

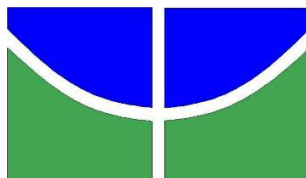
Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Análise do Viroma em espécies arbóreas

Flávia Milene Barros dos Santos

Prof^a Orientadora: Rita de Cássia Pereira Carvalho

Brasília, março/2016.



Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas

Instituto de Ciências Biológicas - IB

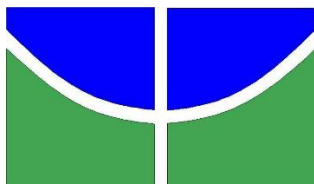
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Flávia Milene Barros dos Santos

Prof^a Orientadora: Rita de Cássia Pereira Carvalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Brasília, Março/2016.



Análise do Viroma em espécies arbóreas

Flávia Milene Barros dos Santos

Dissertação aprovada em 17 de março de 2016 por:

Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho - Orientadora

Dra. Mirtes Freitas Lima - Embrapa Hortaliças

Dr. Fernando Lucas Melo - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Tatsuya Nagata - Universidade de Brasília

Brasília, Março/ 2016.

Dedico ao meu marido Flávio
e a minha mãe Ruth por todo amor,
apoio e confiança nessa jornada!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por me dar a oportunidade de ter uma família abençoada e digna de amor e compaixão.

A minha amada mãe que desde o primeiro dia de vida me amou incondicionalmente. Ao meu marido por estar comigo nos momentos mais difíceis e felizes da minha vida, por me dar ombro nas horas de choro e acima de tudo por estar sempre lá quando precisei.

Agradeço aos irmãos, cunhadas, tios, tias, primos e primas em especial a minha tia Cema e primos Marcinha, Tito, Lêda e Gustavo pelo apoio constante e por fazerem parte da minha vida a quem Deus me deu de presente. Em especial ao meu voinho (meu eterno marido), que está com Deus, por sempre cuidar de mim e me ensinar a ter coragem nas horas difíceis.

Gratidão as minhas eternas amigas Rafaelle, Chenia e Vanessa, apesar da distância, por estarem sempre comigo e pelas conversas e apoio em orações.

Agradeço especialmente, a minha orientadora e amiga principalmente, Profa. Rita de Cássia pelo apoio, incentivo e paciência durante esses dois anos e por acreditar no meu potencial científico.

As minhas manas Geise, Catharine, Caroline e Erica por todos esses anos de companherismo, carinho, saídas, risadas, bebidas e noites de club da Luluzinha. Obrigada! Amo vocês de todo meu coração!

As minhas novas manas e mano que me ajudaram na reta final Josiane, Luciane, Karina e Felipe.

Aos meus amigos de graduação Diego, Jorge e Maira, saudade dos nossos cafezinhos entre as aulas, da nossa amizade e dos bons tempos.

A Luciana Medeiros, por sempre me atender com simpatia e dedicação em ajudar todos os alunos, e pelas adoráveis conversas nos corredores.

Aos funcionários da Estação Experimental de Biologia (Fábio, Evandro, Olinda, Ângelo e Denilson) pelos adoráveis cafezinhos e horas de descontração entre os serviços.

Ao Dr. Fernando Lucas Melo, por estar sempre disposto a me ajudar e pela paciência acima de tudo.

A todos os meus amigos que me apoiaram Camila Braga, Niquele, Cida, Pedro e Nicholas.

A Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) e seu funcionário Silomar.

A Embrapa Hortaliças especialmente a Dra. Mirtes Freitas Lima e ao funcionário Lúcio Flávio.

A pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Simone Ribeiro e suas alunas Natália e Rafaela.

A todos que fazem parte do laboratório de Virologia Molecular da UnB e a Rosana Blawid.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília e a CAPES pelo apoio financeiro.

Sumário	
Introdução geral.....	3
Hipótese do trabalho	5
Objetivos.....	5
Capítulo 1	6
Referencial teórico.....	6
1. As florestas no mundo e importância econômica	6
2. Florestas brasileiras	7
3. Biomas brasileiros	8
4. Vírus em espécies arbóreas no mundo e Brasil.....	12
5. Metagenômica	20
Referências Bibliográficas	24
Capítulo 2	40
Viroma de espécies arbóreas.....	40
RESUMO.....	40
Abstract.....	41
1. Metagenômica e vírus.	42
2. Material e Métodos	46
2.1 Origem das espécies arbóreas	46
2.2 Enriquecimento de partículas virais	51
2.3 Sequenciamento e análise de dados	52
2.4 Extração de RNA das plantas coletadas no viveiro II da NOVACAP (Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil)	54

2.5 Análise molecular da sequência proveniente do sequenciamento de alto rendimento.....	55
2.5.1 Detecção de Hovenia dulcis associated virus - HDAV por RT - PCR.....	56
2.6 Clonagem do fragmento originado da RT- PCR com <i>primers</i> para Hovenia dulcis associated virus - HDAV cuja sequência foi obtida por NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>) 56	
2.7 Extração de DNA das amostras arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP).....	57
2.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das amostras provenientes da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP)	58
2.9 Análise filogenética da sequência de Hovenia dulcis associated virus - HDAV proveniente do NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>).....	59
3. Resultados e Discussão	61
3.1 Análise das sequências provenientes do sequenciamento de alto desempenho.	61
3.2 Novo membro da ordem <i>Picornavirales</i> : Hovenia dulcis associated virus - HDAV detectado pela análise metagenômica em espécies arbóreas no Distrito Federal	63
3.3 Detecção de Hovenia dulcis associated virus (HDAV) nas espécies arbóreas coletadas no viveiro II Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP)	68
3.4 Confirmação da clonagem do amplicón proveniente da RT- PCR de Hovenia dulcis associated virus em pGEM-T Easy.....	69
3.5 RCA (<i>Rolling Circle Amplification</i>) e PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) para testes de detecção de espécies virais de DNA.	70
CONCLUSÕES GERAIS	71
Referências Bibliográficas	72

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Distribuição da cobertura florestal mundial.....	7
Figura 2. Biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa).....	9
Figura 3. Esquema de sequenciamento da plataforma 454	21
Figura 4. Ilustração de sequenciamento utilizando a plataforma Illumina	22
Figura 5. Plataforma de sequenciamento SOLiD	23

Capítulo 2

Figura 1. Vírus detectados/caracterizados por meio de metagenômica.....	44
Figura 2. A-F: Espécies arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP).....	49
Figura 3. A-I: Espécies arbóreas coletadas em viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP).....	50
Figura 4. A-F: Espécies arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP).....	51
Figura 5. Gel da extração de RNA das amostras coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP)	55
Figura 6. Esquema do vetor plasmidial pGEM-T Easy vector.....	57
Figura 7. Organização genômica membros da ordem <i>Picornavirales</i>	65
Figura 8. Organização genômica de Hovenia dulcis associated virus (HDAV).....	66
Figura 9. Ávore filogenética, gerada entre os membros da ordem <i>Picornavirales</i> e a espécie Hovenia dulcis associated virus (HDAV).....	67
Figura 10. A-B. Resultado da RT- PCR para HDAV.....	69
Figura 11. A-B. Confirmação do clone pGeM-T Easy- HDAV 803.....	69
Figura 12. Alinhamento dos fragmentos oriundos do sequenciamento Sanger com a sequência do HDAV proveniente do NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>).....	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Área de florestas plantadas no Brasil.	8
Tabela 2. Áreas territoriais de cada bioma brasileiro.....	10
Tabela 3. Espécies de vírus relatadas em espécies arbóreas no Brasil e no mundo	14

Capítulo 2

Tabela 1. Lista de espécies arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP).....	47
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> sintetizados para a detecção de espécies virais obtidas a partir de NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>)	53
Tabela 3. Sequências dos genomas de alguns representantes da ordem <i>Picornavirales</i>	60
Tabela 4. Vírus detectados pela análise metagenômica.....	62

Santos, Flávia Milene Barros dos. **Análise do Viroma em espécies arbóreas**. Mestrado acadêmico em Biologia Microbiana do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, defendido dia 17 de março de 2016, sob orientação da Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho.

