



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA



Rafael Rives Torres dos Santos

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS VÍRUS NA PROMOÇÃO DA AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL**

Belo Horizonte
2018

Rafael Rives Torres dos Santos

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS VÍRUS NA PROMOÇÃO DA AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL**

Monografia apresentada ao programa de pós-graduação
em microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
para a obtenção do título de especialista em microbiologia

Orientadora: Dra. Danielle S. O. Daian e Silva.

Belo Horizonte

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, professores e contribuintes para alcançar meu conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa Amanda de Castro por seu esforço em me ajudar a ter essa vitória.

Agradeço a todos dessa instituição (UFMG) que permitiram que eu chegasse onde estou. Meus colegas de classe que foram verdadeiros e companheiros, e em especial a professora Dra. Edel Figueiredo e minha orientadora Dra. Danielle Daian.

Equidade Intergeracional

Sou o âmago da mata

Vim do bosque de arbustos retorcidos

O Deserto Pétreo que emana da humanidade

Já esqueceram sua origem de verdade

- Vida dos rios, lhe peço perdão

- Meu povo é tolo, não te valorizarão

Polui a água e bebe piche industrializada

Depois cria meios tecnológicos de se alienar da realidade

Mas os recursos naturais destruídos ecoarão

Fome, sede, miséria aumentarão

Infinito Estocástico

Ciclos de Pesar

Paisagem transfigurada

Artificialidade exacerbada

Conforto, consumismo, lixo, toxina

Todos os ciclos naturais destruídos

Destituídos resquícios de natureza ínfimos

Abdicado estereotipado recurso renovável

Percolação no concreto rodoviário?

Ou os topos de morro convertidos em aço!

Seus rios secam e se perguntam o por quê

Se eu não visse isso, não iria crer

Infinito Estocástico

RESUMO

SANTOS, Rafael Rives Torres. **Aplicações biotecnológicas dos vírus na agricultura sustentável**

(Monografia de Especialização) Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte. 2019.

A magnificação trófica oriunda da utilização de defensivos agrícolas e seu efeito na seleção de micro-organismos resistentes é um problema que transpõe a agricultura e reflete em risco para a economia e qualidade de vida das populações humanas. Existem alternativas que causam menos impacto social e ambiental que os produtos químicos utilizados no controle de pragas agrícolas, uma destas alternativas é o controle biológico de fitopatógenos através da utilização de vírus como micovírus específicos para fitopatógenos causadores de doenças em cultivares. Este trabalho tem como objetivo principal descrever os mecanismos de ação dos vírus focando o controle de pragas na agricultura, bem como demonstrar as vantagens ambientais da utilização desses vírus no plantio de áreas degradadas em recuperação. Para alcançar estes objetivos foi realizada uma pesquisa exploratória nos recursos midiáticos virtuais com foco no tema proposto para responder as perguntas abordadas neste trabalho. A literatura evidenciou a eficácia dos vírus no controle de patógenos de plantas, principalmente de fungos. Sendo assim os vírus são uma promissora alternativa a utilização de substâncias tóxicas empregadas na agricultura, mas novos estudos ainda são necessários para a utilização dos vírus no tratamento de fungos que também são causadores de doenças que afetam significativamente o agronegócio.

ABSTRACT

The trophic magnification arising from the use of agricultural pesticides and its effect on the selection of resistant microorganism is a problem that transposes agriculture and reflects at risk for the economy and quality of life of human populations.

There are alternatives that cause less social and environmental impact than the chemicals used in the control of agricultural pests, one of these alternatives is the biological control of phytopathogens through the use of viruses as specific mycoviruses for disease-causing fungi in cultivars. This work has as its main objective to describe the mechanisms of action of focusing on the control of pests in agriculture, as well as demonstrate the environmental benefits of the use of these viruses in the planting of degraded areas in recovery. To achieve these objectives an exploratory research was carried out in the virtual media resources focusing on the topic proposed to answer the questions addressed in this work. Literature has demonstrated the efficacy of viruses in the control of plant pathogens, mainly fungi.

So viruses are a promising alternative to the use of toxic substances employed in agriculture, but new studies are still needed for the use of viruses in the treatment of fungi that are also causing diseases that affect Agribusiness significantly.

LISTA DE ABREVIATURAS

CNA: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

dsRNA: Ácido ribonucleico dupla fita;

iRNA: Ácido ribonucleico de interferência;

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*;

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro;

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro;

ssRNA: Ácido ribonucleico fita simples;

ssDNA: Ácido desoxirribonucleico fita simples;

ORF: Janela aberta de leitura;

PIB: Produto Interno Bruto;

PgRV-1: *Phlebiopsis gigantea virus* tipo 1;

PgRV-2: *Phlebiopsis gigantea virus* tipo 2;

PoliA: Cap de PoliAdenina;

RNA: Ácido ribonucleico;

RpRd: RNA polimerase RNA dependente;

Scv-LA: *Saccharomyces cerevisiae virus*;

SsDRV: Gene Associado a debilitação viral em *Esclerotinia esclerotiorum*;

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Reprodução fúngica assexuada e dispersão dos micovírus.....	22
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
3. JUSTIFICATIVA	13
4. METODOLOGIA	14
5. Micovírus	15
5.1 Características Gerais	15
5.2 Multiplicação	16
5.3 Taxonomia e Diversidade	17
5.3.1 Família Totiviridae	18
5.3.2 Família Megabirnaviridae	19
5.3.3 Família Partitiviridae	19
5.3.4 Família Chrysoviridae	20
5.3.5 Família Hypoviridae	20
5.3.6 Família Narnaviridae	21
6. Relação Micovírus-Hospedeiro	21
7. Mecanismos de Inibição Fúngica por Micovírus	24
7.1 Indução de Hipovirulência	24
7.2 Indução de Má-Formação em Cogumelos por Micovírus	26
7.3 Indução de Toxinas <i>Killer</i> por Micovírus	27
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira é muito importante para a economia do país, principalmente para o Produto Interno Bruto (PIB). Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) este setor pode ser relevante para solucionar o desemprego proveniente da crise econômica que afeta praticamente todo o país, devido ao impacto associado ao capital expressivo na exportação (EMBRAPA, 2018).

