no.9, pp.2301-2316. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-19-2378-fe>

ERICKSON, H.T.; CORRÊA, M.P.F.; ESCOBAR, J.R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in Brazilian Amazonia. **Economic Botany**, v.38, p.273-286, 1984.

EUSEBIO-COPE, A.; SUN, L.; TANAKA, T.; CHIBA, S.; KASAHARA, S.; SUZUKI, N. The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. **Virology**, v.477, p.164-175, 2015.

FERNANDES, C.F.; VIEIRA-JÚNIOR, J.R.; SILVA, D.S.G.; REIS N.D.; ANTUNES-JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Embrapa, Rondônia. 2009.

FIGUEIRÊDO, L.C., FIGUEIRÊDO, G.S., GIANCOLI, A.C.H., TANAKA, F.A.O., SILVA, L.A.O., KITAJIMA, E.W., ASTOLFI-FILHO, S., AZEVEDO, J.L., 2012. Detection of isometric, dsRNA-containing viral particles in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cashew tree. **Tropical Plant Pathology**, v.37, n.2, p.142-145.

FREITAS, D.V. 70f. **Caracterização genômica e molecular do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis*)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

FULBRIGHT, D.W.; WEIDLICH, W.H.; HAUFLER, K. Z.; THOMAS, C. S.; PAUL, C.P. Chestnut blight and recovering American chestnut trees in Michigan. **Canadian Journal of Botany**, v.61, p.3164-3171, 1983.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; CACAS, J-L.; MÉTRAUX, J-P. Mechanisms of defense to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D. R.; NEWTON, A.C.; LYON, G.D. (Org.). **Induced Resistance for Plant Defense**. Oxford: Blackwell Publishing, 2014, p.106–136.

GHABRIAL, S.A.; CASTÓN, J.R.; JIANG, D.; NILBERT, M.L.; SUZUKI, N. 50-plus years of fungal viroses. **Virology**, v.479-480, p.356–368, 2015.

GHABRIAL, S.A.; SUZUKI, N. Viruses of plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v.47, n.1, p.353-384, 2009.

GONÇALVES, A.E.; VELHO, A.C.; STADNIK, M.J. Formation of conidial anastomosis tubes and melanization of appressoria are antagonistic processes in *Colletotrichum* spp. from apple. **European Journal of Plant Pathology**, v.146, p.497–506, 2016.

GOULART, A.C.P. Detecção e controle químico de *Colletotrichum* em sementes de soja e algodão. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, v.100, p.1-33, 2009.

GRASSE, W.; ZIPPER, R.; TOTSKA, M.; SPRING, O. Plasmopara halstedii virus causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. **Fungal Genetics and Biology**, v.57, p.42-47, 2013.

HAMID, R.; KHAN, M.A.; AHMAD, M.; AHMAD, M.M.; ABDIN, M.Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: na update. **Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences**, v.5, n.1, p.21-29, 2013.

HAMMOND, T. M.; ANDREWSKI, M.D.; ROOSSINCK, M.J.; KELLER, N. P. Aspergillus mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. **Eukaryotic Cell**, v.7, p.350–357, 2008.

HARTLEY, S.E., GANGE, A.C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualismo in a multitrophic context. **Annual Review of Entomology**, v.54, p.323-342, 2009.

HEIMPEL, G. E.; MILLS, N. **Biological Control - Ecology and Applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 2017. 386p.

HEINIGER, U.; RIGLING, D. Biological control of chestnut blight in Europe. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.581–599, 1994.

HILLMAN, B.I.; TIAN, Y.; BEDKER, P.J.; BROWN, M.P. A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. **Journal of General Virology**, v.73, p.681-686, 1992.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R.E. (Org.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.87-113.

HOLLINGS, M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. **Nature**, v.196, n.4858, p.962-965, 1962.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v.39, p.147-183, 2009.