Resumo

Em todo o mundo, as florestas são responsáveis por ocupar cerca de 4 bilhões de hectares. O Brasil apresenta a segunda maior floresta do mundo, com cerca de 54,4% do seu território nacional sendo constituído por florestas naturais e plantadas, distribuídas em seis biomas. As espécies florestais/arbóreas são de grande importância econômica para o país, pois a partir dos produtos obtidos direta ou indiretamente podem favorecer o sustento da população. Além disso, espécies arbóreas podem servir de habitat para diversos microorganismos, entre eles os vírus. Os estudos de vírus infectando espécies arbóreas no Brasil ainda são escassos, devido a algumas dificuldades para detecção e caracterização desse grupo de patógenos devido às suas características peculiares. Com isso o principal objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar espécies virais em espécies arbóreas nativas de diversos biomas encontrados no Brasil. Recentemente novas ferramentas como a metagenômica e plataformas de sequenciamento em alta escala têm propiciado ampliar o conhecimento da diversidade de organismos em diferentes ambientes. Nesse contexto, 60 mudas sintomáticas de espécies arbóreas distribuídas em 27 espécies botânicas e classificadas em 14 famílias, foram coletadas em ambiente de viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP). As amostras analisadas, em *pool*, tiveram o RNA extraído (protocolo Trizol) após procedimento de semi-purificação visando enriquecimento de partículas virais. Após este procedimento uma amostra composta foi formada e enviada para sequenciamento na Universidade Católica de Brasília (UCB) por meio da tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*), com o uso da plataforma Illumina Miseq. Os resultados obtidos a partir da análise genômica produziram 2.162 contigs que foram comparados com resultados do banco de dados no programa BLASTX (Basic Local Alignment Search Tool). A partir do sequenciamento foi obtido um genoma com 9.529 nucleotídeos (nt). Após várias análises verificou-se que o espécime em estudo relaciona-se filogeneticamente com membros da ordem *Picornavirales*, ao qual denominamos aqui de *Hovenia dulcis* associated virus (HDAV) *Primers* específicos para este genoma foram sintetizados e por meio de RT-PCR foi possível realizar a detecção viral em uma amostra de uva do Pará (*Hovenia dulcis*). Ainda com base no resultado de NGS, sequências de outras seis espécies virais foram obtidas e encontram-se listadas a seguir: *Cowpea mild mottle virus* - CPMMV (gênero *Carlavirus* e família *Betaflexiviridae*), *Eupatorium vein clearing virus* e *Strawberry vein banding virus* - SVBV (gênero *Caulimovirus* e família *Caulimoviridae*), *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (gênero *Comovirus* e família *Secoviridae*), *Broad bean wilt virus* - BBWV e *Mikania micrantha mosaic virus* - MMMV (gênero *Fabavirus* família *Secoviridae*).

Palavras chave: NGS, árvores, vírus, metagenômica.

Abstract

Worldwide, forests are responsible for occupying about 4 billion hectares. Brazil shows the second largest forest in the world, with about 54, 4% of its territory consisting of natural and planted forests, distributed in six biomes. The forest species are of great economic importance to the country, producing many products, directly or indirectly, that can help the sustenance of the population. Furthermore, tree species can harbor some microorganisms such as viruses. Studies about infecting-tree-specie viruses in Brazil are still scarce due to some difficulties for detection and characterization of this pathogen group because it shows peculiar characteristics. Thus, the main objective of this study was to identify and characterize viral species occurring in native tree species from six biomes found in Brazil. Recently new tools such as metagenomics and large-scale sequencing platforms have led to increase knowledge about the diversity of organisms in

different environments. In this context, 60 symptomatic seedlings of tree species, distributed in 27 botanical species and classified into 14 families, were collected in Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) nursery environment. The samples were analyzed in pool and had their RNA extracted by a Trizol protocol after semi-purification procedure in order to enrich viral particles. After this procedure, a compose sample was formed and sent for sequencing at Universidade Católica de Brasília (UCB) by NGS (Next Generation Sequencing) technology using the Illumina platform Miseq. The results from the genomic analysis produced 2,162 contigs, which were compared with database results BLASTX (Basic Local Alignment Search Tool) program. From the sequencing was obtained with a genome 9529 nucleotides (nt) was initially identified as *Hovenia dulcis* associated virus (HDAV). Specific primers were designed and synthesized for viral detection in plants used in this study. By RT-PCR it was possible to viral detection in a sample of grape Para (*Hovenia dulcis*). Due to the low percentage of identity of viral species with species *Dicistroviridae* genus and the difference in host of the virus, it is proposed a new member of *Picornavirales* order to house this species detected. Phylogenetic analysis of the fields (PRO) and dependent RNA polymerase RNA polymerase (POL) put this virus on a branch near the *Picornaviridae* family). Also based on the result of NGS sequences of other viral species were obtained and are listed below: *Cowpea mild mottle virus* - CPMMV (genus *Carlavirus* and family *Betaflexiviridae*), *Eupatorium vein clearing virus* (genus *Caulimovirus* and family *Caulimoviridae*), *Strawberry vein banding virus* - SVBV (genus *Caulimovirus* and family *Caulimoviridae*), *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (genus *Comovirus* and family *Secoviridae*), *Broad bean wilt virus* - BBWV (genus *Fabavirus* and family *Secoviridae*) and *Mikania micrantha mosaic virus* - MMMV (genus *Fabavirus* and family *Secoviridae*).

Keywords: NGS, trees, viruses, metagenomics.

Introdução geral

As florestas são importantes no âmbito social, econômico e ambiental para a humanidade, pois fornecem matéria prima para a subsistência da população oferecendo produtos florestais madeireiros (PFMs) e produtos florestais não madeireiros (PFNM), além de servirem de habitat para diversos seres vivos, ajudam ainda na prevenção de solos, rios e nascentes e funcionam como fonte de energia renovável, além serem as responsáveis por reduzirem a quantidade de gases poluentes na atmosfera (SFB, 2014; IBÁ, 2015).

As florestas mundiais representam um alto valor econômico devido as contribuições advindas de produtos e serviços. Dentre os produtos derivados das florestas, a madeira é o principal produto do setor florestal sendo o responsável por 91% da produção para fins industriais do país (IBÁ, 2015).

O Brasil é detentor da segunda maior cobertura vegetal mundial e suas florestas ocupam 54,4% de todo o território nacional. Dessa cobertura aproximadamente 53,5 % é constituída de florestas nativas e 0,8 % de florestas plantadas (SFB, 2013).

Cerca de 90% das florestas estão localizadas na região Norte do país, e cerca de 1,5 % das espécies florestais são de espécies plantadas localizadas na região Sul do país, sendo caracterizada pela produção de pinheiros (*Pinus spp.*) e eucaliptos (*Eucalyptus spp.*). Segundo a Associação Brasileira de produtores de florestas plantadas ABRAF (2005), uma floresta plantada é caracterizada pela produção de apenas uma espécie florestal que foi introduzida numa determinada região para fins de produtos comercializados.

As espécies arbóreas estão sujeitas a diversas pragas tais como formigas e lagartas que são responsáveis por diversos danos. Dentre os patógenos, destacam-se os fungos, principalmente oídios e ferrugens, sendo estes os principais causadores de perdas em espécies arbóreas no país (ALFENAS et al., 2004), entretanto representantes de outros grupos de patógenos também podem acometer espécies arbóreas.

Para alguns grupos como nematóides e vírus, os estudos no Brasil, ainda são incipientes, entretanto Lin et al. (1979) detectaram *Cassia mild mosaic virus* - CMMV (gênero *Carlavirus*) em árvores de *Cassia macranthera*. Anos mais tarde, Gama et al. (1983) relataram uma espécie do gênero *Carlavirus* em mudas de seringueira proveniente de ambientes de viveiro. Na mesma década, Junqueira et al. (1985) visualizaram partículas alongadas e flexuosas (possivelmente do gênero *Potexvirus*) em amostra de seringueira (*Hevea brasiliensis*).

Essas espécies arbóreas, em ambiente de florestas nativas e/ou cultivadas e até mesmo utilizadas em áreas de urbanização, podem funcionar como fonte de inóculo de espécies virais que infectam espécies cultivadas. Desta forma, é de extrema importância que estudos sejam

realizados para se obter informações da diversidade viral nestes ambientes para futuramente fornecerem subsídios em manejo e controle, uma vez que as informações existentes são ainda, incipientes e escassas.

A falta de informação sobre a ocorrência de espécies virais em espécies arbóreas pode ser atribuída em parte, às características inerentes aos vírus, como tamanho diminuto e ausência de variação morfológica de partícula, que dificultam a caracterização por meio de técnicas clássicas usadas na virologia.

Dentre os métodos comumente utilizados para diagnose de vírus em plantas destacam-se os testes biológicos como a observação de partículas em Microscopia Eletrônica, teste de gama de hospedeiras, sorológicos como o teste ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), e moleculares como hibridização de ácidos nucleicos e PCR.