Para o uso eficiente da terra e redução do impacto sobre os solos e recursos hídricos é essencial o investimento em soluções que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente que os defensivos agrícolas (EMBRAPA, 2018). Os vírus são utilizados no controle de micro-organismos que causam doenças em plantas, controlando bactérias fitopatogênicas através de bacteriófagos e representam uma possibilidade neste contexto.

Os vírus podem ser uma alternativa ao uso de plantas transgênicas e defensivos agrícolas no controle biológico, já que muitos são baseados em herbicidas com glifosato que embora não sejam letais podem apresentar um efeito deletério ou debilitante sobre as populações de insetos polinizadores de ecossistemas terrestres (DANILO, 2017). Além disso, setores associados a agricultura familiar e sustentável tendem a ser concomitantes, assim o estudo de formas de preservar nossos ecossistemas e gerar renda através da agricultura sustentável tem fundamental importância no Brasil (LIU *et al.*, 2012).

Os vírus capazes de infectar fungos fitopatogênicos são denominados de micovírus e já foram descritos infectando todos os filos de fungos. Os micovírus são virulentos apenas a fungos, podendo ser administrados tanto no controle de pestes agrícolas, quanto no controle de fungos exóticos invasivos capazes de causar dano a plantas nativas (PEARSON *et al.*, 2009). Esta seletividade que os micovírus apresentam se sobrepõe aos métodos convencionais de controle biológico, como, por exemplo, o uso de defensivos agrícolas ou herbicidas na cultura transgênica.

Os micovírus de maior importância são aqueles que infectam fungos endofíticos e ectomicorrízicos (HERRERO *et al.*, 2009). Tais fungos que apodrecem sementes de estoques de plantas nativas são de suma relevância na agricultura sustentável e biologia da conservação.

Neste escopo, este trabalho visa ressaltar o papel ecológico dos micovírus e sua interação com os fungos, bem como, sua influência no ciclo de vida das plantas nativas e cultivares que podem ser afetados por fitopatógenos.

2. OBJETIVO

Produzir uma revisão bibliográfica atualizada da importância biotecnológica dos micovírus na promoção da agricultura sustentável.

3. JUSTIFICATIVA

Este trabalho tem como justificativa apresentar informações relevantes sobre o uso dos micovírus no controle biológico. Sua capacidade de induzir hipovirulência no fitopatógeno pode apresentar-se como uma alternativa ao uso de agrotóxicos, minimizando os impactos ambientais e diminuindo os custos de manutenção das lavouras.

4. METODOLOGIA

Neste trabalho foi realizada pesquisa exploratória de bibliografia para levantamento de dados e seleção de informações relevantes ao tema proposto. A revisão da literatura científica foi feita através de bibliografia virtual acessada eletronicamente através de sites e periódicos online de rede nacional, Periódico CAPES e internacional, SciELO e Google Acadêmico.

5. Micovírus

5.1 Características Gerais

Os micovírus são vírus que geralmente apresentam genoma de RNA dupla fita (dsRNA) que pode ser segmentado ou não de acordo com a família que o mesmo pertence. Uma particularidade dos vírus de RNA é a sua elevada taxa de mutação que favorece a adaptação a condições ambientais adversas resultando em populações de aspecto genético heterogêneo e dinâmico. Os micovírus também podem apresentar outras estratégias para aumentar sua diversidade genética devido a fatores intrínsecos como a transferência horizontal de genes que ocorre nos micovírus de DNA e nos micovírus que possuem RNA fita simples senso positivo (ssRNA – *single strand* RNA) (LIU *et al.*, 2012). O grupo dos micovírus é expressivamente diverso geneticamente (PEARSON *et al.*, 2009). Também já foram descritos micovírus de RNA fita negativa e retro-transposon.

Micovírus de DNA são mais estáveis geneticamente, contudo, alguns mecanismos para aumentar a variabilidade genética podem ser encontrados nestes vírus como, por exemplo, a transferência horizontal de genes que ocorre geralmente por rearranjo ou recombinação permitindo uma maior heterogeneidade dos mesmos (LIU *et al.*, 2012; PEARSON *et al.*, 2009). No rearranjo, dois micovírus de espécies distintas infectam um fungo e durante esta coinfeção os fragmentos de genomas interespecíficos formam um novo vírus com genoma recombinante, processo dependente exclusivamente de um genoma segmentado presente em alguns micovírus de ssRNA senso positivo. A diversidade de famílias distintas em vírus de RNA dupla fita (dsRNA – *double strand* RNA) indica que possivelmente ocorreu convergência evolutiva destes grupos taxonômicos (YU *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010).

As principais famílias de micovírus são: *Megabirnaviridae*, *Reoviridae*, *Chrysoviridae*, *Narnaviridae* e *Hypoviridae* esta última associada a capacidade de induzir hipovirulência após o fungo fitopatogênico ser infectado pelo micovírus (SALAI PETH *et al.*, 2014; KANEMATSU *et al.*, 2014; GHABRIAL *et al.*, 2015). A hipovirulência é um fenômeno que ocorre através da redução da virulência dos fungos fitopatogênicos que afetam tanto plantas nativas de

importância ambiental quanto cultivares (SALAIPTH *et al.*, 2014; KANEMATSU *et al.*, 2014; GHABRIAL *et al.*, 2015).

Estima-se que os micovírus estão agrupados em pelo menos 15 famílias distintas, embora alguns gêneros e famílias ainda estejam aguardando uma classificação mais precisa pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (SALAIPTH *et al.*, 2014; KANEMATSU *et al.*, 2014; GHABRIAL *et al.*, 2015).

