



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

HELENA BEATRIZ DA SILVA MOTA

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DE UM NOVO EMARAVIRUS EM
Urochloa (Sin *Brachiaria*) HÍBRIDA POR SEQUENCIAMENTO DE ALTO
RENDIMENTO**

BRASÍLIA – DF
2024

HELENA BEATRIZ DA SILVA MOTA

**Identificação e análise genômica de um novo *Emaravirus* em *Urochloa* (Sin
Brachiaria) híbrida por sequenciamento de alto rendimento**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós- Graduação em Fitopatologia.

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL 2024**

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, e por ter me dado forças para ultrapassar cada obstáculos ao longo do curso.

Aos meus avós Ecy e Valdemar, meus pais Neida e Estevam, meu padrasto Rony, e todos meus familiares queridos que me apoiaram até aqui.

Ao meu companheiro Felipe, pelo afeto, compreensão, e apoio emocional nos momentos difíceis.

Aos meus amigos do laboratório pela colaboração no trabalho e risadas no cotidiano. Cate, Bruno, Stephanny, Amanda, Paloma, Macária e Marina, muito obrigada!

Ao meu orientador Drº Tatsuya Nagata, pelos ensinamentos aos quais sou muito grata.

À mim , por ter me esforçado e persistido até o final.

Ao CNPq, pelo fomento da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	5
GENERAL ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO GERAL	7
2. JUSTIFICATIVA.....	9
3. OBJETIVO GERAL	9
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
4. REVISÃO DE LITERATURA	9
4.1. A cultura de <i>Urochloa</i> spp. no Brasil.....	9
4.2. Principais vírus de <i>Urochloa</i> spp. no Brasil.....	12
4.3. A família Fimoviridae e o gênero <i>Emaravirus</i>	13
4.4. Sequenciamento de alto rendimento (<i>High-Throughput Sequencing</i> -HTS) aplicado à virologia	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1. Material vegetal sintomático	18
5.2. Purificação parcial de partículas virais e preparo das amostras para sequenciamento	19
5.3. Bioinformática	20
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
APÊNDICE A: Lista de primers utilizados no trabalho	40
APÊNDICE B: Espécies do gênero <i>Emaravirus</i> relatadas até o momento.....	42

RESUMO GERAL

MOTA, Helena Beatriz da Silva. **Identificação e análise de um novo *Emaravirus* em *Urochloa* (Sin *Brachiaria*) híbrida por sequenciamento de alto rendimento**. 2024. 37 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

O Brasil é o 2º maior produtor de carne bovina do mundo, e o sistema de produção de carne brasileiro é o extensivo, caracterizado pela criação de animais soltos em uma grande área de pastagem durante a maior parte da engorda. As plantas forrageiras tropicais são as mais amplamente cultivadas para a formação de pastagens, sendo as gramíneas do gênero *Urochloa* (Sin. *Brachiaria*) as mais utilizadas. Apesar da escassez de dados na literatura sobre espécies virais em forrageiras, sabe-se que atualmente contribuem para a redução da qualidade do pasto. O estabelecimento de medidas específicas para diagnóstico e manejo adequado é dificultado. O sequenciamento de alto rendimento (HTS) tem sido crucial para a identificação de espécies virais devido a quantidade significativa de dados gerados. Assim, o objetivo deste trabalho foi detectar espécies virais infectando plantas forrageiras, utilizando a tecnologia de HTS. Um novo *Emaravirus* foi descoberto por HTS em uma cultivar comercial híbrida entre *Urochloa ruziziensis*, *U. Decumbens* e *U. brizantha*. A sequência do genoma foi confirmada por sequenciamento Sanger. O novo vírus possui cinco segmentos genômicos de RNA senso negativo. O RNA1 apresentou 6.867 nucleotídeos, que codificam uma proteína P1 correspondente à RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) de 2.289 aminoácidos. O RNA2 apresentou 2.043 nt, que codificam uma proteína P2, precursora da glicoproteína (GPP) de 681 aa. Os segmentos RNA1 (P1) e RNA2 (P2) apresentaram identidade de aminoácidos de 34,07% e 29,21%, respectivamente, à P1 e P2 de *Emaravirus tritici*, o vírus mais relacionado. O RNA3 apresentou 981 nt, que codificam uma proteína P3 do nucleocapsídeo (N) de 327 aa, a qual apresentou 15,19% de identidade de aminoácido maior com *Emaravirus toordali*. O RNA4 apresentou 1.041 nt, que codificam uma proteína P4 de movimento viral de 374 aa, e 50,7% de identidade de aa com a proteína P4 de *E. tritici*. O RNA5 (P5) apresentou 1.008 nt, que codificam uma suposta proteína supressora de silenciamento gênico, a qual está mais relacionada à P5 de *E. tritici* (8,9%). As análises filogenéticas, com base nas sequências de aminoácidos previstas da RdRp e GPP, indicaram que estas proteínas estão mais relacionadas à P1 e à P2 de *Emaravirus tritici* e *Emaravirus parkinsoniae*, enquanto que as análises com base nas sequências de aminoácidos de RNA3 (P3-N) indicaram relação às proteínas P3 de *Emaravirus vitis*, *E. sorbi*, *E. actinidae*, *E. syringae*, e *E. cercidis*. Sendo a base para delimitar as espécies do gênero estabelecida pela sequência de aminoácidos dos produtos gênicos de RNA1 (RdRp), RNA2 (GPP) e RNA3 (N), que devem ter uma diferença superior a 25%, esses dados sugerem que o vírus encontrado é membro de uma nova espécie no gênero *Emaravirus*, para o qual o nome binomial *Emaravirus urochloe* é proposto.

Palavras chave: Sequenciamento de alto rendimento, *Emaravirus*, forrageiras.

GENERAL ABSTRACT

MOTA, Helena Beatriz da Silva. **Identification of a new *Emaravirus* in *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) hybrid through high-throughput sequencing.** 2024. 37 p. Dissertation (Master's in Phytopathology) - University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Brazil is the second-largest producer of beef in the world, and the Brazilian beef production system is extensive, characterized by free-range animal grazing in large pasture areas during a significant portion of the animal's fattening period. Tropical forages, particularly grasses of the *Urochloa* genus (syn. *Brachiaria*), are commonly planted for this purpose. Despite limited literature on viral infections in forages, it is known that these plants are currently affected by such pathogens. These infections contribute to a decline in pasture quality, and the identification of these pathogens is not always straightforward, making it challenging to establish specific measures for diagnosis and proper management. High-throughput sequencing (HTS) has been crucial in identifying viral species due to the substantial amount of data generated. Therefore, the aim of this study was to detect viral species infecting forage plants using high-throughput sequencing. A novel emaravirus was discovered through HTS in a commercial hybrid cultivar between *Urochloa ruziziensis*, *U. decumbens*, and *U. brizantha*. The genome sequence was confirmed by Sanger sequencing and comprises five genome segments of negative-sense RNA, with RNA1 containing 6,867 nucleotides, encoding a P1 protein corresponding to a 2,289-amino acid RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). RNA2 contained 2,043 nt, encoding a P2 protein, precursor to the glycoprotein (GPP) of 681 aa. RNA1 (P1) and RNA2 (P2) segments showed 34.07% and 29.21% amino acid identity, respectively, to the P1 and P2 of *Emaravirus tritici*. RNA3 consisted of 981 nt, encoding a nucleocapsid (N) protein (P3) of 327 aa, which exhibited 15.19% identity to *Emaravirus toordali*. RNA4 presented 1,041 nt, which encode a 374 aa viral movement protein, and 50.7% identity with the P4 protein of *E. tritici*. RNA5 (P5) presented 1,008 nt, which encode a putative gene silencing suppressor protein, which is 8.9% related to the P5 of *E. tritici*. Phylogenetic analyses based on predicted amino acid sequences of RdRp and GPP indicated that these proteins are more closely related to the P1 and P2 of *Emaravirus tritici* and *E. parkinsoniae*. Meanwhile, analyses based on amino acid sequences of RNA3 (P3-N) indicated a relationship to P3 proteins of *Emaravirus vitis*, *E. sorbi*, *E. actinidae*, *E. syringae*, and *E. cercidis*. Since the basis for delineating species within the genus is established by amino acid sequences of RNA1 (RdRp), RNA2 (GPP), and RNA3 (N), which must have a difference greater than 25%, these data suggest that the virus found is a member of a new species within the genus *Emaravirus*. Therefore, the binomial name *Emaravirus urochloae* is proposed.

Keywords: High-throughput sequencing, *Emaravirus*, forage crops.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina do mundo, com uma produção média de aproximadamente 10 milhões de toneladas/ano, e o maior exportador mundial – em torno de 2,2 milhões de toneladas/ano (Aragão & Contini, 2020). O sistema de produção de carne bovina brasileiro é essencialmente extensivo, no qual é utilizado o pastejo de plantas forrageiras na maior parte da vida do animal, reduzindo os custos de produção.

As forrageiras tropicais são as forrageiras mais plantadas no Brasil. As gramíneas do gênero *Urochloa* (Sin. *Brachiaria*) são mais utilizadas. *U. brizantha*, *U. humidicola*, *U. ruziziensis* e *U. decumbens* são as principais espécies agronômicas no Brasil, sendo a *U. brizantha* a mais comum, contabilizando cerca de 50 milhões de hectares em todo país (Jank *et al.*, 2014).

Em regiões de clima tropical e subtropical, práticas inadequadas de manejo do pasto, ausência de adubações, falhas no estabelecimento e problemas bióticos, como insetos-praga e doenças, são causas principais da degradação de pastagens (Dias-Filho, 2011). Após a expansão agropecuária e consequente intensificação do cultivo de pastagens, o ataque de pragas e ocorrência de doenças tornaram-se problemas significativos, limitando a produtividade e qualidade das plantas, e, em alguns casos, resultando em perdas do plantio (Verzignassi & Fernandes, 2001).

O conhecimento sobre os patógenos causadores de doenças de etiologia viral em forrageiras são escassos, pois carece de identificação, dificultando o estabelecimento de medidas específicas para diagnóstico e manejo adequado (Marchi *et al.*, 2011). Até agora, apenas dois vírus foram identificados como agentes infecciosos em *Urochloa* spp. no Brasil: o johnsongrass mosaic virus (JGMV), classificado na família *Potyviridae* e no gênero *Potyvirus*, e o maize chlorotic dwarf virus (MCDV), pertencente à família *Secoviridae* e ao gênero *Waikavirus* (Silva *et al.*, 2013; Fragoso, 2019).

No âmbito da fitopatologia atual, as tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (HTS) desempenham um papel crucial na investigação da etiologia viral em plantas. A capacidade do HTS em analisar rapidamente uma enorme quantidade de material genético viabiliza a detecção sensível de patógenos virais, proporcionando uma compreensão mais profunda da diversidade genômica e facilitando a identificação de novos patógenos e variantes virais (Barba *et al.*, 2014).

Essa abordagem eficiente contribui de maneira significativa para a descoberta precoce, caracterização precisa e monitoramento contínuo de patógenos em plantas, destacando-se

como um avanço crucial na promoção da segurança alimentar e sustentabilidade agrícola (Pérez-Losada *et al.*, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

Dada a importância das plantas forrageiras para a agropecuária brasileira e o impacto significativo que infecções virais podem ter na qualidade das pastagens, é fundamental intensificar as pesquisas para detectar novas espécies virais nessas hospedeiras. Atualmente, há uma limitação na quantidade de estudos nessa área, e o uso da tecnologia de sequenciamento de alto rendimento (HTS) pode acelerar a obtenção de informações, contribuindo assim para uma diagnose mais eficaz e o manejo correto de viroses em plantas forrageiras.

3. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo detectar e analisar o genoma de uma nova espécie viral infectando planta forrageira, utilizando a tecnologia de sequenciamento de alto rendimento.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar parcialmente possíveis partículas virais presentes em amostras de plantas forrageiras de uso agrônomico no Brasil e realizar extração de RNA total;
- Sequenciar os ácidos nucleicos de vírus semi-purificado por sequenciamento de alto rendimento em plantas monocotiledôneas (forrageiras e milho);
- Analisar os dados obtidos com o auxílio de softwares em busca da descoberta de agentes etiológicos virais em plantas monocotiledôneas (forrageiras e milho);
- Confirmar o genoma de vírus identificados por HTS via sequenciamento de método Sanger;
- Analisar o genoma de vírus em amostras monocotiledôneas (forrageiras e milho).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. A cultura de *Urochloa* spp. no Brasil

Aproximadamente 95% da carne bovina no Brasil é produzida pelo sistema de pecuária extensiva, ocupando cerca de 156 milhões de hectares do território nacional compastagens, tornando o país ao nível mundial de maior exportador de carne bovina (MAPBiomass, 2020; Aragão & Contini, 2020). A utilização de gramíneas forrageiras tropicais na alimentação de bovinos oferece a oportunidade de reduzir significativamente os custos de produção, tornando a indústria brasileira de carne uma das mais competitivas em termos financeiros em escala

global (Ferraz & Felício, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016). O Brasil ocupa a posição de liderança no *ranking* mundial de exportação de sementes de forrageiras, destinando, em média, 237 mil hectares anualmente para a produção destas (Landau *et al.*, 2020).

As gramíneas forrageiras tropicais do gênero *Urochloa* (Sin. *Brachiaria*) são monocotiledôneas originárias da África Equatorial, e sua chegada ao Brasil se deu juntamente à dos escravos no período de colonização, quando estas gramíneas, mais especificamente *U. plantaginea* e *U. mutica*, eram feitas de colchões em navios negreiros (Ghisi, 1991; Alcantara, 1987; Parsons, 1972). No entanto, o estabelecimento das “braquiárias” com interesse agrônomo no país ocorreu nas décadas de 1950, com a introdução de *U. decumbens*, e 1960 com a introdução de *U. brizantha* e *U. ruziziensis* (Serrão & Simão Neto, 1971; Lapointe & Miles, 1992).

Urochloa é um gênero pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, tribo *Paniceae* e subtribo *Melinidinae*, e que compreende cerca de 135 espécies diferentes (Salariato *et al.*, 2010; Stevens, 2001). As forrageiras tropicais deste gênero são as mais plantadas no Brasil devido especialmente à rusticidade e tolerância a áreas de baixa fertilidade. Dentre as espécies, as mais usuais são *U. brizantha*, *U. humidicola*, *U. ruziziensis* e *U. decumbens*, sendo a *U. brizantha* a mais comumente utilizada, contabilizando cerca de 50 milhões de hectares em todo país (Jank *et al.*, 2014). Esta última espécie se destaca principalmente por sua resistência às cigarrinhas-das-pastagens (*Graminella nigrifrons*), sua capacidade de se adaptar bem a solos ácidos, e seu potencial significativo para a produção de forragem, alcançando cerca de 23 toneladas por hectare por ano de matéria seca. *U. humidicola* se desenvolve bem em solos mal drenados e apresenta tolerância às cigarrinhas-das-pastagens. Já *U. ruziziensis* e *U. decumbens* são altamente susceptíveis às cigarrinhas, todavia a primeira apresenta boa relação folha/colmo e a última proporciona excelente cobertura vegetal (Alvim *et al.*, 2022).