Recentemente novas tecnologias juntamente com diferentes protocolos de enriquecimento de partículas virais vêm sendo usados para detecção e estudo de diversidade de organismos em diferentes ambientes (NG et al., 2011).

A tecnologia de sequenciamento de alto desempenho juntamente com a bioinformática tem contribuído em um intervalo de tempo pequeno para a detecção de espécies virais em diferentes ambientes. Diversas espécies de vírus e viróides já foram detectadas desta maneira (BARBA et al., 2014).

No Distrito Federal (DF) existe um importante viveiro conhecido como Viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) e que localiza-se no Parque Nacional Água Mineral, criado em 1956. Esse viveiro é responsável pela produção de mudas de árvores e palmeiras nativas de vários biomas brasileiros (principalmente do Bioma Cerrado). Estima-se que a produção de mudas por ano, seja de aproximadamente 300 mil unidades. Essas mudas são utilizadas para a recuperação de áreas degradadas e arborização do DF e Entorno.

Muitas destas espécies apresentam ainda em condições de viveiro sintomas similares àqueles apresentados por plantas que estão infectadas com alguma espécie viral.

Neste contexto, diante da problemática existente e acima mencionada, juntamente com a falta de informações de vírus que ocorrem em espécies arbóreas, o presente trabalho teve como principal objetivo fornecer informações sobre a ocorrência de vírus em espécies arbóreas provenientes do viveiro II da NOVACAP por meio de sequenciamento de alto rendimento - metagenômica.

Hipótese do trabalho

A seguinte hipótese é postulada para este trabalho: existe uma grande diversidade de vírus, ainda desconhecidos para a ciência, ocorrendo em espécies arbóreas de sistemas naturais. Devido à interface entre os diferentes sistemas (naturais e de cultivo) pode existir uma transição destas espécies virais favorecendo possíveis recombinações virais que podem originar espécies novas que podem vir a causar perdas no futuro tanto para as espécies arbóreas como para as espécies cultivadas. Espera-se conhecer a diversidade de espécies virais ocorrendo em espécies arbóreas.

Objetivos

Objetivo Geral

- O objetivo do presente trabalho é detectar e caracterizar vírus ocorrendo em espécies arbóreas provenientes do viveiro II da NOVACAP (Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil) por meio de metagenômica.

Objetivo Específicos

- Identificar espécies de vírus por meio do sequenciamento de alto desempenho ocorrendo em espécies arbóreas que vem sendo cultivadas em ambiente de viveiro II da NOVACAP.
- Analisar filogeneticamente a espécie denominada *Hovenia dulcis associated virus* (HDAV).
- Detectar em pelo menos uma espécie botânica a espécie denominada *Hovenia dulcis associated virus* (HDAV).
- Desenhar e sintetizar *primers* específicos para as seis espécies virais detectadas *Cowpea mild mottle virus* - CPMMV (gênero *Carlavirus* e família *Betaflexiviridae*), *Eupatorium vein clearing virus* e *Strawberry vein banding virus* - SVBV (gênero *Caulimovirus* e família *Caulimoviridae*), *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (gênero *Comovirus* e família *Secoviridae*), *Broad bean wilt virus* - BBWV e *Mikania micrantha mosaic virus* - MMMV (gênero *Fabavirus* família *Secoviridae*).

Referencial teórico

1. As florestas no mundo e importância econômica

As florestas naturais juntas ocupam aproximadamente 4 bilhões de hectares (ha) o que equivale a 30% da superfície de cobertura vegetal global como ilustrado na **Figura 1** (FAO, 2010).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2010) a Rússia aparece em primeiro lugar no ranking em cobertura vegetal com 22% (792 milhões de hectares), seguido do Brasil com 12% (512 milhões de ha), o Canadá com 9% (301 milhões de ha), os Estados Unidos com 8% (279 milhões de ha) e a China com 4% (130 milhões de ha). Em se tratando de áreas florestais plantadas a China aparece em primeiro lugar com 29% (77 milhões de ha), em seguida estão os Estados Unidos com 10% (25 milhões de ha), Rússia com 6% (17 milhões de ha), Japão juntamente com a Índia 4% (10 milhões de ha) e o Brasil aparece em quinto lugar com 3% (7 milhões de ha).

As florestas desempenham papel fundamental para a população, pois cerca de 20% da população mundial (aproximadamente 1,5 bilhão de pessoas) dependem direta e indiretamente dos produtos florestais para a sua sobrevivência (CHAO, 2012), além do setor florestal movimentar por ano em torno de 600 bilhões dólares para o PIB mundial fornecendo aproximadamente 50 milhões de empregos para a população mundial (FAO, 2015).

As florestas são importantes para o âmbito social e ambiental, pois muitos de seus produtos advêm do uso dos recursos florestais. A economia de vários países está ligada diretamente aos produtos advindos da madeira (produtos florestais madeireiros - PFMs), sendo bastante utilizadas na construção civil, na produção de lenha e carvão vegetal e indiretamente por meio de produtos florestais não madeireiros (PFNMs), como por exemplo, óleos essenciais, frutos, resinas e taninos muito utilizados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e química. Além disso, a utilização das espécies utilizadas na arborização pode aumentar a qualidade de vida da população, já que as espécies arbóreas são responsáveis por diminuir a concentração do CO₂ atmosférico.

Segundo a FAO (2010) florestas são áreas que compreendem mais de meio hectare, com árvores acima de 5 metros de altura. Este conceito não engloba áreas de cultivo ou urbanas. Neste contexto uma área florestal é composta por diversas espécies arbóreas.

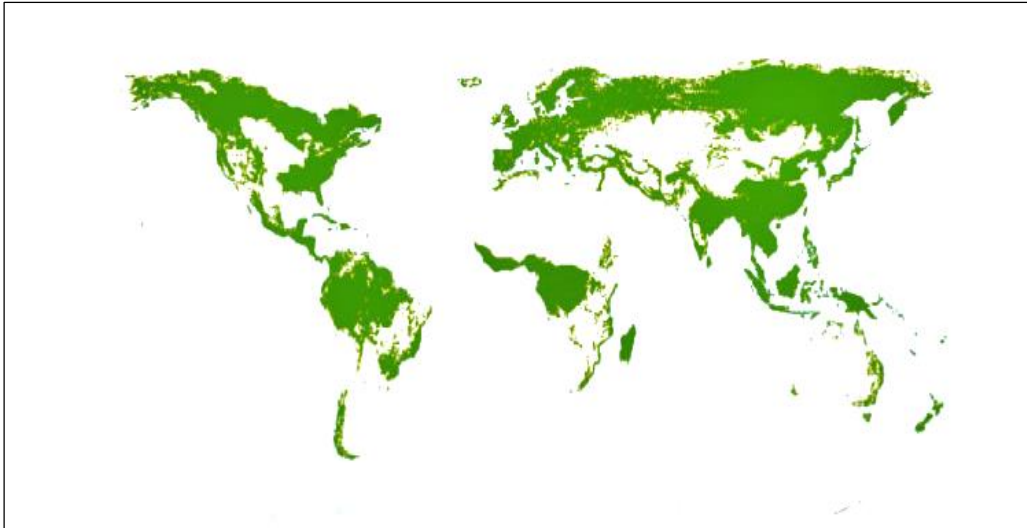


Figura 1. Distribuição da cobertura florestal mundial (em verde). **Fonte:** FAO, 2010.

2. Florestas brasileiras

O Brasil é detentor da segunda área de floresta mundial (sendo ocupada por mais de 463 milhões de ha). Cerca de 54% do território nacional brasileiro é constituído por florestas naturais e plantadas (ABRAF, 2013), ficando atrás apenas da Rússia que possui aproximadamente 809 milhões de hectares.

As florestas plantadas correspondem a mais de 7 milhões de hectares, o que equivale a 0,84% do território nacional e são responsáveis por mais de 90% de contribuições federais (IBÁ, 2015). No âmbito florestal o país movimentou mais de 10 bilhões de dólares ao ano, sendo o responsável por gerar empregos de forma direta e indireta a 4,5 milhões de pessoas. Atualmente o setor representa 4,5 % do PIB nacional (EMBRAPA, 2014).