HYDER, R.; PENNANEN, T.; HAMBERG, L.; VAINIO, E.J.; PIRI, T.; HANTULA, J. Two viruses of *Heterobasidion* confer beneficial, cryptic or detrimental effects to their hosts in different situations. **Fungal Ecology**, v.6, p.387–396, 2013.

IKEDA, K.; NAKAMURA, H.; MATSUMOTO, N. Hypovirulent strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. **Journal of General Plant Pathology**, v.69, p.385-390, 2003.

JAMAL, A. **Incidence and characterisation of mycoviruses from *Aspergillus fumigatus***. 243f. Tese (Pós-doutorado) Departamento de Ciências Biológicas, Colledge Universidade, Londres. 2010.

JAMAL, A.; BIGNELL, E.M.; COUTTS, R.H.A. Complete nucleotide sequences of four dsRNAs associated with a new chrysovirus infecting *Aspergillus fumigatus*. **Virus Research**, v.153, p.64–70, 2010.

JIA, H.; DONG, K.; ZHOU, L.; WANG, G.; HONG, N.; JIANG, D.; XU, W. A dsRNA virus with filamentous viral particles. **Nature Communications**, v.8, n.168, p. 1-12, 2017.

KAMLE, M.; BORAH, R.; BORA, H.; JAISWAL A.K.; SINGH, R.K.; KUMAR, P. Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens In: (HESHAM, A.E.; UPADHYAY, R.S.; SHARMA, G.D.; MANOHARACHARY, C.; GPTA, V.K. (Org.) **Fungal Biotechnology and Bioengineering** Springer. 2020. p.457-470.

KANEMATSU, S.; SHIMIZU, T.; SALAIPETH, L.; YAEGASHI, H.; SASAKI, A.; ITO, T.; SUZUKI, N. Genome rearrangement of a mycovirus *Rosellinia necatrix megabirnavirus 1*

affecting its ability to attenuate virulence of the host fungus. **Virology**, v.450-451, p.308-315, 2014.

KHALIFA, M.E.; PEARSON, M.N. Characterization of a novel hypovirus from *Sclerotinia sclerotiorum* potentially representing a new genus within the *Hypoviridae*. **Virology**, v.464, p.441-449, 2014.

KHALIFA, M.E; PEARSON, M.N. Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. **Virology**, v.441, p.22-30, 2013.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier/Academic Press, 2012. 1327p.

KIRICHENKO, A. N.; TSYGANENKO, K. S.; OLISHEVSKAYA, S. V. Hypovirulence of mycoviruses as a tool for biotechnological control of phytopathogenic fungi. **Cytology and Genetics**, v.52, n.5, p.374–384, 2018.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W.J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v.53, n.1, p.97-119, 2019.

KURIAN, S.M.; PIETRO, A.D.; READ, N.D. Live-cell imaging of conidial anastomosis tube fusion during colony initiation in *Fusarium oxysporum*. **PLoS One**, v.13, n.5, p.1-32, 2018.

LAKSHMAN, D.K.; JIAN, J.; TAVANTZIZ, S.M. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafuncional AROM protein of the shikimate pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.11, p.6425–6429, 1998.

LANDIM, P.G.C. **Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2011.

LATA, R.; CHOWDHURY, S.; GOND, S.K.; WHITE JR, J.F. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. **Letters in Applied Microbiology**, v.66, p.268-276, 2018.

LECOQ, H.; BOISSONNET-MENES, M.; DELHOTAL, P. Infectivity and transmission of fungal viruses. In: Molitoris, H.P.; Hollings, M.; Wood, H.A (Org.). **Fungal Viruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. p. 34–47.

LEU, L.S. **Anastomosis in *Venturia inaequalis***. University of Wisconsin, Wisconsin. 1967.

LI, P.; LIN, Y.; ZHANG, H.; WANG, S.; QIU, D.; GUO, L. Molecular characterization of a novel mycovirus of the family *Tymoviridae* isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Virology**, v.489, p.86-94, 2016.