A taxonomia destas gramíneas é complexa e confusa devido à utilização de características morfológicas como critério para classificação do gênero (Ferreira *et al.*, 2021). Segundo Trinus (1826), estas gramíneas pertenciam ao gênero *Panicum*, não obstante, foram classificadas dentro do gênero *Brachiaria* devido aos ramos primários racemosos (Grisebach, 1853). Posteriormente, o gênero foi dividido em 9 grupos de acordo com características em comum, e as gramíneas forrageiras tropicais mais usuais foram distribuídas entre os grupos 5 (*B. brizantha*, *B. ruziziensis* e *B. decumbens*) e 6 (*B. humidicola*), ambos associados por englobarem espécies com espiguetas elípticas e oblongas, mas diferenciados pelo comprimento da gluma inferior, e presença ou não de venação reticulada na gluma superior e

lema inferior. Por fim, o gênero *Brachiaria* foi delimitado a abranger apenas espécies com desarticulação na base do antécio superior, e com antécio superior liso e brilhante, provocando a reclassificação da maioria das espécies como pertencentes ao gênero *Urochloa* (Renvoize *et al.*, 1996; Torres Gonzáles & Morton, 2005).

No Brasil, cultivares de *U. brizantha*, *U. humidicola*, e *U. ruziziensis* foram desenvolvidas ao longo dos anos para atender às necessidades específicas de cada região do país. A *U. brizantha* cv. Marandú é a cultivar brasileira mais predominante, e foi lançada em 1984, abrangendo os biomas Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Essa cultivar tem como principais características agronômicas a resistência às cigarrinhas-das-pastagens, a alta produção de forragem, e a tolerância ao frio, à seca, e ao fogo (Nunes *et al.*, 1984). Cultivares híbridas também foram desenvolvidas, como é o caso da cultivar Mulato II – híbrida entre *U. ruziziensis*, *U. brizantha*, e *U. decumbens*. A cultivar híbrida Mulato II é o resultado de três gerações de cruzamento e seleção realizadas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), a partir de cruzamentos entre *U. ruziziensis* tetraplóide sexual e a *U. decumbens* cv. Basilisk tetraplóide apomítica. As progênies sexuais deste primeiro híbrido cruzaram-se, por polinização aberta com híbridos sexuais e acessos de *U. brizantha*. O resultado foi uma cultivar com bons rendimentos de sementes de boa qualidade, boa adaptação a solos ácidos inférteis e bem drenados, e tolerância a solos com drenagem deficiente (Argel *et al.*, 2007). As cultivares do gênero *Urochloa* desenvolvidas no Brasil estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Cultivares de forrageiras tropicais do gênero *Urochloa* spp.

Cultivar	Espécies	Ano de lançamento	Instituição
Marandú	<i>U. brizantha</i>	1984	Embrapa (Brasil)
Mulato I	Híbrida (<i>U. ruziziensis</i> e <i>U. brizantha</i>)	2000	CIAT (Colômbia)
BRS Xaraés	<i>U. brizantha</i>	2003	Embrapa (Brasil)
Mulato II	Híbrida (<i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>U. decumbens</i>)	2005	CIAT (Colômbia)
BRS Piatã	<i>U. brizantha</i>	2006	Embrapa (Brasil)
BRS Tupi	<i>U. humidicola</i>	2009	Embrapa (Brasil)
BRS Paiaguás	<i>U. brizantha</i>	2013	Embrapa (Brasil)
MG13 Braúna	<i>U. brizantha</i>	2014	Comércio e Indústria Matsuda Importadora e Exportadora LTDA (Brasil)

BRS Ipyporã	RB331 Híbrida (<i>U. ruziziensis</i> e <i>U. brizantha</i>)	2017	Embrapa (Brasil)
BRS Ybaté	<i>U. brizantha</i>	2020	Embrapa (Brasil)
BRS Integra	<i>U. ruziziensis</i>	2020	Embrapa (Brasil)
Cayana	Híbrida (<i>U. ruziziensis</i> e <i>U. brizantha</i>)	2020	Barenbrug do Brasil Sementes LTDA (Brasil)
Convert 330	Híbrida (<i>U. ruziziensis</i> e <i>U. brizantha</i>)	2021	Barenbrug do Brasil Sementes LTDA (Brasil)
BARG156 780 J	Híbrida (<i>U. ruziziensis</i> e <i>U. brizantha</i>)	2021	Barenbrug do Brasil Sementes LTDA (Brasil)

Adaptado de An overview of the genetics and genomics of the *Urochloa* species most commonly used in pastures (Ferreira *et al.*, 2021).

Apesar das excelentes características agronômicas das cultivares de gramíneas forrageiras nacionais e sua contribuição para o desenvolvimento da pecuária brasileira, cerca de 75% das pastagens do país encontram-se em estado de degradação forte a moderada, limitando o potencial produtivo das forrageiras e levando à morte das plantas (Dias-Filho, 2014). Dentre os fatores importantes envolvidos na degradação está a intensificação do cultivo de pastagens, a qual desencadeou um aumento proporcional de incidência de pragas e doenças nessas áreas (Verzignassi & Fernandes, 2001). As doenças predominantes observadas em *Urochloa* spp. são de etiologia fúngica, no entanto, atualmente há relatos de sintomas típicos de infecções virais, como mosaico, clorose generalizada e nanismo (Marchi *et al.*, 2011; Sanches *et al.*, 2023).

As infecções virais podem comprometer a boa qualidade da pastagem, e seus sintomas podem ser facilmente confundidos com deficiência de nutrientes tais quais o nitrogênio e o enxofre (Sanches *et al.*, 2023). A falta de estudos e informações abrangentes sobre infecções virais em plantas forrageiras, em todas as esferas da literatura, destaca a necessidade premente de investigar a etiologia dessas doenças em áreas de pastagem. Isso é fundamental para possibilitar a aplicação de diagnósticos e práticas de manejo adequadas.

4.2. Principais vírus de *Urochloa* spp. no Brasil

As doenças de etiologia viral têm um impacto significativo nas plantas forrageiras, resultando na diminuição de seu potencial produtivo e qualidade reduzida (Verzignassi & Fernandes, 2001). Os sintomas mais comuns de infecção viral observados em plantas de *urochloa* incluem mosaico e estrias cloróticas nas folhas, bem como a redução no porte da planta, frequentemente manifestada como nanismo (Sanches *et al.*, 2023).

Até o momento, apenas dois vírus foram relatados infectando *Urochloa* spp. no Brasil: o johnsongrass mosaic virus (JGMV), pertencente à família *Potyviridae* e gênero *Potyvirus*, e o maize chlorotic dwarf virus (MCDV), pertencente à família *Secoviridae* e gênero *Waikavirus*. JGMV é transmitido por afídeos de maneira não-persistente, e já foi relatado por Silva e colaboradores (2013) no Estado da Bahia causando sintomas de mosaico em plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). A forma de transmissão do MCDV no Brasil é desconhecida. No presente estudo, foi detectado por High- Throughput Sequencing (HTS) um novo vírus infectando plantas de *Urochloa* no Brasil, pertencente à família *Fimoviridae* e gênero *Emaravirus*, os quais serão abordados no tópico seguinte.

4.3. A família *Fimoviridae* e o gênero *Emaravirus*

O gênero *Emaravirus* foi estabelecido pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) em 2012, após a caracterização de seu primeiro membro, *Emaravirus sorbi* (Mielke-Ehret & Muhlbach, 2012), um vírus de quatro segmentos de RNA identificado como agente causal de manchas anelares em *Sorbus aucuparia* L. O nome do gênero corresponde às iniciais do nome viral European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV), referente à espécie (Figura 1). Algumas doenças causadas por emaravirus, como a doença da roseta das rosas, mosaico dos figos, e manchas anelares da sorveira e do carvalho, já eram conhecidas há bastante tempo como sendo de etiologia viral, porém, os patógenos ainda não haviam sido totalmente caracterizados e classificados (Kegler, 1960; Ebrahim-Nesbat & Izadpanah, 1992). Em 2018, o gênero foi atribuído à nova família *Fimoviridae* (ordem *Bunyavirales*), a qual possui o gênero *Emaravirus* como único membro, contabilizando até o momento 29 espécies (Elbeaino *et al.*, 2018).

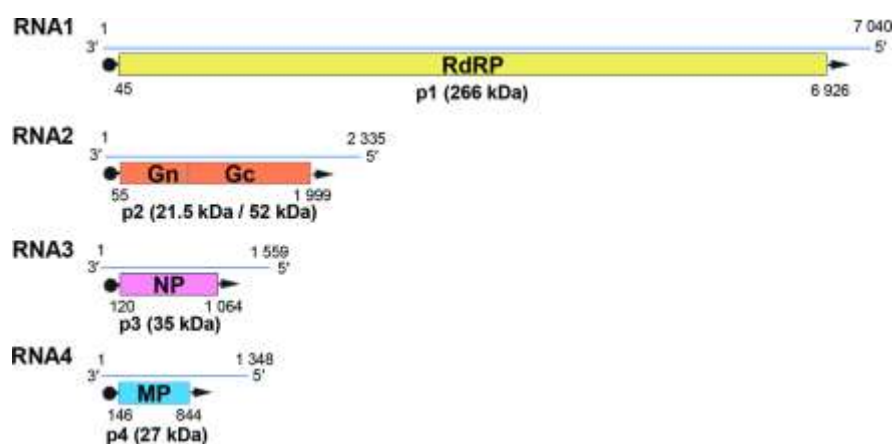


Figura 1. Organização gênica de European mountain ash ringspot-associated vírus (*Emaravirus sorbi*). As setas representam o sentido complementar ao vírus, a partir do qual as proteínas são traduzidas. RdRP, RNA polimerase dependente de RNA; Gn e Gc, glicoproteínas putativas clivadas; NP, proteína nucleocapsídeo; MP, proteína de movimento putativa. Fonte: ICTV.

As espécies desse gênero infectam uma variedade de hospedeiros, sendo em grande parte plantas dicotiledôneas, como camélia, cercis, figueira, kiwizeiro, carvalho, pereira, guandu, pistácia, framboeseira, roseira e sorveira (Rehanek *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2020; Di Bello *et al.*, 2016; Elbeaino *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2017; Rehanek *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Patil & Kumar, 2015; Buzkan *et al.*, 2019; McGavin *et al.*, 2012; Laney *et al.*, 2011; Kaillinen *et al.*, 2009), mas também há relatos de monocotiledôneas infectadas, como o milho e o trigo (Tatieni & Hein, 2021). Atualmente os emaravírus estão distribuídos pela América do Norte, Europa e Ásia, sendo a Argentina o único país da América do Sul onde um vírus do gênero – *Emaravirus tritici* - está presente (Alemandri *et al.*, 2017). Portanto, o gênero *Emaravirus* era considerado quarentenário ausente não regulamentado no Brasil, até a presente identificação de nova espécie de *Emaravirus* no Mato Grosso do Sul.

Os sintomas causados por emaravirose podem variar a depender da combinação emaravírus-hospedeira, e são mais comumente observados nas folhas, em forma de mosaico, manchas irregulares, amarelecimento, clareamento das nervuras ou manchas cloróticas anelares (Rehanek *et al.*, 2022). Casos de infecções latentes foram relatados em sorveiras infectadas por *Emaravirus sorbi* (Kaillinen *et al.*, 2009), e pereiras infectadas por *Emaravirus pyri* (Liu *et al.*, 2020). Em casos extremos, a infecção pode resultar no declínio e morte das plantas, como relatado em roseiras infectadas por *Emaravirus rosae* (Laney *et al.*, 2011).

A transmissão vetorial foi demonstrada para alguns emaravírus, indicando que ácaros eriofídeos podem ser os insetos vetores para os vírus do gênero. Estudos relataram que ácaros do gênero *Aceria* spp. são vetores de *Emaravirus fici*, *E. tritici*, *E. cajani* e *E. toordali* (Flock & Wallace, 1955; Seth, 1962; Kulkarni *et al.*, 2002; Seifers *et al.*, 1997). Os ácaros dos gêneros *Phytoptus*, *Phyllocoptes* e *Shevtchenkella* spp. são vetores de *E. sorbi*, *E. idaeobati* e *E. perillae*, respectivamente (Mielke-Ehret *et al.*, 2010; Gordon & Taylor, 1976; Kubota *et al.*, 2020). A transmissão por propagação vegetativa e transmissão mecânica foram demonstradas para *Emaravirus fici*, *E. cajani*, *E. sorbi*, *E. quercus*, *E. rosae*, *E. cercidis* e *E. populi* (Alfieri, 1967; Kumar *et al.*, 2003; Fuhrling & Buttner, 1995; Laney *et al.*, 2011; Di Bello *et al.*, 2016; Von Bargen *et al.*, 2020). Kubota e colaboradores (2020) relataram um tempo mínimo de aquisição do vírus *E. perillae* de 30 minutos por seu vetor *Shevtchenkella* sp., e Mielke-Ehret e colegas (2010) constataram que o nucleocapsídeo viral de *E. sorbi* não está restrito ao aparelho bucal dos ácaros, não obstante, não está claro se os vírus se replicam dentro dos vetores. A transmissão persistente foi relatada para *E. fici* e *E. tritici* (Proeseler, 1969; Seifers *et al.*, 1997).