A presença de um capsídeo pode ser evidenciada na maioria das famílias, embora as famílias *Totiviridae*, *Endornarviridae* e *Narnaviridae* apresentem elevado número de espécies com capsídeo ausente. Característica esta evidenciada pela presença do material genético do micovírus no fungo hospedeiro (YU *et al.*, 2009; KOZLAKIDIS *et al.*, 2009). Quando o capsídeo está presente sua morfologia varia desde um formato irregular até uma simetria isométrica, embora também estejam descritas morfologias irregulares e flexuosas. Geralmente o envelope está ausente neste grupo e algumas espécies apresentam vesícula (YU *et al.*, 2009; KOZLAKIDIS *et al.*, 2009).

5.2 Multiplicação

Na multiplicação dos micovírus, a presença de um capsídeo permite a adsorção pelas células da hifa do fungo, mas independentemente da presença do mesmo, famílias sem capsídeo são capazes de se multiplicarem através do material genético em si. Embora seu processo de transmissão seja independente de fase extracelular, por hifas em anastomose ou plasmogamia, algumas famílias de micovírus sem partícula viral não apresentam adsorção nas hifas, sendo sua transmissão dependente da anastomose de hifas compatíveis (SCLAFANI & FANGMAN, 1984; NEWMAN & MCLAUGHLIN, 1986; FUJIMURA *et al.*, 1986). A ausência de fase extracelular ou outros fatores intrínsecos à biologia dos fungos foram importantes na evolução e adaptação dos micovírus. Estando a morfologia dos vírus diretamente associada às peculiaridades de seus hospedeiros, como morfologia do fungo (filamentoso, leveduriforme ou pleiomórfico) e seus processos reprodutivos (anastomose e plasmogamia) (LIU *et al.*, 2012; PEARSON *et al.*, 2009).

Em relação à replicação do material genético, a produção de uma fita senso positivo servirá de molde para uma fita negativa, sendo por sua vez, molde para várias fitas de senso positivo. Este processo é dependente da atividade da RpRd nos micovírus de RNA (SCLAFANI & FANGMAN, 1984; NEWMAN & MCLAUGHLIN, 1986; FUJIMURA *et al.*, 1986). Micovírus que apresentam ssRNA senso positivo podem utilizar seu genoma tanto na replicação de seu material genético como também na tradução de proteínas e modulação fenotípica da célula hospedeira.

Deste modo, os micovírus podem variar bastante em seus processos de multiplicação tanto nas fases intracelulares quanto extracelulares de acordo com as características do material genético, presença de capsídeo e presença de proteínas de motilidade envolvidas no transporte para os micovírus que não apresentam uma partícula viral com capsídeo, como ocorre nos vírus associados a infecções em plantas (BOINE, 2012).

5.3 Taxonomia e Diversidade

A taxonomia dos micovírus caracteriza e agrupa seus membros em famílias e gêneros de acordo com suas peculiaridades na estrutura e tamanho da partícula viral, seu modo de transmissão, número de segmentos genômicos, presença de envelope e diversidade de hospedeiros (KING *et al.*, 2012).

Aproximadamente 100 espécies de micovírus são conhecidas, sendo que dentre as 15 famílias existem 23 gêneros, número este considerado estimado, pois alguns micovírus não estão agrupados em nenhuma família ou ainda não possuem um gênero próprio. Sua diversidade pode ser evidenciada pela variação genômica elevada dentro do grupo, variando desde um genoma de dsRNA, ssRNA senso positivo e negativo, e ssDNA. Deste modo, a taxonomia e diversidade dos micovírus está relacionada aos mecanismos evolutivos que os selecionaram de acordo com a relação com seu fungo hospedeiro (LIU *et al.*, 2012).

Os micovírus não segmentados de genoma dsRNA das famílias *Totiviridae* e *Partitiviridae* apresentam linhagens evolutivas que compartilham um ancestral comum com os vírus não segmentados de dsRNA que infectam as plantas (LIU *et al.*, 2012).

Filogeneticamente, *Totiviridae* e *Partitiviridae* são famílias que apresentam sequências genéticas muito semelhantes relacionadas à produção de suas enzimas RpRd. Isto indica que embora existam características tão distintas nestes grupos, como a diferença entre o número de segmentos genômicos, pode-se considerar que a RpRd possui uma sequência genética bem conservada (LIU *et al.*, 2012).

5.3.1 Família Totiviridae

Os micovírus da família *Totiviridae* são vírus de genoma não segmentado, biscistrônico, composto de dsRNA envolto em uma partícula viral isométrica variando de 30 a 40 nanômetros (nm) de diâmetro. O envelope lipídico está ausente e são agrupados em dois gêneros: *Totivirus* e *Victorivirus*, apresentando duas ORFs (*Open Reading Frame* – Janela aberta de leitura) parcialmente sobrepostas que originam o capsídeo e também a RdRp na porção 5' proximal (LIU *et al.*, 2012; GHABRIAL *et al.*, 2015). A família *Totiviridae* também inclui espécies com linhagens incapazes de produzir capsídeo como observado na espécie PgRV-1 e PgRV-2 (YU *et al.*, 2009; KOZLAKIDIS *et al.*, 2009).

Saccharomyces cerevisiae virus (Scv-LA) são micovírus que apresentam a capacidade de induzir a produção de toxinas *killer* que causam a morte das leveduras não infectadas. Assim, esta família possui fundamental importância ecológica permitindo que as leveduras infectadas apresentem uma vantagem no ambiente devido à resistência a estas toxinas (SCHMITT, 2002; BREINIG, 2006).

Toxinas *killer* são proteínas produzidas durante a infecção por um micovírus que apresentam atividade antimicótica. Estas proteínas apresentam um importante papel ecológico e evolutivo, pois leveduras produtoras de toxinas *killer* são imunes a sua ação, conferindo-lhe vantagem na competição por nutrientes e espaço com outras espécies de leveduras (SCHMITT, 2002; BREINIG, 2006).