- LI, P.; ZHANG, H.; CHEN, X.; QIU, D.; GUO, L. Molecular characterization of a novel hypovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Virology**, v.481, p.151-160, 2015.
- LIAO, C.; CHEN, M.; CHEN, Y.; WANG, T.; SHEU, Z.; KUO, K.; CHANG, P.L.; CHUNG, K.; LEE, M. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, p.599–608, 2012.
- LIMA, J. S.; FIGUEIREDO, J. G.; GOMES, R. G.; STRINGARI, D.; GOULIN, E. H.; ADAMOSKI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; GLIENKE, C. Genetic diversity of *Colletotrichum* spp. an endophytic fungi in a medicinal plant, brazilian pepper tree. **International Scholarly Research Network**, p.1-7, 2012.
- LIMA, N.D.; TEIXEIRA, L.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M.L. Guarana (*Paullinia cupana*) stimulates mitochondrial biogenesis in mice fed high-fat diet. **Nutrients**, v.10, n.2, p.1-12, 2018.
- LIN, Y.H.; CHIBA, S.; TANI, A.; KONDO, H.; SASAKI, A.; KANEMATSU, S.; SUZUKI, N. A novel quadripartite dsRNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*. **Virology**, v.426, p.42-50, 2012.
- LIU, L.; XIE, J.; CHENG, J.; FU, Y.; LI, G.; YI, X.; JIANG, D. Fungal negative-stranded RNA virus that is related to bornaviruses and nyaviruses. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.111, p.12205-12210, 2014.
- MA, G.; ZHANG, X.; HUA, H.; ZHOU, T.; WU, X. Molecular and biological characterization of a novel strain of *Alternaria alternata chrysovirus 1* identified from the pathogen *Alternaria tenuissima* causing watermelon leaf blight. **Virus Research**, v.280, p.1-5, 2020.
- MARQUES, L.L.M.; FERREIRA, E.D.F.; PAULA, M.N.; KLEIN, T.; MELLO, J.C.P. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.29, p.77-110, 2019.
- MÁRQUEZ, L.M.; REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J.; ROOSSINCK, M.J. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, v.315, p.513-515, 2007.
- MARZANO, S.L.; NELSON, B.D.; AJAYI-OYETUNDE, O.; BRADLEY, C.A.; HUGHES, T.J.; HARTMAN, G.L.; EASTBURN, D.M.; DOMIER, L.L. Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. **Journal of Virology**, v.90, n.15, p.6846-6863, 2016.
- MEHTA, N.; BAGHELA, A. Quorum sensing-mediated inter-specific conidial anastomosis tube fusion between *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. siamense*. **IMA Fungus**, v.12, n.7, p.1-17, 2021.
- MENEGHETTI, G.A.; SANTOS, A.C.; SILVA, L.J.S.; FERREIRA, M.A.C. Elementos para reflexão e análise das condições de produção do guaraná no Amazonas. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural – SOBER**, p.1-15, 2021.

MILGROOM, M.G.; HILLMAN, B.I. **The ecology and evolution of fungal viruses**. In: HURST, D. J. (Org.). **Studies in viral ecology: microbial and botanical host systems**. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011. p.217-253.