Espécies do gênero *Emaravirus* estão relacionados às famílias *Tospoviridae* e

Peribunyaviridae dentro da ordem *Bunyavirales*, pois compartilham características tais quais viriões envelopados, genomas segmentados, motivos conservados na sequência de aminoácidos de RdRp, e extremidades terminais conservadas de cada segmento de RNA. Estas similaridades sugerem uma relação distante entre essas famílias virais (Elbeaino *et al.*, 2018). Quatro motivos na RdRp (RHD, TPD, ExK e TDL) conservados entre diferentes gêneros da superfamília *Bunyaviridae* foram identificados entre 66-242 aa em emaravírus, e são específicos do subdomínio da endonuclease, conhecido por desempenhar um papel no mecanismo de *cap-snatching* (Kumar *et al.*, 2017). O mecanismo de *cap-snatching* é um processo pelo qual alguns vírus capturam o *cap* dos mRNAs do hospedeiro para iniciar a transcrição dos seus próprios mRNAs (Olschewski *et al.*, 2020). A morfologia das partículas virais de emaravírus assemelha-se a pequenas esferas envelopadas com 80-100 nm de diâmetro. Todos os segmentos têm suas extremidades conservadas em um trecho de 13 nucleotídeos, podendo variar em algumas bases, com extremidades 5' (5'-AGUAGUGUUCUCC-3') e 3' (5'-AGUAGUGAACUC-3') parcialmente complementares permitindo assim a formação de uma estrutura “panhandle” promotora de replicação e transcrição (Mielke-Ehret & Mühlbach, 2012; Rehanek *et al.*, 2022). Segundo o International Committee of Virus Taxonomy - ICTV (2018), o critério de demarcação para espécies desse gênero é baseado na sequência de aminoácidos de produtos gênicos de RNA1 (RdRp), RNA2 (GPP) e RNA3 (NC), que devem diferir em mais de 25% em relação às espécies já demarcadas.

O genoma dos Emaravírus é composto por múltiplos segmentos de RNA de fita simples, cada um contendo um único quadro de leitura aberto (*open reading frame* – ORF), sendo que todos os membros descritos até o momento possuem quatro segmentos do genoma em comum, os quais demonstraram ser suficientes para o estabelecimento de infecção sistêmica e indução de sintomas (Verchot *et al.*, 2020). São eles (figura 1): o RNA1, que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) de aproximadamente 7kb, o RNA2, que codifica um precursor da glicoproteína (GPP) com comprimento de 2-2,5 kb, o RNA3, que codifica o nucleocapsídeo (N) de 1,1-1,6 kb, e o RNA4, que codifica a proteína de movimento viral (MP) de 1,1-1,6 kb. Segundo Rehanek e colaboradores (2022), estes segmentos sempre se organizam filogeneticamente em quatro clados principais (A, B, C, D) quando as sequências de aminoácidos são analisadas, sendo que os dois primeiros clados provavelmente têm uma origem comum por se agruparem com altos valores de *bootstrap*, enquanto que os clado C e D podem ou não ter um ancestral comum.

Em alguns emaravírus foi identificada a presença de duas sequências que codificam a

proteína N. Isso foi observado em *Emaravirus tritici*, *E. chrysanthemi*, *E. perillae*, e *E. pistaciae*, com a divergência na sequência de aminoácidos entre as variantes de 12,5 -52% (Buzkan *et al.*, 2019; Kubota *et al.*, 2020; Kubota *et al.*, 2021; Tatieni *et al.*, 2014). A evidência de duplicação de alguns segmentos de RNA em certas espécies é uma indicação da co-infecção de diferentes variantes de sequências do mesmo vírus, e a pressão de seleção em genomas multipartidos pode atuar de forma incomum (Buzkan *et al.*, 2019). A evolução através do rearranjo de segmentos de RNA devido à troca entre cepas, a seleção e à deriva genética foram demonstradas para populações de *Emaravirusfisci* (Walia *et al.*, 2014).

Além dos quatro segmentos principais, a maioria dos emaravírus possui segmentos adicionais no genoma, com o maior número de segmentos chegando a dez, como é o caso de *Emaravirus perillae*, que além de possuir dois segmentos RNA3 que codificam N, possui também um RNA5, RNA6, e RNA7, com funções desconhecidas (Kubota *et al.*, 2020). Essa variação no número de segmentos do genoma tem suscitado debates sobre a contagem precisa de segmentos carregados por cada vírus, e em alguns casos, os genomas foram revisados e ampliados (Di Bello *et al.*, 2015; Patil *et al.*, 2017; von Bargaen *et al.*, 2019; Hassan & Tzanetakis, 2019). Existem proteínas codificadas por variantes do mesmo segmento e que possuem mais de 80% de identidade aa, sendo consideradas homólogas, e também existem proteínas codificadas por segmentos variantes que se diversificam a ponto de serem consideradas possíveis parálogas (Katsiani *et al.*, 2020; Kubota *et al.*, 2020). As funções da maioria das proteínas adicionais ainda não foram caracterizadas experimentalmente. Até o momento, a maioria das pesquisas tem se concentrado em aspectos epidemiológicos, utilizando tecnologia de sequenciamento de alto rendimento para identificar novos integrantes de espécies do gênero (Kormelink *et al.*, 2021).

4.4. Sequenciamento de alto rendimento (*High-Throughput Sequencing-HTS*) aplicado à virologia

A técnica de *High-Throughput Sequencing* (HTS), desenvolvida a partir dos anos 2000, é uma tecnologia avançada que revolucionou o sequenciamento de ácidos nucleicos, oferecendo velocidade, alto rendimento, e produção massiva de sequências em uma única execução de custo relativamente baixo (Liu *et al.*, 2012). No entendimento de Barba e colaboradores (2014), os benefícios da tecnologia HTS superam o sequenciamento Sanger, considerado um método de “primeira geração”. As principais vantagens do sequenciamento HTS em relação ao Sanger são: a capacidade de sequenciar centenas e milhares de genes ou

regiões genéticas simultaneamente, maior sensibilidade para detectar variantes de baixa frequência, cobertura genômica abrangente, tempo de resposta mais rápido para grandes volumes de amostras, maior quantidade de dados gerados a partir de quantidades menores de DNA, e maior viabilidade econômica para investigação de um grande número de amostras (Barba *et al.*, 2014).

A quantidade significativa de dados gerados pela tecnologia HTS é crucial para analisar espécies virais, dada a sua vasta escala. A utilização da técnica de HTS pode ser aplicada a análises de metagenoma viral, sequenciamento completo de genomas virais, e investigação da interação entre vírus e hospedeiro (Barzon *et al.*, 2013; Katsiani *et al.*, 2020; Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2021; Villamor *et al.*, 2016; Zamfir *et al.*, 2023). Uma das facetas mais fascinantes desta abordagem é a identificação de novos ou não previamente suspeitos patógenos virais, potencializando a descoberta e sugerindo novas classificações (Pérez-Losada *et al.*, 2020). O sequenciamento de genomas completos de novas espécies virais acelerou consideravelmente após o surgimento da tecnologia HTS (Al Rwahani *et al.*, 2018; Fox *et al.*, 2019; Debat *et al.*, 2019; Kubota *et al.*, 2021; Nabeshima & Abe, 2021; Rumbou *et al.*, 2021; Roberts *et al.*, 2024; Diaz-Lara *et al.*, 2024).

Existem diversas plataformas de sequenciamento HTS disponíveis no mercado, variando em protocolo, rendimento e comprimento de sequência. A plataforma 454 da Roche emprega o pirosequenciamento para produzir leituras com comprimentos variando entre 400 pb e 700 pb, alcançando uma saída máxima de execução de 700 Mb com o modelo GS FLX Titanium (Patrick, 2007; Draigle *et al.*, 2011). Em contraste, a Illumina, presentemente líder no mercado de sequenciamento, gera reads menores (100-300 pb) por meio do método de terminação reversível. As plataformas Illumina têm uma ampla faixa de capacidade, desde alguns gigabases, como no MiSeq, até múltiplos terabases, como no caso do NovaSeq (Quail *et al.*, 2008; Modi *et al.*, 2021). As plataformas SOLiD (Life Technologies) e PacBio (Pacific Bioscience) geram leituras com o comprimento de 85 pb e 5000 pb, respectivamente (Van Dijk *et al.*, 2014).

Contrariamente às tecnologias citadas, onde o sequenciamento é pausado após cada incorporação de base, em Ion Torrent (Pacific Bioscience) e Nanopore (Oxford) o sequenciamento é de molécula única e em tempo real, gerando comprimentos médios de leitura superiores a 15 kpb e transferência por execução de até 10 GB, porém com uma alta taxa de erro de 11-15% (Schadt *et al.*, 2010). Além de leituras mais longas, outras vantagens dessas tecnologias em relação às demais são a não necessidade de amplificação por *Polymerase Chain*

Reaction (PCR), o que torna a cobertura genômica mais homogênea, e o baixo requisito de DNA para a obtenção dos resultados (Pérez-Losada *et al.*, 2020).

Devido à enorme quantidade de dados brutos gerados pelas plataformas de HTS, a análise, armazenamento e gerenciamento de dados tornam-se bastante complexos, tornando necessário o uso de ferramentas bioinformáticas de algoritmos diversos e que atendam os diferentes formatos de dados e comprimentos de leitura (Zhang *et al.*, 2011). O alinhamento e montagem do genoma bem sucedidos são cruciais para os passos seguintes da análise, e diversas ferramentas são utilizadas para estas finalidades (Flicek & Birney, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Para a identificação de vírus, os passos a serem seguidos em análises de dados são: análise de qualidade das leituras, remoção de sequências de baixa qualidade ou regiões não confiáveis do conjunto de dados sequenciados (“trimagem” dos dados), montagem computacional do genoma a partir da sobreposição e alinhamento dos fragmentos de sequência (montagem *de novo*), e comparação do genoma montado com sequências de referência (Blawid *et al.*, 2017).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material vegetal sintomático

Folhas com sintomatologia viral típica de híbrido de *Urochloa* spp. (sin *Brachiaria* spp., variedade Mulato II, híbrida de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *U. decumbens*; Campo Grande-MS), *Urochloa* spp. (acesso 69-32; híbrida de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *U. decumbens*; Campo Grande-MS), *Urochloa* spp. (acesso 723-39; híbrida de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *U. decumbens*; Campo Grande-MS); *Panicum maximum* (Campo Grande-MS), milho (*Zea mays*; Brasília-DF) - foram coletadas em áreas experimentais da Embrapa Gado de Corte (CNPGC), em Campo Grande-MS, em maio de 2022, e em Brasília -DF. As plantas forrageiras sintomáticas do gênero *Urochloa* e *Panicum* representam genótipos que fazem parte do banco de germoplasma do programa de melhoramento de plantas forrageiras da Embrapa Gado de Corte. Sintomas típicos observados são ilustrados na Figura 2.



Figura 2: Sintomas virais em amostra de genótipo híbrido de *Urochloa* spp. Sintoma de mosaico típico causado por infecção viral. Estes sintomas foram observados nos demais genótipos coletados dos bancos ativos de germoplasma da Embrapa-CNPQC.

5.2. Purificação parcial de partículas virais e preparo das amostras parasequenciamento

A purificação parcial de vírus foi realizada com o objetivo de concentrar em pequenos volumes as possíveis partículas existentes na amostragem. Para isso, um total de 100 g do *pool* de plantas de amostras foliares de forrageiras (Híbrida *U. ruziziensis* x *U. brizantha* x

U. decumbens e *Panicum maximum*) coletadas em Campo Grande - Mato Grosso do Sul, e milho, coletado em Brasília - DF foram maceradas em nitrogênio líquido, e, em seguida, transferidas para um *mixer* vertical (Philips, Amsterdã, Holanda) juntamente com 300 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 7,4) e β - mercaptoetanol 0,2%. Após a homogeneização a mistura foi filtrada com coador voal, e distribuída em tubos falcon de 50 mL, os quais foram centrifugados a 4000 x g durante 30 minutos a 8 °C, para a retirada de resíduos grosseiros. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e centrifugado a 10000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante foi misturado com Triton 100X 1% e submetido a agitação contínua durante 1 hora a 12 °C. Em seguida, a mistura foi distribuída em tubos para ultracentrifugação, sendo 25% do volume de cada tubo destinado ao *cushion* (colchão) de sacarose 20%. Os tubos foram centrifugados durante 1 hora e 25 minutos a 142000 x g a 8 °C de temperatura. Após a ultracentrifugação foi possível observar a formação de *pellets* (Figura3) de partículas virais.



Figura 3. *Pellet* formado após ultracentrifugação em colchão de sacarose, indicado pela seta vermelha.

Após a purificação parcial de partículas virais, o RNA foi extraído utilizando o Total RNA Purification Kit (Cellco Biotech, São Carlos, São Paulo) seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, as amostras foram preparadas seguindo as orientações da empresa de sequenciamento (Plataforma Illumina Novaseq 6000, Macrogen, Seul, Coréia do Sul). Foram preservadas utilizando RNAsstable (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e enviadas para o sequenciamento de alto rendimento Illumina Novaseq, o qual resultou em 10 GB de dados.

5.3. Bioinformática

A remoção de reads (leituras de HTS) de baixa qualidade e de outros artefatos dos dados brutos do sequenciamento foram feitas utilizando o software BBDuk. Os algoritmos desse software são projetados para uma variedade de tarefas relacionadas a dados de sequenciamento de alto rendimento, como a filtragem e “trimagem” dos dados (Bushnell, 2014). Sequências contíguas de cDNA correspondente ao RNA amostral (*contigs*) foram montadas a partir de menores (*reads*) que foram sequenciados e sobrepostos computacionalmente para a montagem do genoma, sem necessidade de um genoma de referência. Os *contigs* foram montados utilizando o software MEGAHIT 1.2.9, um montador *de novo* de leitura para dados de metagenômica grandes e complexos (Li *et al.*, 2015), e em seguida, foi utilizado o software Geneious Prime (Kearse *et al.*, 2012) para buscas em bancos de dados de proteínas virais através de consulta de nucleotídeos traduzidos pela plataforma BlastX (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando os últimos registros RefSeq de proteínas de vírus de RNA atualizados do NCBI Virus (2023) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) como sequências de referência. *Contigs* que exibiam uma baixa similaridade de aminoácidos (inferior a 55%) em relação às sequências de vírus de referência foram confrontados com o banco de dados de nucleotídeos do NCBI (Blastn) para assegurar que as sequências eram provenientes

de vírus, e não de outro organismo. Em seguida, utilizando a ferramenta *map to reference* no Geneious Prime, que se refere ao processo de associar sequências de DNA ou RNA com sequências de referência conhecidas, os *contigs* identificados como segmentos de um novo emaravírus foram montados pelo alinhamento com todos os dados gerados pelo HTS.

5.4. Sequenciamento *de Novo* por Sanger e análise filogenética

Para a detecção do novo vírus entre as plantas do *pool*, foram desenhados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: Emara1_NC_838_Senso(AGCCATCATCACCCCTTACAAG) e Emara1_NC_1455_CompViral (GCCTTTGATGTTGAGAAGTG), que amplificam o segmento equivalente ao nucleocapsídeo. Primers específicos para vírus já descritos pela literatura -maize rayado fino virus, maize yellow mosaic virus, sugarcane mosaic virus, johnsongrass mosaic virus e maize striate mosaic virus- também foram desenhados e a detecção feita por RT-PCR (Apêndice A). A reação de RT foi performada utilizando primers randômico e oligodT50M10. Após a desnaturação, a síntese do cDNA foi feita seguindo 1 ciclo de 10 min a 25°C e 50 min a 37°C. As reações de PCR foram feitas utilizando enzima Taq polimerase (Sinapse, São Paulo, São Paulo) com o seguinte ciclo: 1 min a 94°C; 35x (30 seg a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C); 1 min a 72°C. O RNA de cada planta do *pool* de amostras foi extraído separadamente a partir de amostras armazenadas em freezer -80°C, utilizando Total RNA Purification Kit(Cellco Biotec, São Carlos, São Paulo) seguindo as orientações do fabricante. Após realizada RT-PCR utilizando os *primers* para o gene do nucleocapsídeo, o novo vírus foi detectado em uma cultivar denominada Mulato II, híbrida entre *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *U. decumbens*.