Das áreas de florestas plantadas cerca de 1,3% do território nacional são de espécies dos gêneros *Eucalyptus* com aproximadamente 5,1 milhões de ha e *Pinus* com mais de 1,5 milhões de ha (SFB, 2013). Juntas elas somam mais de 92% de área plantada e ainda cerca de 556 milhões de ha são plantadas com outras espécies arbóreas classificadas nos gêneros: *Acacia*, *Hevea*, *Tectona*, *Araucaria* e *Populos* (ABRAF, 2013; IBÁ, 2014; IBGE, 2015) como mostra a **Tabela 1**.

A maior parte da madeira produzida no Brasil é originária das espécies plantadas e são destinadas principalmente para as indústrias de papel e celulose (ABRAF, 2010).

Tabela 1. Área de florestas plantadas no Brasil, representada pelas espécies arbóreas (nome comum e científico), área territorial em hectare (ha) e o valor aproximado em porcentagem referente ao valor de cada área no território nacional. Extraído de: ABRAF 2013.

Espécies arbóreas	Nome científico	Extensão territorial (ha)	%
Eucalipto	<i>Eucalyptus</i> spp	5.102.030	71,00
Pinus	<i>Pinus</i> spp	1.562.782	21,75
Acácia	<i>Acacia mearnsii</i> / <i>Acacia mangium</i>	148.311	2,12
Seringueira	<i>Hevea brasiliensis</i>	168.848	2,36
Paricá	<i>Schizolobium amazonicum</i>	87.901	1,22
Teca	<i>Tectona grandis</i>	67.329	0,97
Araucária	<i>Araucaria angustifolia</i>	11.343	0,16
Pópulus	<i>Populus</i> spp	4.216	0,06
Outras		33.183	0,12
Total		7.185.943	100,00

3. Biomas brasileiros

As florestas brasileiras estão divididas em seis biomas, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal como mostra a **Figura 2**. De acordo com o IBGE (2004) bioma é um conjunto de ecossistemas relacionados com condições climáticas e vegetação semelhantes.

O bioma Amazônia é considerado um dos biomas mais importantes do Brasil por apresentar uma vasta diversidade biológica com aproximadamente 45.000 espécies entre animais e vegetais. A sua extensão territorial abrange uma área com aproximadamente 4,2 milhões de km² (**Tabela 2**) (IBGE, 2009) presente nos estados do Acre (AC), Amapá (AP), Amazonas (AM), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR), Maranhão (MA), Tocantins (TO) e Mato Grosso (MT). Além disso, ocupa áreas territoriais como a Bolívia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Peru, Colômbia, Venezuela e Equador.

O bioma Amazônia é constituído pela maior rede de água doce do planeta (MMA, 2007), além de ser o maior responsável em fornecer PFMs e PFNMs. São representantes desse bioma várias espécies como: cedro (*Cedrela fissilis*.), paricá (*Schizolobium amazonicum*.), castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) e mamica-de-porca (*Zanthoxylum rhoifolium*). Além dessas, destaca-se a espécie faveira de bolota ou visgueiro (*Parkia pendula*), muito utilizada na arborização de ruas, praças parques e avenidas devido à sua inflorescência e o mogno (*Swietenia macrophylla*) cuja árvore é bastante explorada por sua madeira ser muito apreciada na produção de móveis, devido a sua durabilidade e resistência (TUCCI; LIMA; 2009), além de ser utilizada na produção de instrumentos musicais como guitarras e violões.



Figura 2. Biomas brasileiros (Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa). **Fonte:** IBGE (2004).

Outro importante bioma para o país, o bioma Cerrado, apresenta uma área equivalente a mais de 2.036.448 Km² (IBGE, 2009) (**Tabela 2**) distribuída entre os estados de Goiás (GO), TO, MA, parte dos estados da Bahia (BA), Ceará (CE), MA, MT, Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Piauí (PI), RO e São Paulo (SP), podendo ainda, ocorrer em áreas isoladas nos estados do AP, AM, PA e RR (SANO; ALMEIDA, 1998).

Tabela 2. Áreas territoriais de cada bioma brasileiro com valor em porcentagem referente ao valor de cada área no território nacional. **Fonte:** (IBGE, 2009; MMA, 2012).

Bioma	Área aproximada (km²)	% Brasil
Amazônia	4.196.943	49,29
Cerrado	2.036.448	23,92
Mata Atlântica	1.110.182	13,04
Caatinga	844.453	9,92
Pampa	176.496	2,1
Pantanal	150.355	1,8
Total	8.514.877	100

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma do Brasil apresentando uma vasta biodiversidade entre animais e plantas, sendo que 44% da vegetação encontrada neste bioma corresponde a espécies endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005). O Cerrado, devido a sua alta diversidade biológica juntamente com a Mata Atlântica são considerados *hotspots* mundiais.

A vegetação encontrada neste bioma exibe uma importância ambiental e econômica para o Brasil, pois estas espécies arbóreas são muito utilizadas na arborização, paisagismo e ainda proporcionam o bem estar da população (PIVETTA, 2002). Muitas plantas podem também fornecer matéria prima para a subsistência da população e para a extração de produtos de importância comercial. Entre as diversas espécies encontradas nesse bioma cita-se: eritrina (*Erythrina mulungu*), jacarandá (*Dalbergia miscolobium*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), angico farinha seca (*Albizia hasslerii*), garapa (*Apuleia leiocarpa*), pau pereira (*Platycomus regnelli*), ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*), ipê amarelo (*Handroanthus serratifolius*), bolsa de pastor (*Zeyheria tuberculosa*), saboneteira (*Sapindus saponaria*), jequitibá rosa (*Cariniana estrellensis*), Gonçalo Alves (*Astronium fraxinifolium*), guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*), pau santo (*Kielmeyera variabilis*), mutamba (*Guazuma ulmifolia*) e embaúba prateada (*Cecropia hololeuca*).

No Brasil diversos produtos podem ser extraídos e comercializados a partir de várias espécies encontradas no bioma Cerrado como o eucalipto cuja madeira é utilizada para a produção de papeis, enquanto os óleos essenciais destinam-se as indústrias cosmética, farmacêutica e de limpeza (MORA; GARCIA, 2000). Já a casca e a raiz da espécie conhecida como saboneteira (*Sapindus saponaria*) podem ser utilizadas na indústria farmacêutica como calmante, adstringente e diurético. Os frutos dessa espécie possuem uma substância, denominada saponina (propriedade de detergente) que é muito utilizada na lavagem de roupas (VIKBAL; BEN, 2006). Além disso, a saboneteira vem se destacando como inseticida natural no controle de diversas pragas como o caso do ácaro *Tetranychus urticae* (VICENTINI et al., 2014).

A Mata Atlântica apresenta uma área de aproximadamente 1, 1 milhão de Km² (**Tabela 2**) e situa - se nas montanhas e planícies costeiras, indo desde o Rio Grande do Norte (RN) até o Rio Grande do Sul (RS). A Mata Atlântica é um dos biomas mais devastados pela exploração humana, tendo sido explorada desde a chegada dos portugueses no Brasil. Atualmente sua área foi reduzida em cerca de 22% da sua vegetação original, restando apenas 7% da sua cobertura vegetal (IBGE, 2016). Este bioma contém uma grande diversidade de espécies botânicas, dentre elas cita-se: pau Brasil (*Caesalpinia echinata*), pau ferro (*Caesalpinia ferrea*), pau sangue (*Pterocarpus violaceus*), guatambu (*Aspidosperma parvifolium*) e quaresmeira (*Tibouchina granulosa*) que são amplamente utilizadas na arborização.

O quarto bioma a ser abordado aqui, a Caatinga, encontra-se amplamente distribuído em todo o Nordeste brasileiro. A sua vegetação predominante é representada por arbustos e florestas secas (LEAL; SILVA; LANCHER JR, 2005). No entanto, fatores como o desmatamento, queimadas e substituição das áreas naturais por áreas cultivadas tem proporcionado a diminuição da área ocupada por esse bioma. Como representante desse bioma encontram-se várias espécies, dentre elas podem ser citadas: sete cascas (*Samanea tubulosa*) e amburana (*Amburana cearenses*) no qual suas sementes e cascas são muito utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades tais como gripes e derrames (ROSSI, 2008).

O Pampa está localizado principalmente no Rio Grande do Sul onde ocupa cerca de 63% territorial do estado, podendo também ser encontrado na Argentina e Uruguai (BOLDRINI et al., 2010) ocupando cerca de 2 % (**Tabela 2**) do território brasileiro.

A vegetação típica desse bioma é composta por espécies de gramíneas, herbáceas e algumas árvores. Atualmente com o uso das monoculturas de trigo (*Triticum spp*) e soja (*Glycine max*) (VERDUM, 2006) juntamente com a criação intensificada de gado ao longo dos anos na região tem colaborado para a diminuição territorial do Pampa.