MINGORI, M.R.; HEIMFARTH, L.; FERREIRA, C.F.; GOMES, H.M.; MORESCO, K.S.; DELGADO, J., RONCATO S.; ZEIDAN-CHULIA, F.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F. Effect of *Paullinia cupana* Mart. commercial extract during the aging of middle age Wistar rats: differential effects on the hippocampus and striatum. **Neurochemical Research**, v.42, n.8, p.2257–2273, 2017.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; CRAVO, M.S.; GARCIA, T.B.; RIBEIRO, J.R.C. LIMA, L.P.; FERREIRA, J.O. **Novos clones de guaranazeiro para o estado do Amazonas**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n°8, p.1-3, 2000.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; CRAVO, M.S.; MACÊDO, J.L.C.; GARCIA, T.B.; COSTA JÚNIOR, R.C.; LIMA, L.P.; RIBEIRO, J.R.C. **Clones de guaranazeiro para o estado do Amazonas**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n°1, p.1-3, 1999.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; PEREIRA, J.C.R.; ARAÚJO, J.C.A. **Cultivar BRS Mundurucânia: Resistente e Produtiva**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n°54, p.1-2, 2007a.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; PEREIRA, J.C.R.; ARAÚJO, J.C.A. **BRS Andirá: cultivar de alta resistência e resistente às principais doenças**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n°55, p.1-2, 2007b.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; PEREIRA, J.C.R.; ARAÚJO, J.C.A. **BRS Cereçaporanga: nova cultivar para o agronegócio do guaraná**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n°56, p.1-2, 2007c.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; PEREIRA, J.C.R.; ARAÚJO, J.C.A. **BRS Luzéia: nova cultivar para o agronegócio do guaraná no estado do Amazonas**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n°57, p.1-2, 2007d.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; PEREIRA, J.C.R.; SOUZA, N.R. **BRS Luzéia: nova cultivar de guaranazeiro para o estado do Amazonas**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n°82, p.1-2, 2009a.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; PEREIRA, J.C.R.; SOUZA, N.R. **BRS Marabitana: nova opção de guaranazeiro para o estado do Amazonas**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico n° 83, p.1-2, 2009b.

NAZARÉ, R.F.R.; FIGUEIRÊDO, F.J.C. **Contribuição ao estudo do guaraná**. Belém: EMBRAPA, 1982. 40p.

NEUHAUS, J.; STICHER, L.; MEINS, F.; BOLLER, T. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.10362-10366, 1991.

NIU, Y.; ZHANG, T.; ZHU, Y.; YUAN, Y.; WANG, S.; LIU, J.; LIU, D. Isolation and characterization of a novel mycovirus from *Penicillium digitatum*. **Virology**, v.494, p.15–22, 2016.

NUSS, D.L. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.632–642, 2005.

O'CONNELL, R.J.; THON, M.R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S.G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M.F.; DAMM, U.; BUIATE, E.A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N. *et. al.* Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum fungi* deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, p.1060–1065, 2012.

OLIVEIRA, E.R.N. **Características morfofisiológicas e bioquímicas de clones de guaraná *Paullinia cupana* Kunt. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke cultivados sob plantio comercial na Amazônia**. 125f. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2014.

PAOLETTI, M.; SAUPE, S.J. Fungal incompatibility: evolutionary origin in pathogen defense? **Bioessays**, v.31, p.1201-1210, 2009.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidase have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Report**, v.24, p.255-265, 2005.

PEARSON, M. N.; BEEVER, R. E.; BOINE, B.; ARTHUR, K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.10, n.1, p.115-128, 2009.

PEREIRA, J.C.R. **Sistemas de Produção 2: Cultura do guaranazeiro no Amazonas**. 4 ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v.27, p.186–198, 1999.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. *In*: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Org.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p.179-187.

PETRZIK, K.; SARKISOVA, T.; STARÝ, J.; KOLONIUK, I.; HRABÁKOVÁ, L.; KUBEŠOVÁ, O. Molecular characterization of a new monopartite dsRNA mycovirus from mycorrhizal *Thelephora terrestris* (Ehrh.) and its detection in soiloribatid mites (Acari: Oribatida). **Virology**, v.489, p.12-19, 2016.

PICARELLI, M.A.S.C.; GOBATTO, D.; PATRÍCIO, F.; RIVAS, E.B.; COLARICCIO, A. Virus infecting phytopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, p.1-15, 2017.

PIETERSE, C.M.J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R.L.; WELLER, D.M.; VAN WEES, S.C.M.; BAKKER, P. A.H.M. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v.52, p.347–375, 2014.

POMPORTES, L., BRISSWALTER, J., CASINI, L., HAYS, A., DAVRANCHE, K. Cognitive performance enhancement induced by caffeine, carbohydrate and guarana mouth rinsing during submaximal exercise. **Nutrients**, v.9, n.6, p.1-17, 2017.