Em seguida, primers foram desenhados (Apêndice A) para amplificação de cada segmento do novo *Emaravirus* para sequenciamento do genoma completo por Sanger . A transcrição reversa foi performada utilizando a enzima SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e *primer* randômico em um ciclo de: 10 min a 25 °C, 50min a 50 °C e 10 min a 80 °C. Antes da aplicação da enzima na reação de transcrição reversa foi feito um ciclo de 70 °C por 5 min, e 8 °C por 3 min, para desmanchar possíveis estruturas secundárias da fita de RNA. Após a obtenção do cDNA, as reações de PCR foram conduzidas utilizando LongAmp Taq DNA Polymerase (NEB, Ipswich, EUA) nas seguintes condições: um ciclo de pré desnaturação de 1 min a 80 °C seguido de 2 min a 94 °C para quebrar as pontes de hidrogênio entre a dupla fita, e ativar a enzima; trinta e cinco ciclos de 40 s a 94 °C para desnaturação, seguido de 30 s a 55 °C para anelamento, e 1 min 30 s a 65 °C para extensão; um ciclo de 3 min a 65 °C para extensão final. Os protocolos de RACE 5' e 3' foram realizados

conforme descrito no trabalho de Nicolini e colaboradores (2015), e os fragmentos de cDNA foram sequenciados pelo método de Sanger.

Para análise filogenética, foram utilizadas as sequências de aminoácidos da RdRp, nucleocapsídeo, precursor da glicoproteína, MP da nova espécie viral, e das demais espécies do gênero *Emaravirus*, incluindo variantes dos segmentos (Apêndice B). As sequências referentes ao RNA5 (P5 putativa supressora de silenciamento gênico) do novo emaravírus também foi analisada juntamente às sequências dos demais vírus do gênero que também possuem este segmento no genoma. Devido à sua distante relação com o gênero *Emaravirus*, uma espécie viral do gênero *Tospovirus*, conhecida como *Orthotospovirus tomatomaculae* ou nome viral tomato spotted wilt virus (TSWV), foi selecionada como grupo externo (*outgroup*) para a análise. As sequências foram submetidas a múltiplos alinhamentos usando o método Clustal W pelo software MEGA 7.0. As árvores filogenéticas foram inferidas pelo IQ-TREE (www.iqtree.org) seguindo o modelo Máxima-Verossimilhança, com um *bootstrap* de mil repetições (Kumar *et al.*, 2016).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas um total de 87.630.010 leituras e foram reunidos 1.058.023 *contigs*, com um comprimento médio de 491 pb. Quatro *contigs* foram identificados com sequências de aminoácidos que apresentam semelhança com proteínas do vírus do mosaico do trigo (*Emaravirus tritici*). Os níveis de identidade foram de 40,5% para uma (RdRp) com 1.908 aa, 32,4% para uma (GPP) com 624 aa, 57% para uma (MP) com 282aa, e 48% para uma suposta proteína de (VSR) com 127 aa. Além disso, foi identificado um *contig* relacionado ao (NC) com 116 aa e uma identidade de sequência de aminoácidos de 31,9% com o vírus *Emaravirus cordylinae*.

O genoma completo foi montado pelo mapeamento de todas as leituras geradas no sequenciamento, utilizando os cinco *contigs* como referência. As especificações do genoma completo estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2. Identidade dos contigs de HTS de monocotiledôneas do Mato Grosso do Sul e Distrito Federal.

Proteína	Tamanho (nt)	Nº de leituras alinhadas	Identidade pareada (%)	Cobertura média
RdRp	7.037	47.626	98,3	1045.2
Glicoproteína	2.554	46.143	98.2	151
Nucleocapsídeo	1.756	79.032	98.4	6406.2

Proteína de movimento	1.630	13.489	98.2	151
Supressora de silenciamento gênico putativa	793	10.873	98.7	151

Tamanho em número de nucleotídeos, número de leituras ou *reads* alinhadas, porcentagem de identidade pareada e cobertura média dos alinhamentos com as proteínas RdRp, precursor da glicoproteína, proteína do nucleocapsídeo, proteína de movimento, e proteína putativa supressora de silenciamento gênico.

A presença dos vírus previamente relatados maize rayado fino virus, maize yellow mosaic virus, sugarcane mosaic virus, johnsongrass mosaic virus e maize striate mosaic virus, foi confirmada em *pool* de amostras de milho, sendo que a presença de johnsongrass mosaic virus também foi confirmada em *pool* de amostras de forrageiras. Para confirmar a presença do vírus em amostras individuais foi realizada RT-PCR com *primers* específicos, visando o gene do N (Apêndice A), com o tamanho de fragmento esperado de 617 pb (Figura 4). Cinco amostras de campos experimentais da Embrapa Gado de Corte (CNPGC), localizada no Mato Grosso do Sul, foram testadas, sendo elas *Zea mays*, *Panicum maximum*, e três genótipos diferentes híbridos entre *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *U. decumbens*. Dentre as cinco plantas testadas, apenas um dos híbridos, o 970-10, denominado cultivar Mulato II, testou positivo para a proteína do NC.



Figura 4. Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose, utilizando, individualmente, o cDNA das plantas presentes no pool de amostras a partir do qual foi performedo o sequenciamento de alto rendimento. Amostra 1 (milho), 2 (*Panicum maximum*), 3 (genótipo 69-32 híbrido de *Urochloa* spp.) e 4 (genótipo 732-39 híbrido de *Urochloa* spp.) foram negativas e 5 (*Urochloa* cv. Mulato II) testou positivo para o N do novo *Emaravirus*, gerando um fragmento de 617 pb. Como controle positivo foi utilizado o cDNA gerado a partir da extração de RNA total do *pool* contendo todas as amostras.

O genoma completo foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos (Apêndice A) e sequenciado *de novo* por Sanger, gerando sequências equivalentes às geradas pelo HTS. A organização genômica resultante é típica de *Emaravirus* (Kubota *et al.*, 2020; Kubota *et al.*, 2021), o RNA1 apresenta 6.867 nucleotídeos, que codificam uma proteína P1 correspondente à RdRp de 2.289 aa. O RNA2 apresentou 2.043 nt, que codificam uma proteína P2 que corresponde à GPP de 681 aa. Os segmentos RNA1 (P1) e RNA2 (P2) apresentaram identidade de 34,07% e 29,21%, respectivamente, à P1 e P2 de *Emaravirus tritici*. O RNA3 apresentou 981 nt, que codificam uma proteína P3 do nucleocapsídeo (N) de 327 aa, a qual apresentou 15,19% de identidade com *Emaravirus toordali*. O RNA4 apresentou 1.041 nt, que codificam uma proteína P4 de movimento viral de 374 aa, e 50,7% de identidade com a proteína P4 de *E. tritici*. O RNA5 (P5) apresentou 1.008 nt, que codificam uma suposta proteína supressora de silenciamento gênico, a qual 8,9% relacionada à P5 de *E. tritici*. Considerando que a demarcação critério do ICTV para novas espécies é a diferença superior a 25% de sequência de aminoácidos nos produtos gênicos de RNA1(P1-RdRp), RNA2 (P2-GPP) e RNA3(P3- N), foi considerado uma nova espécie com sugestão do nome binomial de *Emaravirus urochloe* (Figura 5).

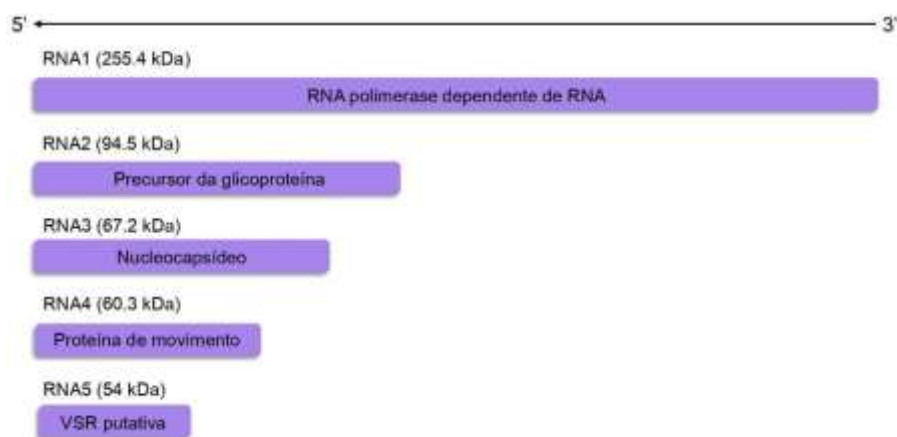


Figura 5. Organização genômica de nova espécie proposta *Emaravirus urochloe*. Como o genoma é ssRNA sentido negativo, a seta representa o sentido complementar ao vírus, a partir do qual as proteínas são traduzidas. Cada segmento genômico de RNA codifica uma única sequência aberta de leitura (“open reading frame”-ORF).

Assim como as demais espécies do gênero, o novo *Emaravirus urochloe* possui segmentos conservados de 13 nucleotídeos nas extremidades terminais de cada segmento do genoma, e que apresentam complementaridade parcial, possibilitando a formação de estruturas circulares facilitadoras da replicação e da transcrição para cada segmento de RNA, conhecidas como *panhandles* (Komerlink *et al.*, 2021). Essas sequências conservadas são 5'-AGUAGUGUUCUCC-3' para a extremidade 5' e 5'-AGUAGUGAACUC para a extremidade

3' (Figura 6). Quatro motivos envolvidos no mecanismo de *cap-snatching*, presentes entre 66 a 242 aa da RdRp de diferentes gêneros da superfamília *Bunyaviridae*, incluindo *Emaravirus*, foram parcialmente identificados em *Emaravirus urochloe* (Figura 7).

Consensus	5'-AGUAGUG CCUC...GGAGU CACUACU-3'
<i>E. urochloe</i>	5'-AGUAGUG <u>AUC</u> UCC...GGAGU <u>A</u> CACUACU-3'
<i>E. idaeobati</i>	5'-AGUAGUG <u>UU</u> CUC...GGAGU <u>UU</u> CACUACU-3'
<i>E. tritici</i>	5'-AGUAGUG <u>AUC</u> UCC...GGAGU <u>A</u> CACUACU-3'
<i>E. ziziphi</i>	5'-AGUAGUG <u>UU</u> CUC...GGAGU <u>UU</u> CACUACU-3'
<i>E. cordylinae</i>	5'-AGUAGUG <u>UW</u> CUC...GGAGU <u>UW</u> CACUACU-3'
<i>E. quercus</i>	5'-AGUAGUG <u>UU</u> CUC...GGAGU <u>A</u> CACUACU-3'
<i>E. sorbi</i>	5'-AGUAGUG <u>WW</u> CUC...GGAGU <u>UU</u> CACUACU-3'

Figura 6. Sequências conservadas nas extremidades 5' e 3' do genoma em *Emaravirus*. Os nucleotídeos conservados estão mostrados em azul, e os nucleotídeos sublinhados não apresentam complementaridade.

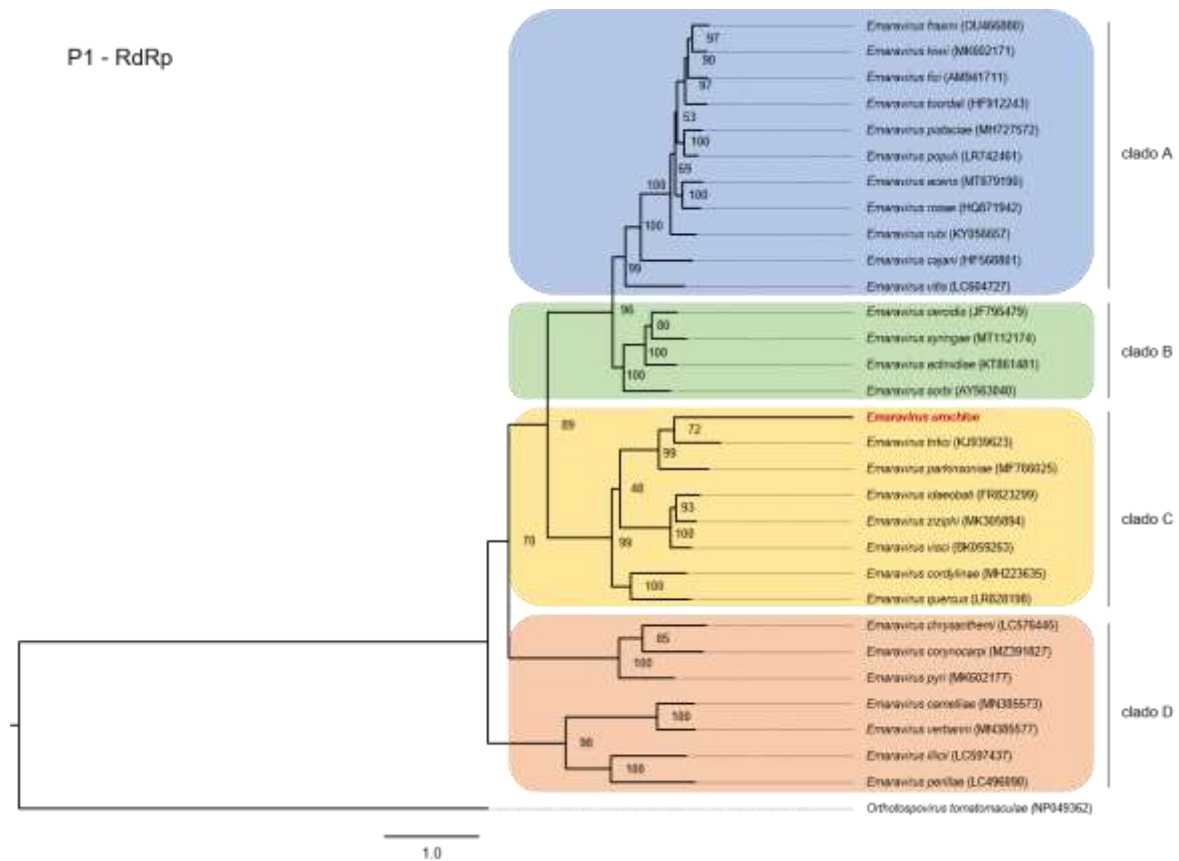
<i>E. urochloe</i>	66	CVLTPDFIFVKNRKDYDMEMLAKKPKYKPPHL	RRKWEKELMDDFYSRKSWADIMEGE	123
<i>E. fici</i>	66	DLVSLSEGILHTPPNQSQIDIAATLIGLLELS	RHDLILLCINELLQNQGYTIMGYDV	123
<i>E. toordali</i>	66	DTIALAESILHSAPNPGQIDIVATVIGLLELI	RHDVLLLSINELLQAGYQIMGYDQ	123
<i>E. cajani</i>	66	ELIKLAELILYQPPREEQLDIVVTINLLELV	RHDVLRLSISEHLPCWMYNSCTGS	123
<i>E. tritici</i>	66	KLYNFAMNLANVKPNKYLDLVFTIISLFEMF	RHDLLEIVKSQLKDYIFIDQDFKL	123