Esta família possui representantes capazes de infectar fungos ectomicorrízicos que apresentam grande relevância ambiental. A sobrevivência das plantas infectadas é beneficiada por sua relação mutualística auxiliando no desenvolvimento das espécies vegetais de clima

tropical que são predominantes na agricultura sustentável brasileira (BAEZA *et al.*, 2012; STIELOW & MENZEL, 2010; TAYLOR *et al.*, 2013).

5.3.2 Família *Megabirnaviridae*

Os micovírus da família *Megabirnaviridae* são vírus que apresentam genoma dividido em dois segmentos de dsRNA, envoltos em uma partícula viral esférica de 50 nm de diâmetro e envelope lipídico ausente. Esta família apresenta apenas um gênero: *Megabirnavirus*, o qual está associado a capacidade de indução de hipovirulência em fungos fitopatogênicos. Seus segmentos genômicos apresentam tamanhos diferentes e estão envolvidos separadamente pelas proteínas do capsídeo (WANG *et al.*, 2015).

O segmento de menor tamanho em pares de bases apresenta duas ORFs que não estão sobrepostas relacionadas à tradução de pequenas proteínas de função desconhecida.

O maior segmento em pares de bases apresenta duas ORFs parcialmente sobrepostas na mesma fita de RNA que estão relacionadas a produção das proteínas que formam o capsídeo viral e também à transcrição da RpRd (SALAIPTH *et al.*, 2014; KANEMATSU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015).

5.3.3 Família *Partitiviridae*

Os micovírus da família *Partitiviridae* são vírus de genoma de dsRNA, dividido em dois segmentos que são envolvidos separadamente pelas proteínas do capsídeo. Sua partícula viral apresenta morfologia isométrica variando de 30 a 40 nm de diâmetro e envelope ausente (PICARELLI *et al.*, 2017). A ORF do segmento menor codifica as proteínas da partícula viral que se fusionarão formando o capsídeo dos partitivírus, enquanto a ORF do segmento maior transcreverá a RdRp (PICARELLI *et al.*, 2017; GABRHIAL *et al.*, 2015).

A família *Partitiviridae* apresenta 4 gêneros distintos denominados *Alfapartitivirus*, *Betapartitivirus*, *Gamapartitivirus* e um gênero ainda não nomeado. Os micovírus deste grupo apresentam capacidade de infectar fungos e também plantas (PICARELLI *et al.*, 2017; GABRHIAL *et al.*, 2015).

5.3.4 Família Chrysoviridae

Os micovírus da família *Chrysoviridae* estão agrupados em um único gênero, *Chrysovirus* (PICARELLI *et al.*, 2017; GABRHIAL *et al.*, 2015). A partícula viral dos chrisovírus apresenta morfologia isométrica variando de 20 a 35 nm, genoma de dsRNA dividido em quatro segmentos de tamanhos diferentes, envolvidos separadamente pelas proteínas do capsídeo, e envelope ausente (PICARELLI *et al.*, 2017).

Os micovírus deste grupo geralmente são crípticos devido à lisogenia associada ao seu processo de infecção, embora algumas espécies sejam capazes de induzir hipovirulência em fungos fitopatogênicos (PICARELLI *et al.*, 2017; GABRHIAL *et al.*, 2015).

Os segmentos do genoma são monocistrônicos e cada um será responsável pela tradução de proteínas diferentes importantes na multiplicação destes vírus. A RdRp é produzida em um segmento, o capsídeo em outro segmento, proteínas responsáveis pela ligação ao material genético e tradução de uma enzima que cataboliza a cisteína estão presentes em outro segmento e o quarto segmento ainda possui função desconhecida (PICARELLI *et al.*, 2017; GABRHIAL *et al.*, 2015).

5.3.5 Família Hypoviridae

A família *Hypoviridae* é composta por micovírus de genoma não segmentado, ssRNA senso positivo monocistrônico, envelope lipídico e partícula viral ausente. Sua ORF traduz uma poliproteína que codifica a enzima RdRp que posteriormente será clivada e convertida em uma molécula funcional (GABRHIAL *et al.*, 2015).

Esta família apresenta um único gênero, *Hypovirus*, que apresenta como característica principal sua capacidade de induzir hipovirulência (GABRHIAL *et al.*, 2015).

Este grupo apresenta uma estrutura lipídica oriunda da membrana celular da hifa denominada vesícula. Estas estruturas são pleiomórficas e sinapomórficas dentro do grupo, com vesículas que podem variar de 50 a 80 nm de diâmetro (GABRHIAL *et al.*, 2015). Este grupo de micovírus é um grupo de difícil identificação, devido à ausência de capsídeo e efeito

citopático em seu hospedeiro, sendo assim a sua diversidade provavelmente é subestimada (LIU *et al.*, 2012; NUSS & HILLMAN, 2012).

5.3.6 Família Narnaviridae

A família *Narnaviridae* é composta por micovírus de genoma de ssRNA senso positivo, não segmentado, monocistrônico, envelope lipídico e capsídeo ausente, assim como a família *Hypoviridae* (NUSS & HILLMAN, 2012).

Esta família apresenta dois gêneros, embora apenas o gênero *Mitovirus* apresente capacidade de utilizar os fungos como hospedeiros no seu ciclo de vida. Este gênero difere do gênero *Hypovirus* devido ao genoma bastante curto e por possuir apenas informações para a tradução da enzima RdRp (NUSS & HILLMAN, 2012).

6. Relação Micovírus-Hospedeiro

A interação ecológica observada nos micovírus é o endoparasitismo obrigatório, relação parasito-hospedeiro geralmente caracterizada pela capacidade destes vírus permanecerem em estado lisogênico ou não causarem efeito citopático no fungo hospedeiro (MILGROOM & HILLMAN, 2011).