Nesse bioma, a uva do Pará - *Hovenia dulcis* é largamente cultivada no sul do país e possui propriedades adstringentes. É também muito utilizada para o paisagismo urbano, além

de poder ser utilizada na recuperação de áreas degradadas por ser uma espécie que atrai diversos animais da fauna (KOPACHON, 1996).

O sexto bioma, o Pantanal, é constituído de uma área territorial com mais de 150 km² (**Tabela 2**) (IBGE, 2009), sendo encontrado nos estados do MS e MT. Este bioma apresenta alta biodiversidade terrestre e fauna aquática, fato explicado pela região apresentar uma vasta planície inundável. Em áreas onde o solo não retém água sua vegetação se assemelha a Caatinga, com cactos, árvores conhecidas como barrigudas e gravatás.

Muitas espécies arbóreas/florestais estão propensas ao ataque de diversos insetos tais como formigas (ordem Hymenoptera), besouros (ordem Coleoptera) (ZANUNCIO, 2005), cupins (ordem Isoptera) (COSTA-LEONARDO, 2002) e lagartas (ordem Lepidoptera) (PEREIRA, 2007). Além desses, as espécies arbóreas podem ser hospedeiras de diversos microorganismos (BAO; ROOSSINCK, 2013) como fungos, bactérias, nematóides e vírus.

Segundo Oliveira et al. (2005) dentre os fungos, merecem destaque os classificados no filo Basidiomycota. A maioria dos fungos são reponsáveis por causarem danos em diversas espécies florestais. Como exemplo podem ser citadas espécies dos gêneros *Puccinia*, *Gymnosporangium* e *Cronartium* (causadores de ferrugem) em eucalipto; *Olivea tectonae* em teca (*Tectona grandis*) (BONALDO et al., 2011) e *Uromycladium alpinum* em acácia (*Acacia mearnsii*) (SANTOS, 2002).

Dentre as bactérias fitopatogênicas que causam doenças em espécies arbóreas, podem ser citadas: *Xanthomonas* spp. em: álamo (*Populus deltoides*), mangueira (*Mangifera indica*) (BRUN, 2006) e eucalipto (GONÇALVES et al., 2003) além de *Ralstonia solanacearum* em espécies de eucalipto (ALFENAS et al., 2009) e bracatinga (*Mimosa scabrella*) (MAFIA, 2006).

Doenças causadas por nematóides são de grande importância, pois podem causar grandes perdas, uma vez que o parasita penetra o sistema radicular impedindo o fluxo de nutrientes, alterando o metabolismo da planta e deixando-as suscetíveis ao ataque de outros fitopatogenos. Entre os nematóides que infectam as espécies arbóreas destacam-se *Meloidogyne* spp., *Mesocriconema* spp., *Xiphinema* spp. e *Pratylenchus* spp (GOULART, 2007).

No Brasil espécies de vírus causando danos em espécies arbóreas ainda são escassos, entretanto para florestas nativas da Europa, Nienhaus e Castello (1989), fizeram uma compilação de vários estudos demonstrando a presença de vírus em espécies arbóreas.

4. Vírus em espécies arbóreas no mundo e Brasil

De acordo com Mokili et al. (2012) os vírus são entidades presentes na natureza com organização simples e vem sendo considerados como os mais abundantes do planeta.

Estudos realizados por Bergh et al. (1989) demonstraram que a água marinha continha um número extremamente elevado de partículas virais, superior ao número de procariotos encontrados no local. Estudos recentes para vírus de diversos ambientes tais como oceanos, solos e em superfícies oceânicas e terrestres são da ordem de $1,2 \times 10^{30}$; $2,6 \times 10^{30}$; $3,5 \times 10^{31}$ e $0,25-2,5 \times 10^{31}$ respectivamente, porém uma pequena porção dessa diversidade viral é conhecida (MOKILI et al., 2012). Até o presente momento, 3.186 espécies virais já foram listadas e aprovadas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Virus - ICTV, 2014).

Propriedades peculiares aos vírus, como tamanho pequeno (como a maioria das espécies relatadas) e ausência de variação morfológica de partículas dificultam estudos de detecção e caracterização por meio de técnicas clássicas usadas na virologia. De uma forma geral são raras as informações sobre vírus infectando espécies arbóreas (LABONTÉ; SUTTLE, 2013), entretanto de acordo com Nienhaus e Castello (1989) várias espécies virais ocorrem em ambiente de floresta da Europa e Alemanha. Estas espécies virais juntamente com outras descritas em diferentes trabalhos e compiladas aqui, encontram-se na **Tabela 3**.

Jalkanen et al. (2007) identificaram *Cherry leaf roll virus* - CLRV (gênero *Nepovirus* e família *Secoviridae*) em amostras de árvores de bétula (*Betula pendula*) provenientes de parques e florestas da Finlândia. Estudos anteriores já haviam demonstrado a presença do CLRV em árvores do gênero *Fraxinus* (BARNETT, 1971; NIENHAUS, 1989) e *Prunus* (SCHIMANSKI; FUNK, 1968).

Uma espécie viral classificada em *Cryptovirus* (família *Partitiviridae*) foi reportada por Veliceasa (2006) após análise de amostras de pinheiros (*Pinus sylvestris*) assintomáticos provenientes de florestas da Hungria. Espécies de *Cryptovirus* apresentam moléculas de RNA de fita dupla (dsRNAs) e podem ser transmitidos por sementes. Este foi o primeiro trabalho a relatar *Cryptovirus* infectando gimnosperma.

Tabela 3. Espécies de vírus relacionadas em espécies arbóreas no Brasil e mundo (Adaptado de NIENHAUS; CASTELLO, 1989; BÜTTNER, 2013).

Família	Espécie arbórea	Espécie viral/ ou tipo de partícula	Referência (ano de publicação/ país)
Adoxaceae	<i>Sambucus</i> spp.	<i>Cherry leaf roll virus</i> <i>Tomato black ring virus</i> <i>Elderberry latent virus</i>	Ellis et al. (1992) / Norte da América Pospieszny et al. (2004) / Polônia Jones (1972); Ellis et al. (1992) / Norte da América
	<i>Sambucus rancemosa</i>	<i>European mountain ash ringspot-associated virus</i>	Arndt et al.(2007) / Finlândia
Betulaceae	<i>Betula papyrifera</i>	<i>Apple mosaic virus</i> <i>Prune dwarf virus</i>	Hardcastle (1980); Gottlieb (1974) / Estados Unidos; Cooper; Massalski (1984) / Reino Unido
	<i>B. verrucosa</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i> <i>Tobacco rattle virus</i>	Cooper (1979) / Reino Unido, Cooper; Massalski (1984) / Reino Unido
	<i>B. pubescens</i>	<i>Cherry leaf roll virus</i> <i>Prune dwarf virus</i> Partículas	Cooper; Atkinson (1975) / Reino Unido; França; Jalkanen (2007) / Finlândia Bargen et al. (2009) e Büttner et al.(2011) / Alemanha Hamacher (1986) / Alemanha Hamacher et al. (1987) / Alemanha
	<i>B. pendula</i>	<i>Cherry leaf roll virus</i>	Schimanski et al. (1980) e Schmelzer (1972) / Alemanha
	<i>B. nigra</i>	<i>Prunus necrotic ringspot</i> <i>Prune dwarf virus</i>	Cooper; Massalski (1984) / Estados Unidos Cooper (1979) / Estados Unidos
	<i>B. alleghaniensis</i>	<i>Apple mosaic virus</i>	Gotlieb; Berbee (1973); Gotlieb (1975) / Estados Unidos
	<i>Carpinus</i> spp	<i>Apple mosaic virus</i>	Polák; Zieglerova (1997) / República Tcheca
	Bombacaceae	<i>Ceiba pentandra</i>	<i>Cacao swollen shoot virus</i>
Corynocarpaceae	<i>Corynocarpus laevigatus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Ashby (1977) / Nova Zelândia
Cupressaceae	<i>Cupressus arizonica</i>	<i>Tobacco ringspot virus</i>	Fulton (1969) / Estados Unidos
Euphorbiaceae	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Carlavirus</i> <i>Potexvirus</i>	Gama et al. (1983) / Brasil Junqueira et al. (1985; 1987) / Brasil
Fabaceae	<i>Cercis</i> sp	Partículas	Kim; Martin (1978) / Estados Unidos

Tabela 3. Espécies de vírus relacionadas em espécies arbóreas no Brasil e mundo (Adaptado de NIENHAUS; CASTELLO, 1989; BÜTTNER, 2013).