<i>E. urochloe</i>	124	SSNPESSTEELDDLVLHIV.....	EVKVTSANDISSFYKKYKDEVNDDALV	170	
<i>E. fici</i>	124	PIKDVFPFIDSIL	TPDIFFADDYDYIL..EVKVRGKK	TDLSVYYNRYKSVVDGSQK	179
<i>E. toordali</i>	124	QIKNIFPFIDSIL	TPDIFFRSGEFYIL..ELKVRNRK	TDLSIYYNRYKSAVQCHTK	179
<i>E. cajani</i>	124	QDERCLSKLWSNL	TPDVYFSDFGQNRNYIC.EVKVRNKH	TDLNLFYDKYSNVLRTYHV	180
<i>E. tritici</i>	124	SDYFPDVTIHL..	TPDILMQHKETEKLLVVEIKVT.VSSD	LESFYKKYKPHIGETDL	178

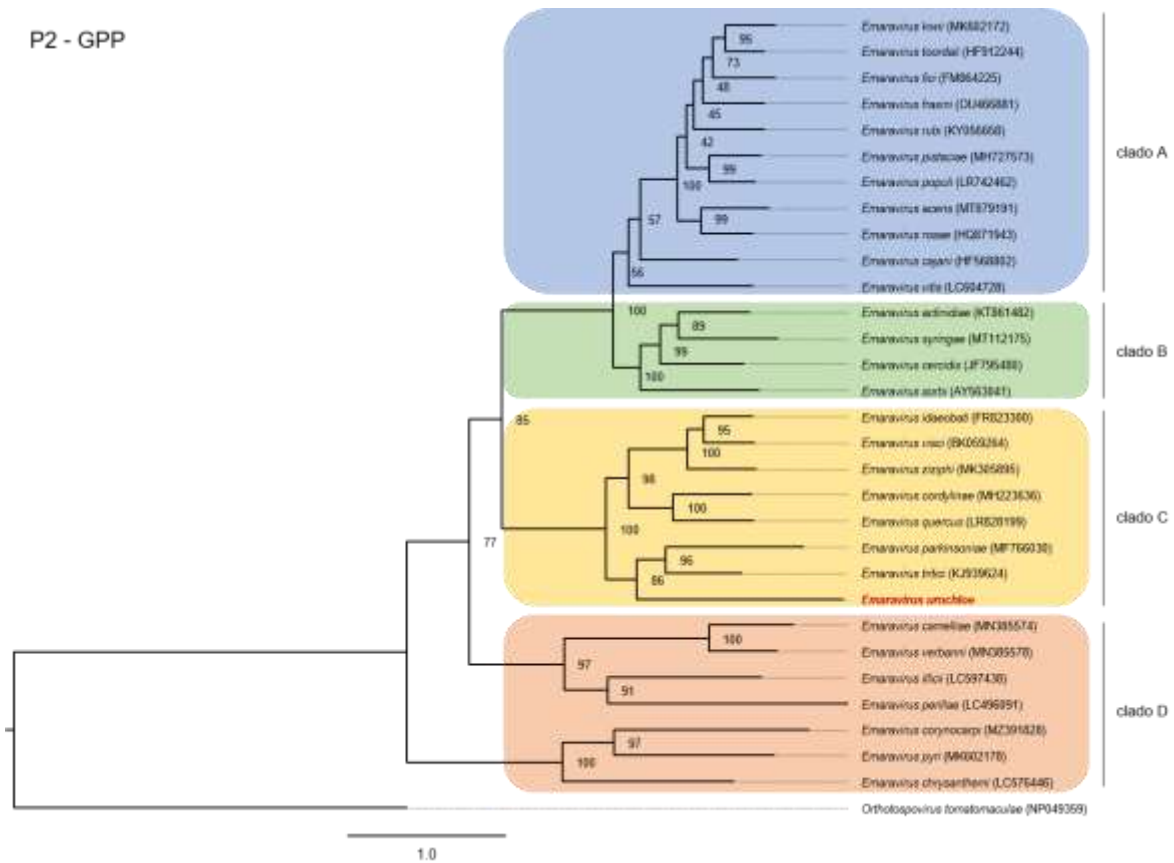
Figura 7. Alinhamentos múltiplos de sequência de aminoácidos representando a subunidade de endonuclease de alguns membros do gênero *Emaravirus*. O alinhamento de sequência baseado no subdomínio da endonuclease dos *Emaravirus* foram alinhados na posição de aminoácidos 66 a 242 aa. Motivos moderadamente conservados foram (RHD₉₈₋₁₀₀, TPD₁₃₆₋₁₃₈ EVK₁₅₂₋₁₅₄ e KTDL₁₅₈₋₁₆₁) identificados, e estão representados em vermelho.

As análises filogenéticas realizadas indicam que tanto o segmento RNA1 (P1- RdRp) quanto o RNA2 (P2-GPP), ambos considerados para delimitação de espécies no gênero, estão mais relacionados aos RNA1 (P1-RdRp) e RNA2 (P2-GPP) de *Emaravirus tritici*, seguidos por *Emaravirus parkinsoniae* (Figura 6 e 7). *Emaravirus tritici* possui o genoma composto por oito segmentos de RNA de fita simples e sentido negativo, cada um contendo um único quadro de leitura aberto. O RNA 1 tem 6.981 nucleotídeos, codificando uma RNA polimerase dependente de RNA (P1-RdRp) de 2.272 aa. O RNA 2, com 2.211 nt, codifica um precursor de glicoproteína (P2-GPP) de 667 aa. O RNA 3 possui duas variantes de 1.439 e 1.441 nt, codificando proteínas do nucleocapsídeo (P3-N) de 286 e 289 aa, respectivamente. O RNA 4

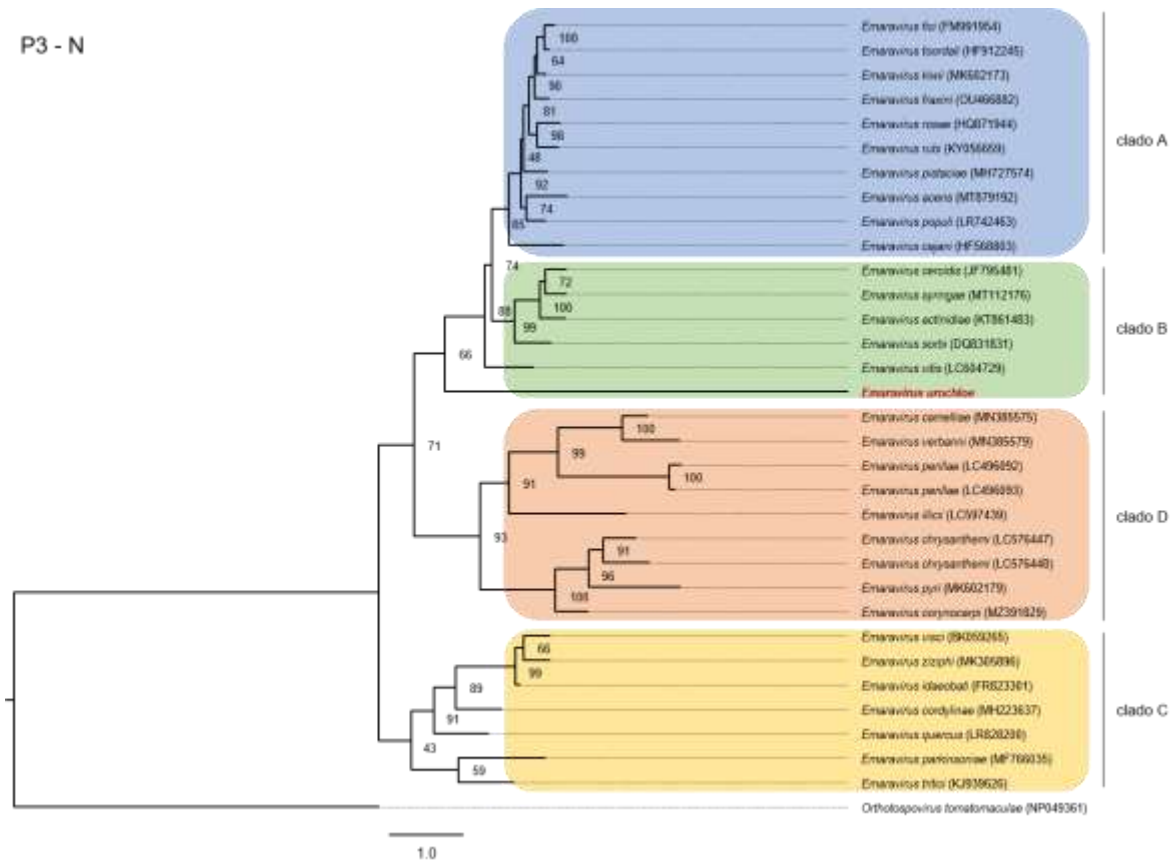
tem 1.682 nt e codifica uma proteína de movimento (P4-MP) de 364 aa. Os RNA 5 e 6, com 1.715 e 1.752 nt, codificam proteínas P5 e P6 com funções desconhecidas de 478 e 492 aa, respectivamente. Já os RNA 7 e 8, de 1.434 e 1.339 nt, codificam proteínas P7 e P8 de 305 e 176 aa, respectivamente, também com funções ainda não esclarecidas (Tatineni *et al.*, 2014). *Emaravirus parkinsoniae* possui quatro RNAs 1 a 4 de aproximadamente 7, 2, 1.4, e 1.5 kb, que codificam P1-RdRp, P2-GPP, P3-N, e P4-MP, e apresentam similaridade de 60-65% com os RNAs análogos ao 1 a 4 de *Emaravirus tritici* (Ilyas *et al.*, 2018).



P2 - GPP



P3 - N



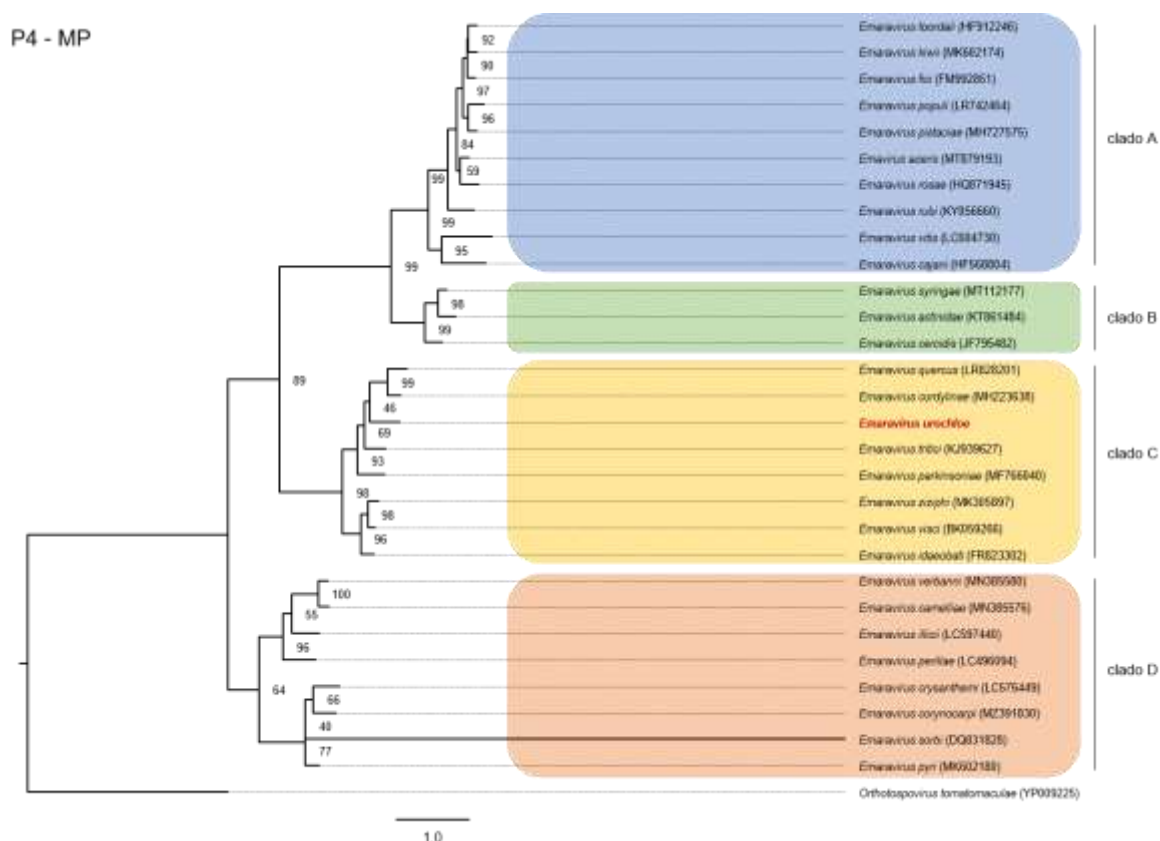


Figura .8. Análises filogenéticas de RNA1 (P1-RdRp), RNA2 (P2-GPP) , RNA3 (P3-N) e RNA4 (P4-MP). A nova espécie viral para qual foi sugerido o nome *Emaravirus urochloe* está destacada pela cor vermelho. Os emaravírus agrupam-se em quatro clados. As sequências de aa de RdRp, GPP, N, e MP emaravirais foram alinhadas usando clustal W pelo software MEGA 7.0, e as árvores filogenéticas foram inferidas pelo IQ-TREE (www.iqtree.org) usando a metodologia de Máxima -Verossimilhança com bootstrap de mil repetições. Os números de acesso utilizados para a análise são apresentados no Apêndice B. *Orthotospovirus tomatomaculae* foi usado como *outgroup*.