PRASANNATH, K. Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review. **Journal of Agricultural Sciences**, v.11, pp.38-48, 2017.

PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Reduction of Laccase activity and other hypovirulence-associated traits in dsRNA-containing strains of *Diaporthe ambigua*. **Phytopathology**, v.86, p.1311-1316, 1996.

RAWLINSON, C. J.; CARPENTER, J. M.; MUTHYALU, D G. Double-stranded rna virus in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.65, n.2, p.305-341, 1975.

ROBIN C.; HEINIGER, U. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**, v.76, p.361–367, 2001.

ROCA, M.G.; DAVIDE, L.C.; DAVIDE, M.L.C.; MENDES-COSTA, M.C.; SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. **Mycological Research**, v.108, n.11, p.1320-1326, 2004.

ROCA, M.G.; DAVIDE, L.C.; MENDES-COSTA, M.C. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, v.40, n.2, p.138-145, 2003.

ROCA, M.G.; ARLT J.; JEFFREE, C.E.; READ, N.D. Cell Biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryot Cell**, v.4, n.5, p.911–919, 2005.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.5, p.1109–14, 2008.

ROMON-OCHOA, P.; GORTON, C.; LEWIS, A.; VAN DER LINDE, S.; WEBBER, J.; PÉREZ-SIERRA, A. Hypovirulent effect of the *Cryphonectria hypovirus 1* in British isolates of *Cryphonectria parasitica*. **Pest Management Science**, v.76, p.133-1343, 2020.

ROSSETO, P.; A.T. COSTA; J.C. POLONIO; A.A. DA SILVA; J.A. PAMPHILE; J.L. AZEVEDO. Investigation of mycoviruses in endophytic and phytopathogenic strains of *Colletotrichum* from different hosts. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.1, p. 1-11, 2016.

SCHIMPL, F.C.; SILVA, J.F.; GONÇALVES, J.F.C.; MAZZAFERA, P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, n.150, p.14–31, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. *In*: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Org.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SHAPIRA, R.; CHOI, G.H.; NUSSO, D.J. Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. **The EMBO Journal**, v.10, p.731-739, 1991.

SHARMA, I. Phytopathogenic fungi and their biocontrol applications. *In*: SHARMA V.K.; PARMAR S.; SHAH M.P.; KUMAR A. (Org.). **Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology**. Elsevier, 2020, p.155-188.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases – na organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.303-312, 1993.

SILVA, M.C.S.; POLONIO, J.C.; QUECINE, M.C.; ALMEIDA, T.T.; BOGAS, A.C.; PAMPHILE, J.A.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, J.L. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbial Pathogenesis**, v.98, p.16–22, 2016.

SKIPP, R.A.; BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, H.A.; TEMPLETON, D. *Colletotrichum*. *In*: KOMOTO, K.; SINHG, U.S.; SINHG, R.P. (Eds.). **Pathogenesis and host specificity in planta disease: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. New York. USA: Pergamon, 1995, v.2, p.119-136.

SON, M.; YU, J.; KIM, K.H. Five questions about mycoviruses. **Plos Pathogens**, v.11, n.11, p.1-7, 2015.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2011.

SUFRAMA (Superintendência da Zona Franca de Manaus). Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica: guaraná. Vol.6. Manaus: ISAE, 2003. 18p.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfect with picnidia acervuli and stromata**. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1990.

SUTTON, B.C. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. *In*: *Colletotrichum: biology, pathology and control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, Wallingford: p.1-26, 1992.

SUZUKI, N.; SUPYANI, S.; MARUYAMA, K.; HILLMAN, B.I. Complete genome sequence of Mycoreovirus-1/ Cp9B21, a member of a novel genus within the family Reoviridae, isolated from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Journal of General Virology**, v.85, p.3437–3448, 2004.