Família	Espécie arbórea	Espécie viral/ ou tipo de partícula	Referência (ano de publicação/ país)
Fabaceae	<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Tomato black ring virus</i> <i>Potex/ Potyvirus</i> <i>Potato virus X</i> <i>Bean yellow mosaic virus</i> <i>Cherry leaf roll virus</i>	Schmelzer (1966) / Reino Unido Nienhaus et al. (1985) / França Winter; Nienhaus (1989) / França Winter; Nienhaus (1989) / França Jones et al.(1990) / Reino Unido
	<i>Quercus spp</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> partículas/rígidas	Nienhaus; Yarwood(1972); Yarwood/ Europa; Yarwood; Hecht-poinar (1973) / Estados Unidos Frischmuth, et al.(1990) /
	<i>Q. robur</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> <i>Potex/Potyvirus</i> <i>Tobacco necrosis virus</i> partículas icosaédricas	Nienhaus (1975) / França Nienhaus (1985) / França Büttner; Nienhaus(1989) / França Nienhaus (1985) / França
	<i>Q. petrea</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> <i>Potex/Potyvirus</i>	Nienhaus (1975) / França Nienhaus (1985) / França
	<i>Q. velutina</i>	Partículas	Kim; Fulton(1973) / Estados Unidos
	<i>Robinia spp.</i>	<i>Nepovirus</i>	Bang et al. (2006)/; Borodynko et al. (2007) / Norte da América
	<i>Castanea sativa</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Horváth et al. (1975) / Hungria
Hippocastanaceae	<i>Aesculus spp</i>	<i>Strawberry latente ringspot virus</i> <i>Cherry leaf roll virus</i> <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	Schmelzer; Schimidt (1976) / Alemanha Sweet; Campbel (1976) Hentschet et al. (1997)
Juglandaceae	<i>Julglans sp</i>	<i>Cherry leaf roll virus</i> <i>Walnut yellow mosaic virus</i>	Cooper (1980); Massalski; Cooper (1984) / Reino Unido Rowhani (1985) / Califórnia; Savino et al. (1976) / Itália
Leguminosae	<i>Cassia hoffmannseggii</i>	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> <i>Tymovirus</i>	Nicolini et al. (2012) / Brasil
	<i>Senna macranthera</i> (= <i>Cassia macranthera</i>)	<i>Cassia mild mosaic virus</i> <i>Potyvirus</i> <i>Carlavirus</i> <i>Tymovirales</i>	Lin et al. (1979) / Brasil Lin et al. (1979) / Brasil Beserra Jr et al. (2012) / Brasil Seabra et al. (2001) / Brasil Beserra Jr et al. (2012) / Brasil

Tabela 3. Espécies de vírus relacionadas em espécies arbóreas no Brasil e mundo (Adaptado de NIENHAUS; CASTELLO, 1989; BÜTTNER, 2013).

Família	Espécie arbórea	Espécie viral/ ou tipo de partícula	Referência (ano de publicação/ país)
Leguminosae	<i>Senna occidentalis</i>	<i>African cassava mosaic virus</i> <i>Potyvirus</i>	Alabi et al. (1985) / Estados Unidos Almeida et al. (2002) / Brasil
Malvaceae	<i>Adansonia digitata</i>	<i>Cacao swollen shoot virus</i>	Brunt et al. (1996) / Reino Unido
	<i>Cola chlamydantha</i>	<i>Cacao swollen shoot virus</i>	Brunt et al.(1996) /Europa
	<i>Cola gigantea</i>	<i>Cacao swollen shoot virus</i>	Brunt et al.(1996) / Europa.
	<i>Sterculia tragacantha</i>	<i>Cacao swollen shoot virus</i>	Brunt et al.(1996) / Europa
	<i>Cola chlamydantha</i>	<i>Cacao swollen shoot virus</i>	Brunt et al.(1996) /Europa
	<i>Cola gigantea</i>	<i>Cacao swollen shoot virus</i>	Brunt et al.(1996) / Europa.
Myrtaceae	<i>Eucalyptus citridodora</i>	partículas	Sastry et al.(1971) / Índia
	<i>E. macrorhyncha</i>	partículas icosaédricas	Brzostowski; Grace (1974) / Austrália
Oleaceae	<i>Fraxinus Excelsior</i>	<i>Cherry leaf roll virus</i>	Winter; Nienhaus (1989) / França
		<i>Tobacco necrosis virus</i>	Casalicchio (1965) / Itália
		<i>Arabis mosaic virus</i>	Cooper (1975); Cooper; Sweet (1976) / Reino Unido
		<i>Cherry leaf roll virus</i>	Nienhaus; Hamacher (1989) / França
	<i>F. americana</i>	partículas	Ciferri et al. (1961) / Itália
		<i>Brome mosaic virus</i>	Barnett (1971) / Alemanha
		<i>Tobacco mosaic virus</i>	Castello et al. (1983); Ferris et al. (1989); Lana; Agrios et al. (1979) / Estados Unido
		<i>Arabis mosaic virus</i>	Cooper; Sweet (1979) / Reino Unido
<i>Tomato ringspot virus</i>	Ferris et al. (1987); Ferris; Castello (1988) / Europa; Hibben; Hagar (1975); Hibben et al. (1988) / Estados Unidos		
<i>F. holotricha</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Amico et al. (1985); Castello; Amico (1983) / Estados Unidos	
<i>Tobacco ringspot virus</i>	Amico et al. (1985) / Estados Unidos		
<i>F. pennsylvanica</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Ferris et al. (1987) / Estados Unidos	
	<i>Tobacco ringspot virus</i>	Ferris et al. (1989) / Estados Unidos	

Tabela 3. Espécies de vírus relacionadas em espécies arbóreas no Brasil e mundo (Adaptado de NIENHAUS; CASTELLO, 1989; BÜTTNER, 2013).

Família	Espécie arbórea	Espécie viral/ ou tipo de partícula	Referência (ano de publicação/ país)
Pinaceae	<i>Pinus monticola</i>	partículas	Biddle; Tinsley(1968) / Alemanha
	<i>P. silvestres</i>	<i>Scots pine mosaic virus</i>	Schmelzer et al. (1966) / Alemanha
		<i>Tobacco necrosis virus</i>	Büttner; Nienhaus (1989) / Alemanha
			<i>Cryptovirus</i>
	<i>Abies alba</i>	partícula icosaédrica	Frenzel (1987); Flachmann (1990) / Alemanha
	<i>Ladrix decídua</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Büttner; Nienhaus (1989) / Alemanha
Rosaceae	<i>Malus spp.</i>	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	Cadman (1963) /; Lister et al. (1965) / Alemanha
	<i>Malus domestica</i>	<i>Tomato ringspot virus</i>	Moini, Roumi, Masoumi; Izadpanah, 2010) / Iran
		<i>Apple stem pitting virus</i>	Freitas-Astua (2002) / Brasil
	<i>Prunus spp</i>	<i>Plum pox virus</i>	Adams (1978) / Europa
		<i>Prune dwarf virus</i>	Németh et al. (2010) / Hungria
	<i>Prunus avium</i>	<i>Tobacco necrosis ringspot virus</i>	Castello; Berbee (1978) / Estados Unidos
		<i>Prunus necrotic ringspot</i>	Fulton (1970) / Europa
		<i>Cherry leaf roll virus</i>	Schimanski; Funk(1968) / Europa
		<i>Petunia asteroid mosaic virus</i>	Gruntzig et al (1989) / Alemanha
		<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	Rana et al.(2008) /Índia
<i>P. domestica</i>	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	Cohen et al.(1995) / Israel	
<i>P. padus</i>	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	Schimanski et al (1975) / Europa	
	<i>Cherry leaf roll virus</i>		
<i>P. serotina</i>	<i>Prune dwarf virus</i>	Schimanski et al (1976) / Europa	
	<i>Cherry leaf roll virus</i>		
<i>P. pensylvanica</i>	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	Schimanski; Funk (1968) / Europa; Cation (1952) / Europa;	
	<i>Prune dwarf virus</i>	Fulton (1970) / Europa	
		Megahed; Moore (1967); (1969) / Estados Unidos	
<i>Sorbus spp.</i>	<i>Cherry leaf roll virus</i>	Rebenstorf et al. (2006) / Alemanha	

Tabela 3. Espécies de vírus relatadas em espécies arbóreas no Brasil e mundo (Adaptado de NIENHAUS; CASTELLO, 1989; BÜTTNER, 2013).