A filogenia de RNA3 indicou relação entre a proteína P3-N de *E. urochloe* e P3- N de *E. vitis*, *E. sorbi*, *E. actinidiae*, *E. syringae*, e *E. cercidis*. O *E. vitis*, recentemente descrito por Nabeshima & Abe (2021), compartilha os quatro segmentos principais do gênero, sendo que a proteína P3, do N , exibiu 44,1 % de identidade com a P3-N de *E. fici*. Além disso, apresenta um RNA5 adicional, o qual mostrou 25,3% de identidade com a proteína P6 do *E. pistaciae*, cuja função ainda não foi estimada. *E. sorbi* não apresenta segmentos adicionais e compartilha apenas os quatro segmentos típicos. Sua proteína P3-N mostra semelhança com a P3-N de *E. cajani* e *E. tritici* (Mileke & Muhelbach, 2007). *E. actinidiae* e *E. syringae* possuem cinco segmentos de RNA, sendo o último, um segmento adicional. A proteína P3-N desses vírus apresentam uma identidade significativa de 55,6% e 63,6% com a P3-N de *E. cercidis* (Zheng *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020; Di Bello *et al.*, 2016). Já a filogenia performada para RNA4 (P4- MP) evidenciou a maior proximidade entre *E. parkinsoniae*, *E. tritici*, *E. urochloe*, *E. cordylinae*, e *E. quercus*. Todos os vírus citados possuem cinco segmentos de RNA, quatro

principais e um adicional, e proteínas P4-MP com níveis de identidade de 50-60% com *Emaravirus tritici* (Olmedo-Velarde *et al.*, 2019; Ilyas *et al.*, 2018; Rehanek *et al.*, 2021).

Os segmentos RNA1 (P1-RdRp), RNA2 (P2-GPP), e RNA4 (P4-MP) de *Emaravirus urochloe* agruparam-se no clado C, sempre juntos à *E. idaeobati*, *E. visci*, *E. ziziphi*, *E. cordylinae*, *E. quercus*, *E. parkinsoniae* e *E. tritici*. Já RNA3 (P3-N) agrupou-se junto à *E. cercidis*, *E. syringae*, *E. actinidae*, *E. sorbi*, e *E. vitis*, integrantes do clado B para este segmento genômico. Processos tais quais mutações e pseudorecombinação podem auxiliar a elucidar a divergência genética observada em RNA3 (P3-N) de *E. urochloe* quando comparado ao RNA1(P1-RdRp), RNA2 (P2-GPP) e RNA4 (P4-MP). ORNA genômico, caracterizado por uma elevada taxa de mutação, resulta em isolados virais compostos por populações mutantes, cuja sequência de consenso se adapta às pressões seletivas. Esse fenômeno contribui para a plasticidade genética dos vírus de RNA, influenciando sua capacidade de evoluir rapidamente em resposta a pressões seletivas, como a resposta imunológica do hospedeiro ou mudanças ambientais.

P5 - VSR

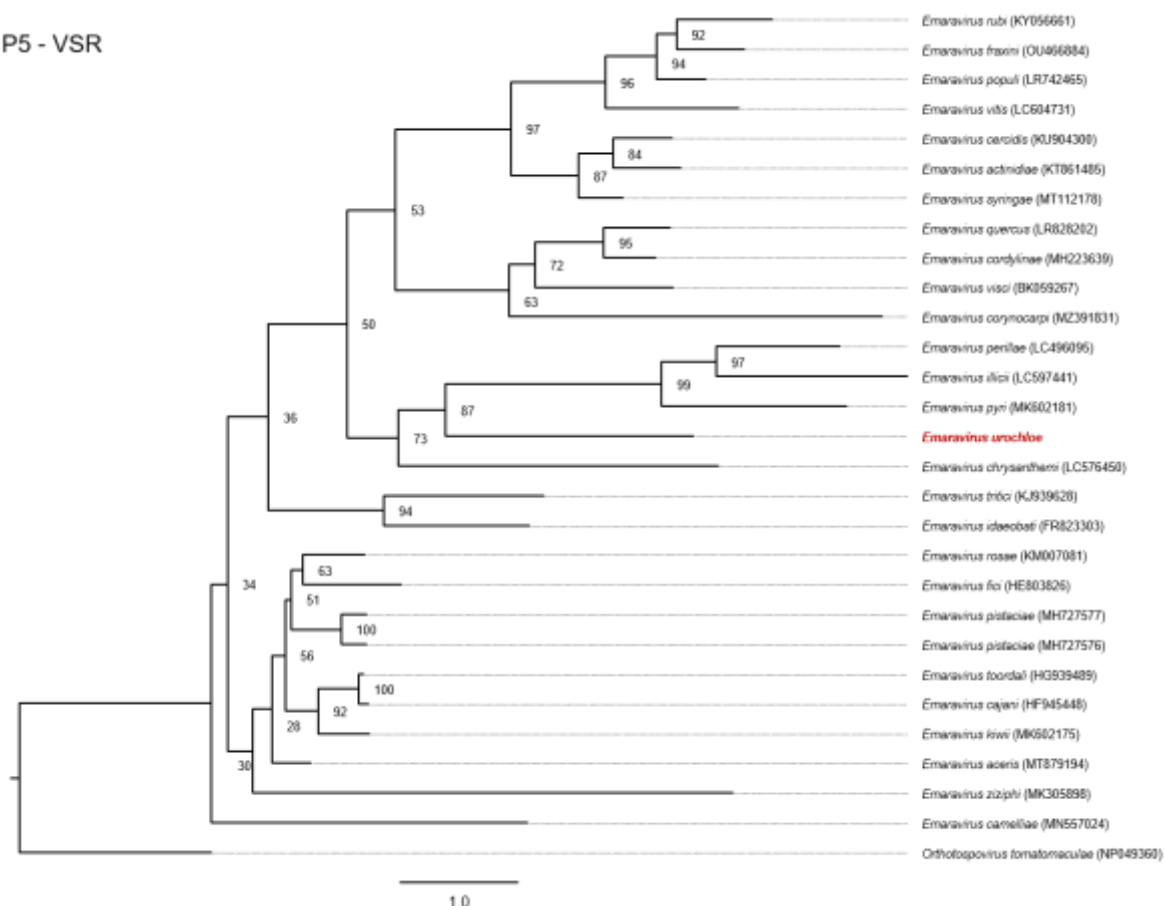


Figura 9. Análise filogenética de RNA5 (P5-VSR) de espécies de *Emaravirus* que possuem este segmento. As sequências foram alinhadas usando clustal W pelo software MEGA 7.0, e as árvores filogenéticas foram inferidas pelo IQ-TREE (www.iqtree.org) usando a metodologia de Máxima Verossimilhança com bootstrap de mil repetições. Os números de acesso utilizados para a análise são apresentados no Apêndice B. RNA5 de *Orthotospovirus tomatomaculæ* foi usado como *outgroup*.

Proteínas codificadas por segmentos adicionais do genoma não podem ser organizadas em clados, pois a grande maioria ainda não foi caracterizada. As análises filogenéticas realizadas entre o RNA5 de *E. urochloe*, que codifica uma proteína P5 putativa para (VSR), e os demais emaravírus os quais também possuem o segmento RNA5 em seu genoma, indicou que a P5 do novo vírus está mais relacionada aos segmentos correspondentes de *E. perillae*, *E. illici*, *E. pyri*, e *E. chrysanthemi*, cujas funções ainda não foram elucidadas (Kubota *et al.*, 2022; Shimomoto *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2020; Kubota *et al.*, 2021). A possibilidade da proteína P5 do novo *E. urochloe* estar relacionada a outros segmentos adicionais, que não P5, do genoma das demais espécies do gênero, não pode ser descartada, pois os segmentos podem estar constantemente sujeitos à recombinação, e ainda não foram observados padrões comparativos entre os segmentos adicionais.

7. CONCLUSÃO

O sequenciamento de alto rendimento foi performedo a partir de amostras de forrageiras de uso agrônômico no Brasil manifestando sintomas típicos de infecção viral. Por meio da análise dos dados gerados foi possível a detecção de uma nova espécie viral infectando um híbrido comercial entre *Urochloa ruziziensis*, *U. decumbens* e *U. brizantha*. A nova espécie foi enquadrada dentro do gênero *Emaravirus* e à mesma foi sugerido o nome *Emaravirus urochloe*. O novo vírus possui 5 segmentos de RNA fita simples senso negativo 1 a 5 que codificam, em sequência, RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), precursor da glicoproteína (GPP), proteína do nucleocapsídeo (N), proteína de movimento (MP) e uma proteína P5 supressora de silenciamento gênico putativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL RWAHNIH, M., ROWHANI, A., WESTRICK, N., STEVENS, K., DIAZ-LARA, A., TROUILLAS, F. P., GOLINO, D. Discovery of viroses and virus-like pathogens in pistachio using high-throughput sequencing. **Plant Disease**, v. 102, p. 1419-1425, 2018.

ALCANTARA, P.B. Origem das braquiárias e suas características morfológicas de interesse forrageiro. Encontro sobre capins do gênero *Brachiaria*. **Anais Instituto de Zootecnia**. Nova Odessa, p. 1-18, 1987.

ALEMANDRI, V., MATTIO, M. F., RODRIGUEZ, S. M., TRUOL, G. Geographical distribution and first molecular detection of an Emaravirus, High Plains wheat mosaic virus, in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, v.149, p. 743-750, 2017.

ALFIERI, S. A. J. Fig Mosaic. **Plant Pathology**, v 64, p 1-2, 1967. Disponível em: <https://www.fda.gov/content/download/11071/file/pp64.pdf> (acessado em 25 de dezembro de 2023)

ALLINGTON, W.B., STAPLES, R., VIEHMEYER, G. TRANSMISSION OF Rose Rosette by the Eriophyid Mite, *Phyllocoptes fructiphilus*. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1137–1140, 1968.

ALVIM, M. J., BOTREL, M. A., XAVIER, D. F. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no país. Comunicado Técnico. 22. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. ISSN 1678-3131. Juiz de Fora, MG, Dezembro, 2022.

ARAGÃO, A., CONTINI, E. O agro no Brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020. **Secretaria de Inteligência e Relações Estratégicas da Embrapa** (SIRE- Embrapa) 37-39p, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf/41e20155-5cd9-f4ad-7119-945e147396cb>

ARGEL, M., PEDRO, J., MILES, J. W., GUIOT GARCÍA, J. D., CUADRADO CAPELLA, H., LASCANO, C. E. Cultivar mulato II (*Brachiaria* híbrido CIAT 36087): Gramínea de alta qualidade e produção forrageira, resistentes as cigarrinhas e adaptada a solos tropicais ácidos. **CIAT**. P. 22, 2007.

AMRINE, J.W., HINDAL, D. F., STASNY, T. A., WILLIAMS, R. L., COFFMAN, C.C. Transmission of the rose rosette disease agente to *Rosa multiflora* by *Phyllocoptes fructiphylus* (Acari: Eriophyidae). **Entomological News**, v.99 , p. 239–252, 1988.

BARBA, M., CZOSNEK, H., HADIDI, A. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. **Viruses**, v. 6, p. 106 136, 2014. BARZON, L., LAVEZZO, E., COSTANZI, G., FRANCHIN, E., TOPPO, S., PALÙ, G.

Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, p. 346-350, 2013.

BUSHNELL, B. **BBMap: a fast, accurate, splice-aware aligner**. Lawrence Berkeley

National Lab.(LBNL), Berkeley, CA (United States), 2014.

BUZKAN, N., CHIUMENTI, M., MASSART, S., SARPKAYA, K. KARADAG, S., MINAFRA, A. A new emaravirus discovered in Pistacia from Turkey. **Virus research**, v.263, p. 159-163, 2019.

CHOUDHURY, M. M., ROSENKRANZ, E. Vector relationship of Graminella nigrifronsto Maize chlorotic dwarf virus. **Phytopathology**, v. 73, n. 5, p. 685-690, 1983.

DAIGLE, D., SIMEN, B. B., POCHART, P. High-throughput sequencing of PCRproducts tagged with universal primers using 454 life sciences systems. **Current protocols in molecular biology**, v. 96, n. 1, p. 7.5. 1-7.5. 14, 2011.

DEBAT, H., ZAVALLO, D., BRISBANE, R. S., VONCINA, D., ALMEIDA, R. P., BLOUIN, A. G., ASURMENDI, S. Grapevine virus L: a novel vitivirus in grapevine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 319-328, 2019.

DI BELLO, P. L., LANEY, A. G., DRUCIAREK, T., HO, T., GERGERICH, R. C., KELLER, K. E., MARTIN, R. R., TZANETAKIS, I. E. A novel emaravirus is associatedwith redbud yellow ringspot disease. **Virus research**, v. 22, p. 41-47, 2016

DI BELLO, P. L., TZANETAKIS, I. E. The evolution of emaraviruses is becoming more complex: Seven segments identified in the causal agent of Rose Rosette Disease. **Virus Res**, v. 210, p. 241–244, 2015.

DIAS-FILHO, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Documentos 402. **Embrapa**. Maio, 2014.

DIAZ-LARA, A., STEVENS, K., AGUILAR-MOLINA, V. H., FERNÁNDEZ- CORTÉS, J. M., CHABACANO-LÉON, V. M., AL RWAHNIH, M. High- throughput sequencing of grapevine in Mexico reveals a high incidence of viruses including a new member of the genus *Enamovirus*. **Viruses**, v. 15, p. 1561.

EBRAHIM-NESBAT, F., IZADPANA, K. Viruslike Particles Associated with Ringfleck Mosaic of Mountain Ash and a Mosaic Disease of Raspberry in the Bavarian Forest. **Eur. J. For. Pathol.**, v. 22, p. 1–10, 1992.

ELBAINO, T., DIGIARO, M., MIELKE-EHRET, N., MUEHLBACH, H. P., MARTELLI, G. P. ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile:Fimoviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 11, p. 1478-1479, 2018.

FERRAZ, J. B. S., FELÍCIO, P. E. D. Production systems - an example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

FERREIRA, R. C. U., MORAES, A. D. C. L., CHIARI, L., SIMEÃO, R. M., VIGNA, B. B. Z., SOUZA, A. P. An overview of the genetics and genomics of the Urochloa speciesmost commonly used in pastures. **Frontiers in Plant Science**, 12, 770461, 2021.

FLICEK, P., BIRNEY, E. (2009). Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. **Nature methods**, v. 6, n. Suppl 11, p. S6-S12, 2009.

FLOCK, R.A., WALLACE, J.M. Transmission of Fig Mosaic by the Eriophyid Mite Aceria

ficus. **Phytopathology**, v. 45, p. 52–54, 1995.