A transmissão dos micovírus na população do fungo hospedeiro depende de fatores como presença de capsídeo e características específicas relacionadas à multiplicação do vírus na célula do hospedeiro. A transmissão também depende de características intracelulares, como o estágio em que a célula se encontra na divisão celular, esporogênese e anastomose de hifas compatíveis. Sendo assim, os micovírus podem ser transmitidos via vertical, pela infecção dos descendentes do fungo hospedeiro, e via horizontal através da passagem do micovírus de um fungo para outro sem parentesco, seja este fungo da mesma espécie ou de outra espécie diferente (LIU *et al.*, 2012).

A divisão celular propicia a penetração dos vírus no núcleo celular para sua multiplicação, uma vez que remove a mesma barreira natural representada pela carioteca presente nas células eucarióticas. Além disso, a alteração enzimática no interior celular pode

beneficiar o micovírus num ambiente de multiplicação natural do genoma do hospedeiro. Este fator pode ser importante para a multiplicação de alguns micovírus dependendo das propriedades de cada espécie quanto à presença de genoma de RNA ou DNA, pois geralmente os vírus de DNA se multiplicam no núcleo enquanto que os micovírus de RNA tendem a se multiplicar no citoplasma (LIU *et al.*, 2012).

Na esporogênese, a diploidia das hifas, durante a plasmogamia, facilita a transmissão vertical dos micovírus entre as hifas. No processo de reprodução assexuada os esporos serão responsáveis pela germinação de um novo fungo idêntico ao parental e também infectado pelo micovírus, através dos esporos dos fungos (Figura 1). Os micovírus podem se dispersar por longas distâncias devido às propriedades de dispersão dos próprios fungos na colonização de novos ambientes (LIU *et al.*, 2012).

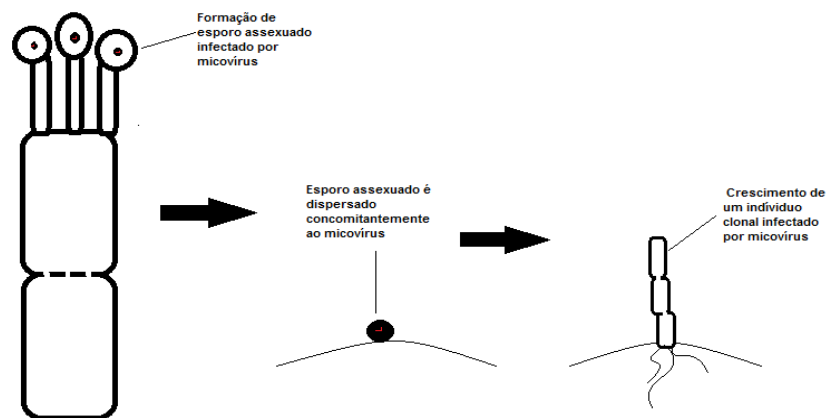


Figura 1: Reprodução fúngica assexuada e dispersão dos micovírus. Desenho do autor.

A anastomose de hifas compatíveis é um processo natural na reprodução sexuada dos fungos, na qual o contato entre uma hifa positiva e uma hifa negativa permite a transmissão horizontal do micovírus. Neste escopo, a incompatibilidade vegetativa entre as hifas dos fungos é um fator importante para o impedimento de uma infecção por um micovírus em outro fungo daquela população (MILGROOM & HILLMAN, 2011; GABRHIAL *et al.*, 2015). Este mecanismo descrito ocorre quando a anastomose de hifas incompatíveis é abortada por indução da apoptose das hifas desses fungos, impedindo a passagem do micovírus. Geralmente os micovírus utilizam proteínas de locomoção para se deslocarem pelo micélio do fungo (LIU *et*

al., 2012). Em contrapartida os micovírus evoluíram selecionando linhagens capazes de inibir a apoptose das hifas em anastomose, processo que ocorre quando a morte celular programada ativada pela incompatibilidade de hifas é suprimido pela modulação celular pelo micovírus. O mesmo promove o silenciamento gênico impedindo a apoptose de forma que este tenha sucesso neste processo de transmissão horizontal do agente infeccioso (BIELA *et al.*, 2002).

As interações entre os fungos e seus vírus geralmente ocorrem por processos intracelulares. Na relação micovírus-hospedeiro fica evidente quando observamos a ausência de capsídeo em alguns micovírus demonstrando claramente que as fases intracelulares são suficientes para a replicação do vírus. Estes micovírus sem capsídeo foram selecionados pela seleção natural, conseguindo perpetuar na natureza através de proteínas específicas que promovem a motilidade do vírus no interior das hifas de seu hospedeiro e de características fúngicas como a plasmogamia, anastomose de hifas compatíveis e esporogênese (SON *et al.*, 2015). Os micovírus que produzem esta proteína podem se movimentar pelas hifas do hospedeiro, estando esta propriedade aparentemente envolvida no mecanismo de escape da resposta de defesa do fungo (LIU *et al.*, 2015).

Outro mecanismo utilizado pelos fungos para defesa contra os micovírus é o aumento na produção de ácido micólico, mecanismo de defesa descrito em duas espécies do gênero *Penicillium*. *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium stoloniferum* são espécies que apresentaram resposta exacerbada de produção de ácido micólico, que são cadeias longas de ácidos graxos com atividade antiviral, afetando o ciclo de vida dos vírus através da inibição da adsorção (LEMKE; NASH, 1974). Além da produção de ácido micólico, os fungos podem responder ao vírus exacerbando sua expressão de interferon (BANKS *et al.*, 1968). Em *Penicillium stoloniferum* foi descoberto que os dsRNAs dos micovírus induziam a síntese de interferon, uma proteína antiviral produzida por eucariotos, como mecanismo de defesa contra infecções contra micovírus (BUCK, 1988).