Família	Espécie arbórea	Espécie viral/ ou tipo de partícula	Referência (ano de publicação/ país)	
Rosaceae	<i>Sorbus aucuparia</i>	<i>Robinia true mosaic virus</i>	Schmelzer (1966); Schmelzer (1971) / Europa	
		<i>Tomato blackring virus</i>	Milinko; Schmelzer (1961) / Europa	
		<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	Schmelzer (1968) / Europa	
		<i>Apple mosaic virus</i>	Schmelzer (1977) / Europa	
		<i>Apple chlorotic leafspot virus</i>	Sweet (1980) / Reino Unido	
		<i>Stem pitting virus</i>	Sweet (1980) / Reino Unido	
		<i>Cherry leafroll virus</i>	Rebenstorf et al. (2006)/ Alemanha	
Salicaceae	<i>Populus</i> spp.	<i>European montain ash ringspot-associated virus</i>	Kallinen et al. (2009) / Mielke-Ehret (2010) / Alemanha	
		<i>Poplar mosaic virus</i>	Biddle; Tinsley (1971) / Grã-Bretanha; Boccoardo et al. (1973) / Estados Unidos; Luisoni et al. (1976) / Itália; Schmelzer (1966) / Alemanha; Smith et al. (2004) / Reino Unido	
		<i>Rhabdovirus</i>	Navratil (1981) / Europa	
		<i>Potyvirus</i>	Martin et al (1982) / Canadá	
Sapindaceae	<i>Salix</i> spp.	<i>Tomato blackring virus</i>	Cooper; Sweet (1976) / Estados Unidos	
		<i>Tomato mosaic virus</i>	Koop et al (1999) / Europa	
		<i>Tobacco necrosis virus</i>		
	<i>Acer</i> spp	<i>Brome mosaic virus</i>	Thomas (1970) / Reino Unido Szirmai (1972) / Europa Erdiller (1986) / Europa	
		<i>Arabis mosaic virus</i>		
		<i>Maple mosaic virus</i>		
		<i>Cucumber mosaic virus</i>		
<i>A. negundo</i>	<i>Maple leaf perforation virus</i>	Subikova (1973); Blattny (1965) / Europa		
<i>A. rubrum</i>	<i>Maple mosaic vírus</i>	Szirmai (1972) / Europa		
Ulmaceae	<i>Ulmus</i> spp	<i>A. saccharum</i>	<i>Peach rosette virus</i>	Kenknight (1960) / Estados Unidos
		<i>Tomamovirus</i>	Lana et al. (1980) / Canadá	
		<i>Elm mottle virus</i>	Jones (1974); Schmelzer(1969); Schmelzer et al (1966) / Alemanha	
		<i>Arabis mosaic virus</i>	Mcnamara (1980) / Reino Unido	
		<i>Potyvirus</i>	Schmelzer et al (1966) / Alemanha	
		<i>Cherry leaf roll virus</i>	Ford et al. (1972); Fulton (1970) / Estados Unidos	
<i>Tobacco ringspot virus</i>	Shiel; Castello (1985) / Estados Unidos/ Varney; Moore(1952); (1965) / Estados Unidos			
<i>Filamentos</i>	Bandte et al. (2004) / Alemanha			

Machado-Caballero et al. (2013) observaram sintomas de mosaico em diversas árvores do gênero *Fraxinus* em florestas de Minnesota. Por meio de estudos de microscopia eletrônica, gama de hospedeiras e testes sorológicos (DAS-ELISA) foi possível descrever a nova espécie White ash mosaic virus - WAMV (gênero *Vitivirus*, família *Betaflexiviridae*). Espécies de *Fraxinus* são muito utilizadas como ornamentais em projetos de paisagismo e são relatadas como hospedeiras de diferentes espécies virais nos Estados Unidos e na Europa. Algumas destas espécies são listadas a seguir: *Tobacco mosaic virus* - TMV (AMICO, 1985; LANA, 1974, CASTELLO, 1984), *Tobacco ringspot virus* - TRSV (gênero *Nepovirus* e família *Secoviridae*) (AMICO, 1985; CASTELLO, 1984), *Tomato ringspot virus* - ToRSV (gênero *Nepovirus* e família *Secoviridae*) (FERRIS, 1988; HIBBEN, 1972; 1988), *Arabis mosaic virus* - ARMV (gênero *Fabavirus* e família *Secoviridae*) (COOPER, 1976; NIENHAUS, 1989), CLRV (COOPER, 1976) e *Tobacco necrosis virus* - TNV (família - *Tombusviridae*) (NIENHAUS, 1989; 1990).

Recentemente uma nova espécie Mulberry vein banding associated virus - MVBaV (gênero *Tospovirus* e família *Bunyaviridae*) foi detectada em plantas de amora (*Morus* spp.) provenientes da China e Japão (MENG et al., 2015). Neste trabalho, Meng et al. (2015) obtiveram o genoma completo dos três segmentos da espécie MVBaV. Estudos anteriores já haviam identificado as espécies *Mulberry latent virus* (gênero *Carlavirus* e família *Betaflexiviridae*) (TSUCHIZAKI, 1976) e *Mulberry ringspot virus* (gênero *Nepovirus* e família *Secoviridae*) (TSUCHIZAKI, 1971) em amoras e Meng et al. (2013) já haviam demonstrado a presença de uma espécie de *Tospovirus* em amoras, sendo esse o primeiro registro de *Tospovirus* infectando amoras.

No Brasil estudos de espécies virais em espécies arbóreas ainda são escassos. As primeiras pesquisas começaram a partir do final dos anos 70 com Lin et al. (1979) que relataram *Cassia mild mosaic virus* - CaMMV (gênero *Carlavirus* e família *Flexiviridae*) em plantas de *Cassia sylvestris* (espécie típica utilizada na arborização de diferentes cidades do país).

Beserra et al. (2012) relataram duas espécies virais (uma classificada no gênero *Potyvirus* e outra na ordem *Tymovirales*) em *Senna macranthera* utilizada para arborização de Viçosa-MG.

Farias (2012) detectou uma espécie do gênero *Begomovirus* em plantas de *Mimosa caesalpinifolia* provenientes de Cuiabá ao utilizar *primers* degenerados para o gênero *Begomovirus* (ROJAS et al., 1993). Nesse trabalho, Farias (2012), por meio de testes sorológicos, relatou ainda várias espécies arbóreas como hospedeiras de vírus importantes para a agricultura. Dentre eles cita-se: *Groundnut ringspot virus* - GRSV (gênero *Tospovirus* e família *Bunyaviridae*), PVY e TSWV.

Batista (2014) realizou coletas de 148 mudas de espécies arbóreas em ambiente de viveiro II da NOVACAP, onde por meio de testes sorológicos foi possível identificar espécies virais classificadas nos gêneros *Begomovirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus* e *Tospovirus* em 60% das espécies arbóreas analisadas.

5. Metagenômica

O termo metagenômica foi usado pela primeira vez ainda em 1998 por Handelsman et al. (1998) para se referir ao estudo dos genomas de várias espécies de microorganismos presentes em uma mesma amostra ambiental. Atualmente o termo vincula-se análise de material genético de vários organismos.

Análises utilizando metagenômica permitem ampliar o conhecimento de microrganismos ocorrendo em diferentes ambientes, que vão desde águas oceânicas a fezes e até mesmo secreções. As análises por meio da metagenômica têm beneficiado na descoberta de vírus até então desconhecidos para a ciência (DELWART, 2007). Metodologias para enriquecimento de partículas virais e extração de pequenos RNAs (small RNAs) já estão bem adaptadas para estudos de espécies virais em diferentes hospedeiras.

A metagenômica juntamente com as plataformas de sequenciamento tem se mostrado ferramentas úteis em estudos de diversidade viral. Assim com a devida identificação e caracterização viral em um intervalo de tempo pequeno com mostra na **Tabela 4**, este método vem se tornando uma prática de análise rotineira (BOONHAM, 2014).

Essa técnica utiliza as novas plataformas de seqüenciamento e podem gerar um conjunto de informações podendo sequenciar genomas virais inteiros (KEHOE et al., 2014), sendo capazes de disponibilizar milhões de dados em apenas uma corrida (CARVALHO; SILVA, 2010). Além disso, não se faz necessário o conhecimento prévio da sequência dos microrganismos.