FOX, A., FOWKES, A. R., SKELTON, A., HARJU, V., BUXTON-KIRK, A., KELLY, M., ADAMS, I. P. Using high-throughput sequencing in support of a plant health outbreak reveals novel viroses in *Ullucus tuberosus*. **Plant Pathology**, v. 68, p. 576-587, 2019.

FRAGOSO, K. N. D. S. Estudos biológicos e moleculares dos patossistemas Johnsongrass mosaic virus (JGMV) e Maize chlorotic dwarf virus (MCDV) em gramíneas forrageiras. **Tese de doutorado**. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2019.

FUHLING, M., BUTTNER, C. Transmission Experiments of Viruses to Woody Seedlings (*Quercus Robur* and *Sorbus Aucuparia*) by Grafting and Mechanical Inoculation. **Eur. J. For. Path.** v. 25, p.129–135, 1995.

GHISI, O.M.A.A. Brachiaria na pecuária brasileira: importância e perspectivas. In: **Encontro para discussão sobre capins do gênero Brachiaria**, v 2., Nova Odessa. Anais... Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1991. 356p, 1991.

GORDON, S.C., TAYLOR, C.E. Some Aspects of the Biology of the Raspberry Leaf and Bud Mite (*Phyllocoptes* (Eriophyes) *Gracilis* Nal.) *Eriophyidae* in Scotland. **J. Hortic. Sci.**, v. 51, p. 501–508, 1976.

GOUGH, K. H., SHUKLA, D. D. Nucleotide sequence of Johnsongrass mosaic Potyvirus genomic RNA. **Intervirology**, v. 36, p.181-192, 1993.

GRISEBACH, A. “Brachiaria,” in Flora Rossica. ed. C. F. Ledebour (Stuttgart: Sumtibus Librariae E. Schweizerbart), 1853.

HASIÓW-JAROSZEWSKA, B., BOEZEN, D., ZWART, M. P. Metagenomic studies of viruses in weeds and wild plants: a powerful approach to characterize variable virus communities. **Viruses**, v. 13, p. 1939, 2021.

ILYAS, M., AVELAR, S., SCHUCH, U. K., BROWN, J. K. First report of an emaravirus associated with witches’ broom disease and eriophyid mite infestations of the blue palo verde tree in Arizona. **Plant disease**, v. 102, 1863-1863p., 2018.

JANK, L., BARRIOS, S. C., DO VALLE, C. B., SIMEÃO, R. M., ALVES, G. F. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop Pasture Science**. v.65, p.1132–1137, 2014.

KALLINEN, A. K., LINDBERG, I. L., TUGUME, A. K., VALKONEN, J. P. T. Detection, Distribution, and Genetic Variability of European Mountain Ash Ringspot-Associated Virus. **Phytopathology**, v. 99, p.344–352, 2009.

KATSIANI, A., STANTON, D., LAMOUR, K., TZANETAKIS, I. E. The population structure of Rose rosette virus nos EUA. **J. Gen. Virol.** 2020 .

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequencedata. **Bioinformatics**, v. 28 , p.1647-1649, 2012.

- KEGLER, H. Das Ringfleckenmosaik Der Eberesche (*Sorbus Aucuparia* L.). *J. Phytopathology*, v. 37, p. 214–216, 1960.
- KORMELINK, R., VERCHOT, J., TAO, X., DESBIEZ, C. The Bunyavirales: The plant-infecting counterparts. *Viruses*, v.13, 842, 2021.
- KUBOTA, K., USUGI, T., TOMITAKA, Y., SHIMOMOTO, Y., TAKEUCHI, S., KADONO, F., YANAGISAWA, H., CHIAKI, Y., TSUDA, S. Perilla mosaic virus is a highly divergent *Emaravirus* transmitted by *Shevtchenkella* sp. (Acari: Eriophyidae). *Phytopathology*, v.110, p.1352–1361, 2020.
- KUBOTA, K., YANAGISAWA, H., CHIAKI, Y., YAMASAKI, J., HORIKAWA, H., TSUNEKAWA, K., MORITA, Y., KADONO, F. Complete nucleotide sequence of chrysanthemum mosaic-associated virus, a novel emaravirus infecting chrysanthemum. *Archives of Virology*, v.166, p.1241-1245, 2021.
- KULKARNI, N. K., KUMAR, P. L., MUNIYAPPA, V., JONES, A. T., REDDY, D. V. R. Transmission of pigeon pea sterility mosaic virus by the eriophyid mite, *Aceria cajani*. *Plant Disease*, v. 86, p. 1297-1302, 2002.
- KUMAR, P. L., JONES, A. T., REDDY, D. V. R. A novel mite-transmitted virus with a divided RNA genome closely associated with pigeonpea sterility mosaic disease. *Phytopathology*, v. 93, p. 71-81, 2003.
- KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- KUMAR, S., SUBBAAO, B. L., HALLAN, V. Molecular characterization of emaraviruses associated with pigeonpea sterility mosaic disease. *Scientific Reports*, v. 7, p. 11831, 2017.
- LANDAU, E. C.; RESENDE, R. M. S.; MATOS NETO, F. da C. Evolução da área ocupada por pastagens. In: LANDAU, E. C.; SILVA, G. A. da; MOURA, L.; HIRSCH, A.; GUIMARAES, D. P. (Ed.). Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas: produtos de origem animal e da silvicultura. Brasília, DF: Embrapa, 2020. v.3, cap.46, p.1555-1578, 2020. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1122718>.
- LANEY, A.G., KELLER, K.E., MARTIN, R.R., TZANETAKIS, I.E. A Discovery 70 Years in the Making: Characterization of the Rose Rosette Virus. *J. Gen. Virol.*, v. 92, p.1727–1732, 2011.
- LAPOINTE, S. L., MILES, J. W. Germplasm case study: *Brachiaria* species. In: Hardy, Bill (ed.). Pastures for the tropical lowlands: CIAT's contribution. Cali: **Centro Internacional de Agricultura Tropical**, p. 43-55, 1992.
- LI, D., LIU, C. M., LUO, R., SADAKANE, K., LAM, T. W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, v. 31, n. 10, p. 1674-1676, 2015.
- LIU, L., LI, Y., LI, S., HU, N., HE, Y., PONG, R., LAW, M. Comparison of next-

generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

LIU, H., WANG, G., YANG, Z., WANG, Y., ZHANG, Z., LI, L., QI, L. Identification and characterization of a pear chlorotic leaf spot-associated virus, a novel emaravirus associated with a severe disease of pear trees in China. **Plant Disease**, v.104, p. 2786- 2798, 2020.

MAPBiomias. Pastagens brasileiras ocupam área equivalente a todo o estado do Amazonas. 2020. Disponível em: <https://mapbiomas.org/pastagens-brasileiras-ocupam-areaequivalente-a-todo-o-estado-do-amazonas>

MARCHI, C. E., FERNANDES, C. D., VERZIGNASSI, J. R. Doenças em plantas forrageiras. **Embrapa**. Documento 187. Campo Grande, MS., 2011.

MIELKE, N., MUHLBACH, H. A novel multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). **Journal of General Virology**, v.88, p. 1337-1346, 2007.

MIELKE-EHRET, N., MUHLBACH, H. Emaravirus: A new genus of multipartite negative-sense RNA plant viruses. **Virus**, v. 4 , p. 515–1536, 2012

MIELKE-EHRET, N., THOMA, J., SCHLATERMUND, N., MUHLBACH, H.P. Detection of European Mountain Ash Ringspot-Associated Virus-Specific RNA and Protein P3 in the Pear Leaf Blister Mite *Phytoptus pyri* (Eriophyidae). **Arch. Virol.**, v.155, p. 987–991, 2010.

MODI, A., VAI, S., CARAMELLI, D., LARI, M. The Illumina sequencing protocol and the NovaSeq 6000 system. In: Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols. **Springer**.US, New York., p. 5-42, 2021.

NABESHIMA, T., ABE, J. High-throughput sequencing indicates novel varicosavirus, emaravirus, and deltapartivirus infections in vitis coignetiae. **Viruses**, v.13, p. 827, 2021.

NICOLINI, C., INOUE-NAGAT, A.K., NAGATA, T. Complete genome sequence of a proposed new tymovirus, tomato blistering mosaic virus. **Arch Virol**. v.160, p.609–612, 2015. NUNES, S. G., BOOCK, A., PENTEADO, M. D. O., GOMES, D. T. Brachiaria brizantha cv. Marandu. Embrapa Gado de Corte. Campo Grande, MS., 1984.

OLMEDO-VELARDE, A., PARK, A. C., SUGANO, J., UCHIDA, J. Y., KAWATE, M., BORTH, W. B., HU, J. S., MELZER, M. J. Characterization of ti ringspot-associated virus, a novel emaravirus associated with an emerging ringspot disease of *Cordyline fruticose*. **Plant disease**, v. 103, p. 2345-2352, 2019.

OLSCHEWSKI, S., CUSACK, S., ROSENTHAL, M. The cap-snatching mechanism of bunyaviruses. **Trends in microbiology**, v.28, p.293-303, 2020.

PARSONS, J.J. Spread of African grasses to the American tropics. **Journal of Range Management**, v. 25, n.1, p. 12-17, 1972.

PATIL, B.L., DANGWAL, M., MISHRA, R. Variability of emaravirus species associated with sterility mosaic disease of pigeonpea in India provides evidence of segment reassortment. **Viruses**, v. 9 , 183p., 2017.

PATRICK, K. L. Genomics and Proteomics Issue: 454 Life Sciences: Illuminating the future of genome sequencing and personalized medicine. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 80, n. 4, p. 191, 2007.

PÉREZ-LOSADA, M., ARENAS, M., GALÁN, J. C., BRACHO, M. A., HILLUNG, J., GARCÍA-GONZÁLES, N., GONZÁLES-CANDELAS, F. High-throughput sequencing (HTS) for the analysis of viral populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v.80, p.104-208, 2020.

PROESELER, G. Transmission of Fig Mosaic Virus by the Gall Mite *Aceria ficus* (Cotte). Zentralblatt für Bakteriologie. **Parasitenkunde Infekt. Hyg.**, v.123, p.288–292, 1969.

QUAIL, M. A., KOZAREWA, I., SMITH, F., SCALLY, A., STEPHENS, P. J., DURBIN, R., TURNER, D. J. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. **Nature methods**, v.5, p.1005-1010, 2008.

REDDY, M.V., NENE, Y.L. Estimation of yield loss in pigeonpea due to sterility mosaic. In: Proceedings of International workshop on pigeonpeas. Ind. **Phytopathology**, v. 33 , p.61–63, 1980.

REHANEK, M., VON BARGEN, S., BANDTE, M., KARLIN, D. G., BUTTNER, C. A novel emaravirus comprising five RNA segments is associated with ringspot disease in oak. **Archives of Virology**, v.166, p. 987-990, 2021.

REHANEK, M., KARLIN, D. G., BANDTE, M., AL KUBRUSLI, R., NOURINEJHAD Z. S., CANDRESSE, T., VON BARGEN, S. The complex world of emaraviruses Challenges, insights, and prospects. **Forests**, v.13, p.1868, 2022.

RENVOIZE, S. A., CLAYTON, W. D., KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*, eds J. Miles and B. Maass, and do Valle, C. B. **Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT**; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Cali: Brasília, p.1–15, 1996.

RIBEIRO, T. B., DE LIMA, W. M., RIBEIRO, G. M., BUSO, W. H. D. Características forrageiras de algumas gramíneas do gênero *Brachiaria*. **Nutri. Time** v.13, p.4773–4780, 2016.

ROBERTS, R., ROBERTSE, N., THOMPSON, G. D., READ, D. A. Characterization of macadamia ringspot-associated virus, a novel Orthotospovirus associated with *Macadamia intergrifolia* in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1- 11, 2024.

RUMBOU, A., CANDRESSE, T., BUTTNER, C. Next-generation sequencing reveals a novel emaravirus in diseased maple trees from a German urban forest. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p.621179, 2021.

SALARIATO, D. L., ZULOAGA, F. O., GIUSSANI, L. M., MORRONE, O. Molecular phylogeny of the subtribe Melinidinae (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) and evolutionary trends in the homogenization of inflorescences. **Mol. Phylogenet. Evol.** V.56, p.355–369, 2010.

- SANCHES, M. M., FERNANDES, C. D., RESENDE, R. O., NAGATA, T., TORRES, F. Z. V., & VERZIGNASSI, J. R. Doenças causadas por vírus em forrageiras tropicais. Comunicado Técnico 169. Embrapa. Brasília-DF. Setembro, 2023.
- SCHADT, E. E., TURNER, S., KASARSKIS, A. A window into third-generation sequencing. Human molecular genetics. **Human molecular genetics**, v. 19, p. 227-240, 2010.
- SEIFERS, D.L., HARVEY, T.L., MARTIN, T.J., JENSEN, S.G. Identification of the Wheat Curl Mite as the Vector of the High Plains Virus of Corn and Wheat. **Plant Disease**, v. 81, p.1161–1166, 1997.
- SERRÃO, E. A de S., SIMÃO N. M. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Everard. Belém: **IPEAN**, p. 31, 1971.
- SETH, M. L. Transmission of pigeon pea sterility by an eriophyid mite. **Indian Phytopathology**, v. 15, p. 225-227, 1962.
- SILVA, K. N., NICOLINI, C., SILVA, M. S., FERNANDES, C. D., NAGATA, T., RESENDE, R. O. First Report Of Johnsongrass Mosaic Virus (JGMV) Infecting *Pennisetum purpureum* In Brazil. July, **Plant Disease**, v. 97, n. 7, p.1003, 2013.
- SHIMOMOTO, Y., OKADA, T., IKEDA, K., TATARA, A., HASEGAWA, Y., YANAGISAWA, H., TAKEYAMA, S., HAYASHI, K., YANO, K., MORITA, Y., KUBOTA, K. (2022). Japanese star anise ringspot-associated virus is a distinct emaravirus transmitted by the eriophyid mite (the family *Diptilomiopidae*). **Journal of General Plant Pathology**, p.1-12, 2022.
- STEVENS, P.F. Onwards. Angiosperm phylogeny website, 2001. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- TATINENI, S., MCMECHAN, A.J., WOSULA, E.N., WEGULO, S.N., GRAYBOSCH, R.A., FRENCH, R. An eriophyid mite-transmitted plant virus contains eight genomic RNA segments with unusual heterogeneity in the nucleocapsid protein. **Journal of Virology**, v.88, p.11834–11845, 2014.
- TORRES GONZÁLEZ, A. M., Morton, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Mol. Phylogenet. Evol.** v.37, p.36–44, 2005.
- TRINIUS, C.B. De Graminibus Paniceis: Dissertatio Botanica Altera. Impensis Academiae Imperialis Scientiarum, St. Petersburg., 1826.
- VAN DIJK E.L., AUGER, H., JASZCZYSZYN, Y., THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in genetics**, v. 30, n. 9, p. 418-426, 2014.
- VERCHOT, J., HERATH, V., URRUTIA, C.D., GAYRAL, M., LYLE, K., SHIRES, M.K., ONG, K., BYRNE, D. Development of a Reverse Genetic System for Studying Rose Rosette Virus in Whole Plants. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.33, 1209–1221p., 2020.
- VERZIGNASSI, J. R., FERNANDES, C. D. Doenças em forrageiras. Gado de Corte divulga. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**, v. 50, 2001.