Em relação às pressões seletivas observadas na relação micovírus-hospedeiro, a regulação gênica evidenciada em um fungo do gênero *Fusarium* apresentou RNA de interferência (iRNA) induzido pela presença de genoma micoviral dsRNA. Deste modo, a expressão dos genes do micovírus foram regulados negativamente. *Fusarium graminearum*

infectado pelo micovírus FgV1 apresentou níveis transcricionais muito reduzidos dos genes *dcl2* e *agl2*, enquanto que o micovírus FgV2 apresentou uma transcrição exacerbada desses genes. Isto indica que os mecanismos de defesa dos fungos contra micovírus podem apresentar uma complexa relação dependente dos diferentes mecanismos de controle da maquinaria celular. Variações pontuais em regiões homólogas do genoma entre os micovírus podem inibir a interferência dos iRNA favorecendo a indução e expressão dos genes de importância para os micovírus (SON *et al.*, 2014). O gene *hex1*, presente também neste fungo do gênero *Fusarium*, é regulado positivamente pela infecção do micovírus FgV1 e está associado ao acúmulo de RNA do micovírus nas células do hospedeiro. O acúmulo de RNA viral é reduzido na presença do gene *hex1* e com a ausência deste gene a expressão em mutantes, quando comparados ao tipo selvagem, demonstrou-se exacerbada (LIU *et al.*, 2012).

7. Mecanismos de Inibição Fúngica por Micovírus

7.1 Indução de Hipovirulência

A fitopatologia induzida pela infecção fúngica na planta depende diretamente da associação entre a planta e o fungo que devem estar em comunicação direta e constante, embora seu efeito sobre a planta dependa de vários fatores. Um fator importante é a presença de um micovírus infectando o fungo fitopatogênico, fato que interfere no maquinário celular dos fungos e como consequência sua resposta aos mecanismos de defesa da planta são comprometidos. Assim, a planta que geralmente é susceptível ao fungo pode apresentar uma resposta que é capaz de impedir o fungo de danificar suas células.

Um mecanismo de defesa da planta à infecção fúngica é a produção de brassinosteroides (Brs) que são esteroides fundamentais no desenvolvimento das plantas. Além disso, estes esteroides possuem capacidade de inibir fitopatógenos na planta. Característica esta observada em um experimento de cultura de morango que foi capaz de resistir à infecção por *Colletotrichum acutatum*, um fungo capaz de causar a antracnose no fruto. Após a utilização de um Brs semi-sintético a cultura foi capaz de produzir frutos sadios

(SILVA *et al.*, 2018). No estudo, Brs produzidos pela planta associados a um Br semi-sintético foram utilizados no tratamento da infecção fúngica. Neste contexto, o micovírus é capaz de favorecer os mecanismos de defesa das plantas contra os fungos fitopatogênicos (SILVA *et al.*, 2018).

A indução de hipovirulência após o fungo fitopatogênico ser infectado por micovírus ocorre principalmente nas famílias *Megabirnaviridae*, *Reoviridae*, *Chrysoviridae*, *Narnaviridae* e *Hypoviridae* (SALAIPTH *et al.*, 2014; KANEMATSU *et al.*, 2014; GHABRIAL *et al.*, 2015). Estes micovírus não estão apenas associados à indução de hipovirulência, mas também a inibição de outros fenótipos como redução da produção de pigmentos pelo fungo, redução de seu potencial de crescimento e esporulação. Assim, estes fenótipos, principalmente a expressão de pigmentos, estão relacionados diretamente à virulência, uma vez que existem fatores de resistência associados a pigmentos, como a melanina que protege os fungos da ação de antifúngicos (NUSS, 2005; DENG *et al.*, 2003).

Muitos dos mecanismos reguladores da expressão gênica dos fungos por micovírus influenciam na supressão da resistência do fungo ao vírus por ação da SsDRV, gene envolvido na defesa do fitopatógeno relacionado à apoptose induzida por incompatibilidade de hifas em anastomose. Os micovírus também podem alterar a regulação de genes constitutivos associados a reprodução e desenvolvimento, sendo que em algumas espécies de fungos a interação micovírus-hospedeiros também pode induzir hipovirulência em fitopatógenos afetando o gene SsDRV (SON *et al.*, 2015).

O silenciamento depende das ORFs do genoma dos micovírus de dsRNA. Estes apresentam duas ORFs, sendo que a ORF2 está relacionada à uma proteína de fusão associada a mudanças traducionais. Esta proteína auxilia na modulação da expressão da ORF1 que é um heptâmero de nucleotídeos envolvido na interrupção da tradução constitutiva do fungo através do silenciamento no ribossomo. Assim, o micovírus pode reprogramar e controlar todo processo de tradução da maquinaria celular do fungo para aumentar a capacidade do RNA mensageiro (mRNA) dos micovírus de competir com os mRNAs do fungo, sendo o papel do controle ribossomal do fungo essencial para indução da hipovirulência no hospedeiro (ALLEN *et al.*, 2003).

Em *Sclerotinia homoeocarpa* foi identificado um dsRNA micoviral que apresenta uma ORF codificadora de uma proteína relacionada à expressão do triptofano em mitocôndrias de ascomicetos responsáveis por doenças em plantas. Mais um exemplo em que alterações traducionais provenientes da interação micovírus-hospedeiro influenciam nas características fenotípicas do fungo reduzindo seu crescimento vegetativo, favorecendo a resposta da planta à infecção fúngica e conseqüentemente afetando a virulência do fungo fitopatogênico (DENG *et al.*, 2003).