TAVARES, A.M.; ATROCH, A.L.; NASCIMENTO FILHO, F.J.; PEREIRA, J.C.R.; ARAÚJO, J.C.A.; MORAES, L.A.C. **Cultura do Guaranazeiro no Amazonas**. 4 ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. 40 p.

TORRES-TRENAS, A.; PRIETO, P.; CAÑIZARES, M.C.; GARCÍA-PEDRAJAS, M.D.; PÉREZ-ARTÉS, E. Mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi Virus 1 decreases the colonizing efficiency of its fungal host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.9, n.51, p.1-12, 2019.

TSUI, S. **Estudo da diversidade de bactérias associadas ao guaranazeiro (*Paullinia cupana* (Mart.) Ducke.) visando o controle de antracnose**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.

URAYAMA, S.; KATO, S.; SUZUKI, Y.; AOKI, N.; LE, M.T.; ARIE, T.; TERAOKA, T.; FULUHARA, T.; MORIYAMA, H. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Journal of General Virology**, v.91, p.3085-3094, 2010.

URAYAMA, S.; SAKODA, H.; TAKAI, R.; KATOH, Y.; MINH LE, T.; FUKUHARA, T.; TERAOKA, T.; MORIYAMA, H. A dsRNA mycovirus, *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-B, suppresses vegetative growth and development of rice blast fungus. **Virology**, v.448, p.265-273, 2014.

VAINIO, E.J.; JURVANSUU, J.; HYDER, R.; KASHIF, M.; PIRI, T.; TUOMIVIRTA, T.; POIMALA, A.; XU, P.; MÄKELÄ, S.; NITISA, D.; HANTULA, J. Heterobasidion Partitivirus 13 mediates severe growth debilitation and major alterations in the gene expression of a fungal forest pathogen. **Journal of Virology**, v.92, n.5, p.1-15, 2018.

VAINIO, E.J.; KORHONEN, K.; TUOMIVIRTA, T.T.; HANTULA, J. A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. **Fungal Biology**, v.114, p.955–965, 2010.

VAN DIEPENINGEN, A.D.; DEBETES, A.J.M.; HOEKSTRA, R.F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. **Fungal Genetics and Biology**, v.43, p.446-452, 2006.

WANG, L.P.; JIANG, J.J.; WANG, Y.F.; HONG, N.; ZHANG, F.; XU, W.X.; WANG, G.P. Hypovirulence of phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*: association with a coinfecting chrysovirus and a partitivirus. **Journal of Virology**, v.88, p.7517-7527, 2014.

WANG, Q.; CHENG, S.; XIAO, X.; CHENG, J.; FU, Y.; CHEN, T.; JIANG, D.; XIE, J. Discovery of two mycoviruses by high-throughput sequencing and assembly of mycovirus-derived small silencing RNAs From a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Front. Microbiol.**, v.10, p.1-12, 2019.

WANG, S.; KONDO, H.; LIU, L.; GUO, L.; QIU, D. A novel virus in the family Hypoviridae from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Virus Res.**, v.174, p.69-77, 2013.

WANG, S.; ONGENA, M.; QIU, D.; GUO, L. Fungal viruses: promising fundamental research and biological control agents of fungi. **SM Virology**, v.2, n.1, p.1011-1015, 2017.

WANG, S.; ZHANG, J.; LI, P.; QIU, D.; GUO, L. Transcriptome-Based discovery of *Fusarium graminearum* stress responses to FgHV1 infection. **International Journal of Molecular Science**, v.1922, n.17, p.1-15, 2016.

WU, M.; JIN, F.; ZHANG, J.; YANG, L.; JIANG, D. Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the pathogenic fungus *Botrytis porri*. **Journal of Virology**, v.86, p.6605-6619, 2012.

WU, M.; ZHANG, L.; LI, G.; JIANG, D.; GHABRIAL, S.A. Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Virology**, v.406, p.117-126, 2010.