VILLAMOR, D. E. V., MEKURIA, T. A., PILLAI, S. S., EASTWELL, K. C. High-throughput sequencing identifies novel viruses in nectarine: Insights to the etiology of stem-pitting disease. **Phytopathology**, v. 106, p. 519-527, 2016.

VON BARGEN, S., AL KUBRUSLI, R., GASKIN, T., FURL, S., HUTTNER, F., BLYSTAD, D. R., KARLIN, D. G., JALKANEN, R., BUTTNER, C. Characterisation of a novel *Emaravirus* identified in mosaic-diseased Eurasian aspen (*Populus tremula*). **Annals of Applied Biology**, v. 176, p. 210-222, 2020.

VON BARGEN, S., DIECKMANN, H. L., CANDRESSE, T., MUHLBACH, H. P., ROBACH, J., BUTTNER, C. Determination of the complete genome sequence of European mountain ash ringspot-associated emaravirus from *Sorbus intermedia* reveals two additional genome segments. **Archives of virology**, v.164, p.1937-1941, 2019.

WALIA, J. J., WILLEMSSEN, A., ELICI, E., CAGLAYAN, K., FALK, B. W., RUBIO, L. Genetic variation and possible mechanisms driving the evolution of worldwide fig mosaicvirus isolates. **Phytopathology**, v. 104, p. 108-114, 2014.

WANG, Y., SONG, Y., CAO, M., CHENG, Q., WU, J., HU, T. Identification of a novel emaravirus infecting lilac through next-generation sequencing. **Integrative Agriculture**, v. 19, p. 2064-2071, 2020.

ZAMFIR, A. D., BABALOLA, B. M., FRAILE, A., MCLEISH, M. J., GARCÍA-ARENAL, F. Tobamoviruses show broad host ranges and little genetic diversity among four habitat types of a heterogeneous ecosystem. **Phytopathology**, v. 113, p. 1697-1707, 2023.

ZHANG, J., CHIODINI, R., BADR, A., ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of genetics and genomics**, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011.

ZHENG, Y., NAVARRO, B., WANG, G., WANG, Y. X., YANG, Z., XU, W., ZHU, C., WANG, L., SI SÉRIO, F., HONG, N. Actinidia chlorotic ringspot-associated virus: a novel emaravirus infecting kiwifruit plants. **Molecular plant pathology**, v. 18, p. 569- 581, 2017.

APÊNDICE A: Lista de primers utilizados no trabalho

Primers	Região	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)
Emara1_NC_838_Senso Emara1_NC_1455_CompViral	Nucleocapsídeo detecção Emaravirus	5'AGCCATCATCACCCCTTACAAG3' 5'GCCTTTGATGTTGAGAAGTG3'	617
MRFV_BR_For MRFV_BR_Rev	Detecção Marafivirus	5'TTTTCGGGCTCCTGGAAAGCTT3' 5'GGCGATGTTGTARTCGGTGTT3'	409
SCMV_BR_For SCMV_BR_Rev	Detecção Potyvirus	5'AAACCAGCATACTCTGARATAATACC3' 5'CGCCTAAATCTACGCTTTTCTCAC3'	1.073
JGMV_BR_For JGMV_BR_Rev	Detecção Potyvirus	5'TTCTACTAGAAATATGCCATTGACAAA3' 5' TACTGAATTGTATGTGGATTGGAGT 3'	518
MSMV_2094_For MSMV_2540_Rev	Detecção Mastrevirus	5'CCTAGAGGTGGCAGAAGACATG 3' 5'ATGTCTCACACAAGCTTCCGTT 3'	446
MYMV_Polero_BR_For MYMV_Polero_BR_Rev	Detecção Polerivirus	5'CAATCGCGAGAGTTYGTGCA 3' 5'GGAGATACCAGCCACTTGTACAG3'	684
E1Rep_5RACE_1 E1Rep_5RACE_2 E1Rep_5RACE_3	5' RACE RdRp	5'TTTCAAGACTGCTAAAGGGTGA3' 5'GCAAATCAGATATTACACAGGGTT3' 5'TGGCACCATACTCACAAGTG3'	-
E1Rep_41_For E1Rep_2477_Rev	RdRp	5'CTTAGTTTTTCTAAACTCTCGCC3' 5'TTACAAGTGTTAACACACCCA3'	2.436
E1Rep_2328_For E1Rep_4835_Rev	RdRp	5'CCTACGTGCATATTTATGAGCTG3' 5'AGGAATGCATGGATGTACAGA3'	2.507
E1Rep_4673_For E1Rep_6905_Rev	RdRp	5'CATGTATTATTTCTTAGGGTGC3' 5'ATGTTTCAAATGTACAGACATGA3'	2.232
E1Rep_6670_3RACE_For	3' RACE RdRp	5'ATAAGTTCTTTTTCCCATTTCTCTCC3'	-
E1G_5RACE_1_911 E1G_5RACE_2_726 E1G_5RACE_3_623	5' RACE Glicoproteína	5'GGTTGTTATAATTGCCAGTATGGA3' 5'CAACTCTTTCAGTAGCAGTTATGAC3' 5'GATCTAATGTATCATCTGGAGTCAGA3'	-
E1Gly_406_For E1Gly_2479_Rev	Glicoproteína	5'ATCATTCAATTATCTGGATCATGTTTC3' 5'GGTCACAATCATACGATATAGCAA3'	2.073
E1G_3RACE_2246_For	3' RACE Glicoproteína	5'CATTATTACAAGTGGTATAGTCA3'	-
E1NC_5RACE_1 E1NC_5RACE_2 E1NC_5RACE_3	5' RACE Nucleocapsídeo	5'ACCAGGGCATGAGTTTCTATAT3' 5'TAAGGGTGATGATGGCTGTT3' 5'ATCAACCCTACATGTAAAGAAGCT3'	-
E1NC_577_For E1NC_1677_Rev	Nucleocapsídeo	5'CTAAACATTTGACTGATGACTGC3' 5'CCAGGGGATAATCTTGTGAGAGA3'	1.100
E1NC_3RACE_1537_For	3' RACE Nucleocapsídeo	5'GCTGTTCTCACCTCTACCTT3'	-
E1MP_5RACE_1 E1MP_5RACE_2 E1MP_5RACE_3	5' RACE Proteína de movimento	5'CCTGAACCTCTTAGGTAAATCTGAC3' 5'GTAGATCAACAGAATGTCATTGGG3' 5'CTTGCCAAAGGTGAAGGAATTG3'	-
E1MP_175_For E1MP_1245_Rev	Proteína de movimento	5'CTAATTGAACATCCTATATTGGACC3'	1.070
E1MP_3RACE_1093_For	3' RACE Proteína de movimento	5'TTCTGGCTGCATGTTGTCAT3'	-
E1VSR_5RACE_1 E1VSR_5RACE_2 E1VSR_5RACE_3	5' RACE Supressor de silenciamento	5'TTTACAATTTTGGTGTGTTGATGG3' 5'CTAATAAGGTACAGGAGTGGCC3' 5'ATGGATAAATGGTAATGTTGTTGG3'	-
E1VSR_238_For E1VSR_1438_Rev	Supressor de silenciamento	5'CCGACTTAGGACTATCAATCAGA3' 5'CATTGAATACGGATTAGCAACTG3'	1.200

E1VSR_3RACE_1220_for	3' RACE Supressor de silenciamento	5'ACCTCCCTGATAAAGCTCAAATC3'	-
----------------------	--	-----------------------------	---

APÊNDICE B: Espécies do gênero *Emaravirus* relatadas até o momento

Espécie	Nome do vírus	Acesso
<i>Emaravirus aceris</i>	Maple mottle-associated virus	RNA1: MT879190; RNA2: MT879191; RNA3: MT879192; RNA4: MT879193; RNA5: MT879194; RNA6: MT879195
<i>Emaravirus actinidiae</i>	Actinidia chlorotic ringspot-associated virus	RNA1: KT861481; RNA2: KT861482; RNA3: KT861483; RNA4: KT861484; RNA5: KT861485
<i>Emaravirus cajani</i>	Pigeonpea sterility mosaic virus 1	RNA1: HF568801; RNA2: HF568802; RNA3: HF568803; RNA4: HF568804; RNA5: HF945448
<i>Emaravirus camelliae</i>	Camellia japonica- associated virus 1	RNA1: MN385573; RNA2: MN385574; RNA3: MN385575; RNA4: MN385576; RNA5: MN557024; RNA6: MN557025; RNA7: MN557026; RNA8: MN557027; RNA9: MN557028
<i>Emaravirus cercidis</i>	Redbud yellow ringspot- associated virus	RNA1: JF795479; RNA2: JF795480; RNA3: JF795481; RNA4: JF795482; RNA5: KU904300
<i>Emaravirus chrysanthemi</i>	Chrysanthemum mosaic- associated virus	RNA1: LC576445; RNA2: LC576446; RNA3a: LC576447; RNA3b: LC576448; RNA4: LC576449; RNA5: LC576450; RNA6: LC576451
<i>Emaravirus cordylinae</i>	Ti ringspot-associated virus	RNA1: MH223635; RNA2: MH223636; RNA3: MH223637; RNA4: MH223638; RNA5: MH223639
<i>Emaravirus corynocarpi</i>	Karaka Ōkahu purepure emaravirus	RNA1: MZ391827; RNA2: MZ391828; RNA3: MZ391829; RNA4: MZ391830; RNA5: MZ391831
<i>Emaravirus fici</i>	Fig mosaic virus	RNA1: AM941711; RNA2: FM864225; RNA3: FM991954; RNA4: FM992851; RNA5: HE803826; RNA6: HE803827
<i>Emaravirus fraxini</i>	Ash shoestring-associated virus	RNA1: OU466880; RNA2: OU466881; RNA3: OU466882; RNA4: OU468883; RNA5: OU466884
<i>Emaravirus idaeobati</i>	Raspberry leaf blotch virus	RNA1: FR823299; RNA2: FR823300; RNA3: FR823301;

		RNA4: FR823302; RNA5: FR823303; RNA6: KP970121; RNA7: KP970122; RNA8: KP970123
<i>Emaravirus illicii</i>	Japanese star anise ringspot-associated virus	RNA1: LC597437; RNA2: LC597438; RNA3: LC597439; RNA4: LC597440; RNA5: LC597441
<i>Emaravirus kiwii</i>	Actinidia virus 2	RNA1: MK602171; RNA2: MK602172; RNA3: MK602173; RNA4: MK602174; RNA5: MK602175; RNA6: MK602176
<i>Emaravirus parkinsoniae</i>	Palo verde broom virus	RNA1: MF766025; RNA2: MF766030; RNA3: MF766035; RNA4: MF766040
<i>Emaravirus perillae</i>	Perilla mosaic virus	RNA1: LC496090; RNA2: LC496091; RNA3a: LC496092; RNA3b: LC496093; RNA4: LC496094; RNA5: LC496095; RNA6a: LC496096; RNA6b: LC496097; RNA6c: LC496098; RNA7: LC496099
<i>Emaravirus pistaciae</i>	Pistacia virus B	RNA1: MH727572; RNA2: MH727573; RNA3: MH727574; RNA4: MH727575; RNA5a: MH727576; RNA5b: MH727577; RNA6: MH727578; RNA7: MH727579
<i>Emaravirus populi</i>	Aspen mosaic-associated virus	RNA1: LR742461; RNA2: LR742462; RNA3: LR742463; RNA4: LR742464; RNA5: LR742465
<i>Emaravirus pyri</i>	Pear chlorotic leaf spot-associated virus	RNA1: MK602177; RNA2: MK602178; RNA3: MK602179; RNA4: MK602180; RNA5: MK602181
<i>Emaravirus quercus</i>	Common oak ringspot-associated virus	RNA1: LR828198; RNA2: LR828199; RNA3: LR828200; RNA4: LR828201; RNA5: LR828202
<i>Emaravirus rosae</i>	Rose rosette virus	RNA1: HQ871942; RNA2: HQ871943; RNA3: HQ871944; RNA4: HQ871945; RNA5: KM007081; RNA6: KM007082; RNA7: KM007083
<i>Emaravirus rubi</i>	Blackberry leaf mottle-associated virus	RNA1: KY056657; RNA2: KY056658; RNA3: KY056659; RNA4: KY056660; RNA5: KY056661

<i>Emaravirus sorbi</i>	European mountain ash ringspot-associated virus	RNA1: AY563040; RNA2: AY563041; RNA3: DQ831831; RNA4: DQ831828
<i>Emaravirus syringae</i>	Lilac chlorotic ringspot- associated virus	RNA1: MT112174; RNA2: MT112175; RNA3: MT112176; RNA4: MT112177; RNA5: MT112178
<i>Emaravirus toordali</i>	Pigeonpea sterility mosaic virus 2	RNA1: HF912243; RNA2: HF912244; RNA3: HF912245; RNA4: HF912246; RNA5: HG939489; RNA6: HG939490
<i>Emaravirus tritici</i>	High Plains wheat mosaic virus	RNA1: KJ939623; RNA2: KJ939624; RNA3: KJ939626; RNA4: KJ939627; RNA5: KJ939628; RNA6: KJ939629; RNA7: KJ939630; RNA8: KJ939631
<i>Emaravirus verbanni</i>	Camellia japonica- associated virus 2	RNA1: MN385577; RNA2: MN385578; RNA3: MN385579; RNA4: MN385580
<i>Emaravirus visci</i>	Arceuthobium sichuanense-associated virus 1	RNA1: BK059263; RNA2: BK059264; RNA3: BK059265; RNA4: BK059266; RNA5: BK059267
<i>Emaravirus vitis</i>	Vitis emaravirus	RNA1: LC604727; RNA2: LC604728; RNA3: LC604729; RNA4: LC604730; RNA5: LC604731
<i>Emaravirus ziziphi</i>	Jujube yellow mottle- associated virus	RNA1: MK305894; RNA2: MK305895; RNA3: MK305896; RNA4: MK305897; RNA5: MK305898; RNA6: MK305899