7.2 Indução de Má-Formação em Cogumelos por Micovírus

A agricultura sustentável também pode explorar a fungicultura, na qual o cultivo de cogumelos comestíveis e de uso medicinal tem um crescente mercado no Brasil. Os cogumelos não necessitam de muito espaço e são uma fonte rentável, pois alguns dependem de pouco recurso para o cultivo e sua aplicação medicinal pode elevar seu valor de mercado. Além disso, são fontes de nutrientes equivalentes ao valor proteico da carne com a vantagem de apresentar baixo conteúdo lipídico (EMBRAPA, 2018). Os principais cogumelos com propriedades imunoterapêuticas são *Agaricus blazei* e o *Ganoderma lucidum*, sendo sua venda pode ser bem rentável. Porém, os basidiomicetos, os fungos mais importantes na fungicultura, também sofrem com a infecção micoviral. Os fungos podem apresentar seu corpo de frutificação deformado pelo vírus ou um tempo muito elevado para seu crescimento, comprometendo a colheita e reduzindo o lucro dos agricultores. Assim sendo, os micovírus afetam o agronegócio e também podem causar prejuízos a indústria farmacêutica, pois muitos cogumelos de uso medicinal são utilizados para a produção de fármacos importantes para a indústria de medicamentos (HOLLINGS, 1962).

A primeira observação de uma manifestação sintomática relacionada a infecção por micovírus foi avaliada em *Agaricus bisporus*, o qual seu corpo de frutificação apresentou deformidades devido à multiplicação exacerbada de partículas virais nos esporóforos do píleo. O efeito devastador da micovirose geralmente afeta a morfofisiologia podendo causar alteração no formato do basidiósporo, do píleo ou todo o corpo de frutificação do fungo hospedeiro (DAWE *et al.*, 2003). Estas alterações geralmente afetam a taxa de crescimento

micelial, retardando a formação do corpo frutífero e diminuindo seu crescimento devido ao silenciamento de genes constitutivos importantes no crescimento radial do fungo (KIM *et al.*, 2008).

Quando um agricultor identifica um micovírus em sua cultura de cogumelos o tratamento utilizado é cicloheximida ou ribavirina. Concomitantemente ao corte da ponta das hifas para evitar a transmissão horizontal por anastomose estes são os métodos mais eficientes utilizados no tratamento viral em cogumelos de uso agrícola ou farmacêutico (ZANG *et al.*, 2010).

7.3 Indução de Toxinas *Killer* por Micovírus

Outra característica observada nos micovírus foi a indução da expressão de toxinas *killer*. Scv-LA é uma das espécies de micovírus que induzem a expressão desse fenótipo *killer* que se caracteriza pelo fato de leveduras infectadas serem capazes de matar outras leveduras que não estão infectadas. Durante a infecção, o micovírus induz a produção de uma anti-toxina que protege a levedura infectada da ação da toxina *killer* (WICKNER *et al.*, 2013). Este fenótipo determina a expressão de uma proteína de baixo peso molecular que está, desta maneira, envolvida no sucesso ecológico das leveduras infectadas por micovírus. Diferentes linhagens de leveduras produzem toxinas *killer* distintas e são suscetíveis a toxinas *killer* de outras leveduras infectadas por micovírus também distintas. A “imunidade funcional” em leveduras não infectadas é um fenômeno no qual observa-se uma tolerância natural a estas proteínas e ocorre devido a seleção de mutantes resistentes. Este mecanismo evidencia um longo período de história evolutiva dos fungos e micovírus (WICKNER *et al.*, 2013).

A investigação dos genes envolvidos na regulação dessas toxinas pode auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos associados, permitindo um olhar mais criterioso frente à infecção de leveduras utilizadas na fabricação de alimentos e bebidas alcoólicas, abrindo portas para uma utilização no controle biológico e de qualidade dos produtos oriundos da atividade fúngica. Além disso, a heterogeneidade de proteínas *killer* representa uma alternativa interessante para a produção de novos antifúngicos, principalmente em um contexto de resistência dos fungos aos tratamentos convencionais (LIU *et al.*, 2015).

Assim, os micovírus podem ser empregados como micro-organismos vivos no controle biológico e como mecanismo para a produção de fármacos com atividade antifúngica e defensivos agrícolas. Por serem menos tóxicos e mais específicos reduzem o impacto ambiental e possibilitam o desenvolvimento de defensivos agrícolas menos *recalcitrantes*, uma vez que as proteínas são facilmente degradadas na natureza (LIU *et al.*, 2015).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vantagens da bioprospecção dos micovírus na agricultura sustentável são diversas. Diferentemente das substâncias químicas dos agrotóxicos que necessitam de sua manutenção nas culturas a sua utilização como controle biológico pode perpetuar indefinidamente. Como os fungos fitopatogênicos geralmente não morrem e não realizam o *clearance* micoviral, a hipovirulência dos micovírus pode ser transmitida para novos fungos que possuam hifas compatíveis.

Como alguns micovírus afetam ectomicorrizas que são fungos de grande impacto na conservação e recuperação de áreas degradadas, os mesmos podem auxiliar nos estudos sobre os fatores que influenciam na capacidade das plantas nativas de se perpetuarem naquele ambiente. Assim, não apenas a bioprospecção dos micovírus no controle biológico é importante para a agricultura sustentável, mas também para o sucesso das plantas nativas tropicais brasileiras que interagem simbioticamente com fungos e produzem moléculas importantes no desenvolvimento e nutrição do vegetal (MEYER, 1973).

A segurança da utilização dos micovírus no controle biológico pode ser evidenciada por sua especificidade em infectar fungos e também por sua baixa taxa de letalidade no hospedeiro. Uma grande vantagem, já que a bioprospecção dos micovírus apresenta potencial para aprimoramento da agricultura sustentável e para auxiliar em estratégias relacionadas ao plantio e conservação biológica. Uma alternativa futura aos problemas enfrentados tanto na agricultura transgênica, que contamina o ambiente, quanto no uso dos defensivos agrícolas como herbicidas. Sendo também menos invasivos do que as estratégias que envolvem a alteração genética de plantas formando organismos recombinantes. Contudo, possíveis efeitos deletérios à microbiota humana devem ser estudados, uma vez que o consumo de insumos portadores de micovírus pode levar a disbiose.