XIAO, X.; CHENG, J.; TANG, J.; FU, Y.; JIANG, D.; BAKER, T. S.; GHABRIAL, S.A.; XIE, J. A novel *Partitivirus* that confers hypovirulence on plant pathogenic fungi. **Journal of Virology**, v.88, p.10120-10133, 2014.

XIE, J.; GHABRIAL, S.A. Molecular characterizations of two mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Virology**, v.428, p.77-85, 2012.

XIE, J.; WEI, D.; JIANG, D.; FU, Y.; LI, G.; GHABRIAL, S.A.; PENG, Y. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of General Virology**, v.87, p.241-249, 2006.

XIE, J.; XIAO, X.; FU, Y.; LIU, H.; CHENG, J.; GHABRIAL, S.A.; LI, G.; JIANG, D. A novel mycovirus closely related to hypoviruses that infects the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Virology**, v.418, p.49-56, 2011.

XU, Z.; WUA, S.; LIUA, L.; CHENG, J.; FU, Y.; JIANG, D.; XIE, J. A mitovirus related to plant mitochondrial gene confers hypovirulence on the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Virus Research**, v.197, 127-136, 2015.

YU, X.; LI, B.; FU, Y.; JIANG, D.; GHABRIAL, S.A.; LI, G.; PENG, Y.; XIE, J.; CHENG, J.; HUANG, J.; YI, X. 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**, v.107, n.18, p.8387-8392, 2010.

YU, X.; LIA, B.; FU, Y.; XIE, J.; CHENG, J.; GHABRIAL, S.A.; LIA, G.; YI, X.; JIANG, D. 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**, v.110, n.4, p.1452-1457, 2013.

ZHAI, L.; XIANG, J.; ZHANG, M.; FU, M.; YANG, Z.; HONG, N.; WANG, G. Characterization of a novel double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence from the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*. **Virology**, v.493, p.75-85, 2016.

ZHAI, L.; ZHANG, M.; HONG, N.; XIAO, F.; FU, M.; XIANG, J.; WANG, G. Identification and characterization of a novel hepta-segmented dsRNA virus from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum fructicola*. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.754, p.1-13, 2018.

ZHANG, H.; XIE, J.; FU, Y.; CHENG, J.; QU, Z.; ZHAO, Z.; CHENG, S.; CHEN, T.; LI, B.; WANG, Q.; LIU, X.; TIAN, B.; COLLINGE, D.B.; JIANG, D. A 2-kb mycovirus converts a pathogenic fungus into a beneficial endophyte for *Brassica* protection and yield enhancement. **Molecular Plant**, v.13, p.1420–1433, 2020.

ZHAO, T.; HAVENS, W.M.; GHABRIAL, S.A. Disease phenotype of virus-infected *Helminthosporium victoriae* is independent of overexpression of the cellular alcohol oxidase/RNA-binding protein Hv-p68. **Phytopathology**, v.96, p.326-332, 2006.

ZHENG, L.; ZHANG, M.; CHEN, Q.; ZHU, M.; ZHOU, E. A novel mycovirus closely related to viruses in the genus *Alphapartitivirus* confers hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. **Virology**, v.456–457, p.220-226, 2014.

ZHONG, J.; CHEN, D.; LEI, X.H.; ZHU, H. J.; ZHU, J. Z.; GAO, B.D. Detection and characterization of a novel Gammapartitivirus in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* strain HNZJ001. **Virus Research**, v.190, 104–109, 2014.

ZHONG, J.; PANG, X.D.; ZHU, H.J.; GAO, B.D.; HUANG, W.K.; ZHOU, Q. Molecular characterization of a trisegmented mycovirus from the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Viruses**, v.8, p.1-12, 2016.

ZHOU L.; LI X.; KOTTA-LOIZOU I.; DONG K.; LI S.; NI D.; HONG N.; WANG G.; XU W. A mycovirus modulates the endophytic and pathogenic traits of a plant associated fungus. **The ISME Journal**, in press, 2021.

ZHOU, T.; BOLAND, G.J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homeocarpa*. **Phytopathology**, v.87, p.147-153, 1997.