Embora exista uma necessidade imediata para solucionar o dano ambiental causado pela agricultura convencional e transgênica, ainda são necessários vários estudos sobre como os micovírus interagem com a microbiota do solo e dos animais a fim de se definir as possíveis aplicações biotecnológicas para esta guilda ecológica dos endoparasitos de fungos fitopatogênicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T.D.; DAWE, A.L.; NUSS, D.L. Use of cDNA microarrays to monitor transcriptional responses of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* to infection by virulenceattenuating hypoviruses. **Eukaryotic Cell** 2: 1253-1265, 2003.

AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral dsRNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.14, p.496-507, 2001.

BALAN, D. S. L. A indústria têxtil e o meio ambiente. Tecnologia limpa e controle ambiental. **Química Têxtil**, Barueri, v. 66, p. 26-31, 2002.

BAEZA, M.; BRAVO, N.; SANHUEZA, M.; FLORES, O.; VILLAREAL, P.; CIFUENTES, V. Molecular Characterization of *Totivirus* in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Virology Journal**, 2012.

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.

BAO, X.; ROOSSINCK, M.J. Multiplexed interactions: viruses of endophytic fungi, *Advances in Virus Research*, v.86, p.37- 58, 2013.

BIELA, S.; SMITH, M.L.; AIST, J.R.; CORTESI, P.; MILGROOM, M.G. Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v.269, p.2269-2276, 2002.

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

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(1), p.87-91, 2003.

CLARK, J. and MARCH, J. Bacteriophages and Biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterial. **Trends in Biotechnology**. 2006.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). VISÃO 2030: O Futuro da Agricultura Brasileira. **EMBRAPA**, volume único, 2018.

HERRERO, N.; SÁNCHEZ, S.; ZABALGOGEAZCOA, I. Mycoviruses are common among different species of fungal endophytes of grasses. **Archives of Virology**, v.154, p.327-330, 2009.

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

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

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

JIAN, J.; LAKSHMAN, D.K.; TAVANTZIS, S.M. Association of distinct double-stranded RNAs with enhanced or diminished virulence in *Rhizoctonia solani* infecting potato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.1002, 1997.

JIAN, J.; LAKSHMAN, D.K.; TAVANTZIS, S.M. A virulence-associated, 6.4-Kb, double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* is phylogenetically related to plant bromoviruses and electron transport enzymes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.601-609, 1998.

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.

KIM, J.Y.; KIM, J.H.; YOON, S.M.; YOO, Y.B.; YIE, S.W. The identification of a novel *Pleurotus ostreatus* dsRNA virus and determination of the distribution of viruses in mushroom spores. **The Journal of Microbiology**, v.46(1), p.95-99, 2008.

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.

LEE, K.M.; CHO, W.K.; YU, J.; SON, M.; CHOI, H. *et. al.* A Comparison of transcriptional patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. **PLoS One**, v.9(6):e100989, 2014.

LEMKE, P.A.; NASH, C.H. Fungal Viruses. **Bacteriol. Rev.** 38:29 – 56, 1974.

LEVINE, A.J. The Bacteriophages. In: Levine, A. J. *Viruses*. **Scientific American Library**, 1992. p.25-45.

LINNAKOSKI, R. *et. al.* “Antiviral Agents From Fungi: Diversity, Mechanisms and Potential Applications” **Frontiers in microbiology** vol. 9 2325. 2 Oct. 2018.

LIU, H. *et al.* Evolutionary Genomics of Mycovirus-Related dsRNA Viruses Reveals Cross-Family Horizontal Gene Transfer and Evolution of Diverse Viral Lineages. **BMC Evolutionary Biology**, 12:91, 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.

LIU, G.; CHI, Z.; WANG, G.; WANG, Z.; LI, Y.; CHI, Z. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.35(2), p.222-34, 2015.

MILGROOM, M.G.; HILLMAN, B.I. The ecology and evolution of fungal viruses. In: **HURST, D. J. (Ed.). Studies in viral ecology: microbial and botanical host systems**. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011. v.1. cap.9, p.217-253.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n. 403, p. 853–858, 2000.

NIBERT, M.L.; GHABRIAL, S.A.; MAISS, E.; LESKER, T.; VAINIO, E.J. *et al.* Taxonomic reorganization of family Partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. **Virus Res** 188: 128–141. 2014.

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

NUSS, D.L. Mycoviruses. In: BORKOVICH, K.A.; EBBOLE, D.J. (Eds). **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**. Washington, D.C.: AMS Press, 2010.

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

ROMA G., BRAGARD, C. Antiviral defenses in plants through genome editing. **Front Microbiol.**, 2017.

SCHMITT, M.J.; BREINING, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.212-221, 2006.

SCLAFANI, G.; FANGMAN, C.; BERRY, G.; STEWART, I. dsRNA Killer System in Yeast. **Yeast Biotechnology**, 1987.

SILVA, M., MORENO, G., ARACELI, V. *et al.* TTL Proteins Scaffold Brassinosteroid Signaling Components at the Plasma Membrane to Optimize Signal Transduction in Plant Cells. **SSRN Electronic Journal**, 2018.

SON, M.; YU, J.; KIM, K.-H. Five questions about mycoviruses. **PLoS Pathology**, v.11. 2015.

SUN, Q.; CHOI, G.H.; NUSS, D.L. Hypovirus-responsive transcription factor gene *pro1* of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* is required for female fertility, asexual spore development, and stable maintenance of hypovirus infection. **Eukaryot Cell** 8: 262–270. 2009.

WICKER, R.B.; GARDNER, N.A.; BUSSEY, H.; FUJINARA, T.; ESTEBAN, R. RNA Viruses and Killer Genetics of *Saccharomyces*. **The Mycota**, 2004.

WANG, M.; WANG, Y.; SUN, X. *et al.* Characterization of a Novel Megabirnavirus from *Sclerotinia sclerotiorum* Reveals Horizontal Gene Transfer from Single-Stranded RNA Virus to Double-Stranded RNA Virus. **Journal of Virology**, v.89(16), p.8567-79, 2015.