O sequenciamento genômico vem se tornando uma das melhores ferramentas para o estudo do genoma de uma determinada população. Desde o seu advento em 2000 as plataformas de sequenciamento, também conhecidas como NGS (*Next Generation Sequencing*), têm sido bastante utilizadas, principalmente na descoberta de novos vírus que ocorrem em plantas (BARBA, 2014). Essas novas tecnologias possibilitam gerar um alto volume de pares de bases, sequenciando vários genomas ao mesmo tempo, podendo otimizar o tempo por corrida (CARVALHO; SILVA, 2010).

A plataforma 454 foi uma das primeiras plataformas de sequenciamento de nova geração produzida pela Roche e utilizada comercialmente. Este método de sequenciamento é baseado

no pirosequenciamento, no qual uma molécula de pirofosfato é liberada durante a reação de sequenciamento (RONAGUI et al., 1998). Inicialmente o DNA é fragmentado, adaptadores são adicionados as extremidades destes fragmentos selecionados que são ligados a microesferas, as quais são envolvidas por uma solução oleosa onde ocorre a amplificação do DNA produzindo milhões de cópias do ácido nucléico (**Figura 3.**). A reação ocorre em poços separados e assim que um nucleotídeo é adicionado a fita de DNA pela DNA polimerase, um sinal é emitido em cada poço (**Figura 3.**), sendo possível desta maneira montar o genoma inteiro de um indivíduo (RONAGUI, 2001).

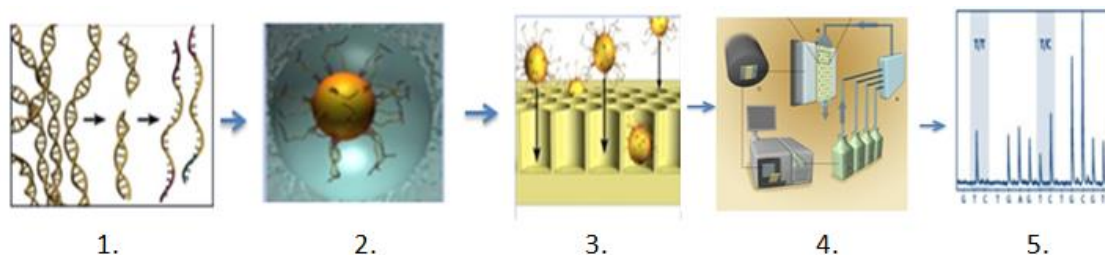


Figura 3. Esquema de sequenciamento realizado utilizando a plataforma 454: 1. Ligação dos adaptadores nas sequências de DNA; 2. Ligação dos fragmentos as microesferas e captura das microesferas ao óleo; 3. As microesferas são depositadas nos poços com os reagentes para PCR; 4. Um sinal de luz é emitido quando uma base nitrogenada é adicionada e são captadas pela placa de leitura e 5. As informações são interpretadas na forma de gráfico. **Fonte:** MARDIS (2008).

Na plataforma Illumina, o DNA é fragmentado e adaptadores são adicionados nas extremidades. Uma das extremidades é fixada em um suporte sólido, nucleotídeos são adicionados à reação e ligam-se a extremidade livre. Após o anelamento, uma ponte é formada ocorrendo a extensão da fita a partir da extremidade 3' livre com o uso de *primers* e uma DNA Polimerase (MARDIS, 2008). As fitas são separadas, depois da extensão, tornando-se lineares para que o procedimento se repita em vários ciclos (**Figura 4.**), produzindo vários fragmentos, formando um *cluster* devido à alta proximidade destes fragmentos (CARVALHO; SILVA, 2010).

No final nucleotídeos terminadores marcados são adicionados em cada *cluster* nos fragmentos que estão sendo sintetizados pela PCR, neste processo é realizada uma leitura do sinal que é capturado (**Figura 4.**), no final o excesso dos reagentes é eliminado, sendo permitidas leituras de aproximadamente 35 pares de bases de comprimento (SHENDURE, 2008).

A Plataforma SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*), diferentemente das outras plataformas que usam a DNA polimerase em suas reações, utiliza a DNA ligase em suas reações (Ansorge, 2009). O ácido nucléico é fragmentado para a produção de bibliotecas de *tags* únicas (com adaptadores ligados nas extremidades P1 e P2) ou *tags* duplas (os fragmentos de DNA são selecionados e ligados a um adaptador interno e

posteriormente as extremidades são ligadas a adaptadores denominados P1 e P2). Como na plataforma 454, ocorre uma PCR por emulsão.

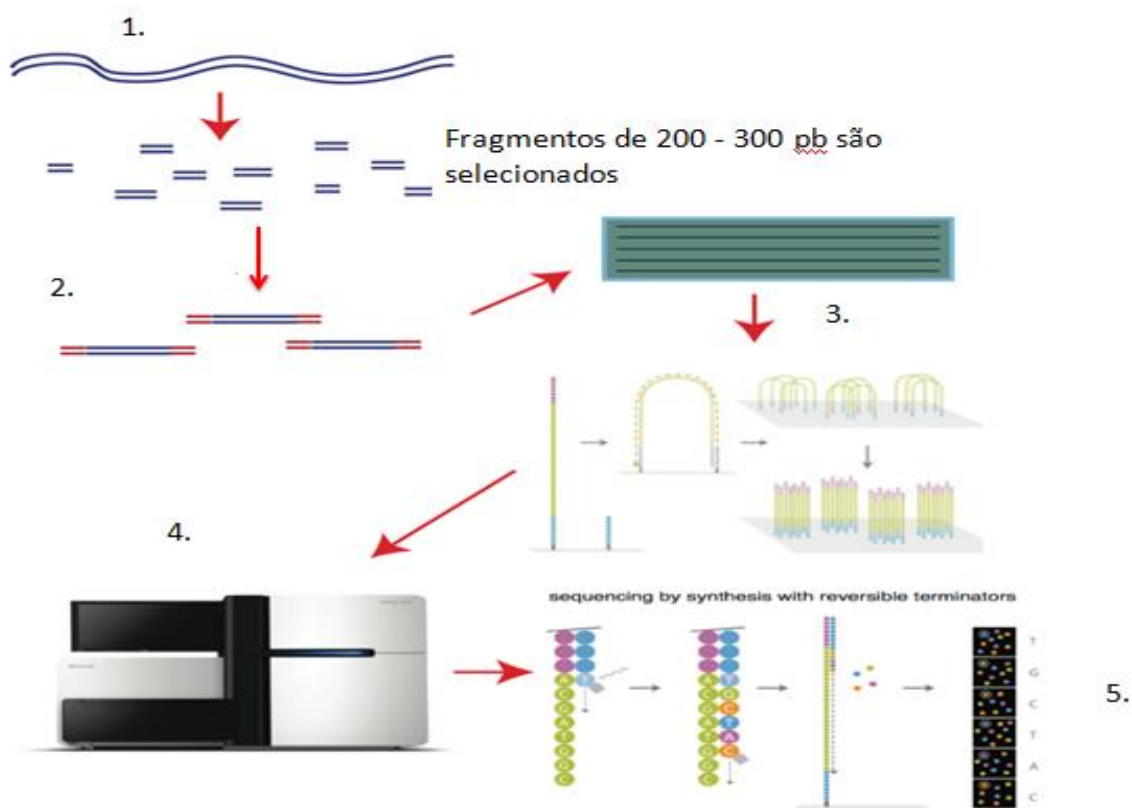


Figura 4. Ilustração de sequenciamento utilizando a plataforma Illumina. 1. Fragmentação do DNA; 2. Ligação dos adaptadores às extremidades livres dos fragmentos; 3. Fixação dos fragmentos ao suporte sólido, formação de pontes, amplificação e formação dos *clusters*. 4 e 5. Análise das sequências, para cada nucleotídeo marcado que foi adicionado um sinal de luz é emitido. **Fonte:**sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/com adaptações.

O sequenciamento ocorre em 5 etapas e 7 ciclos sequenciando até 35 pares de bases. Este processo utiliza sondas marcadas com fluoróforos diferentes, onde cada sonda contém 2 bases nitrogenadas, 3 bases degeneradas e 3 bases universais ligadas a um fluoróforo, nesse processo cada *primer* que é utilizado está ligado a uma sonda diferente como mostra a **Figura 5**. A reação é catalisada pela ação da DNA ligase e um sinal de fluorescência é emitido. A partir daí, as três últimas bases juntamente com o fluoróforo são liberadas e um novo ciclo se inicia (CARVALHO; SILVA, 2010).

Diferentemente das outras plataformas em que ocorre leitura dos nucleotídeos, nessa plataforma há uma leitura de duplas de nucleotídeos que são codificados em cores.

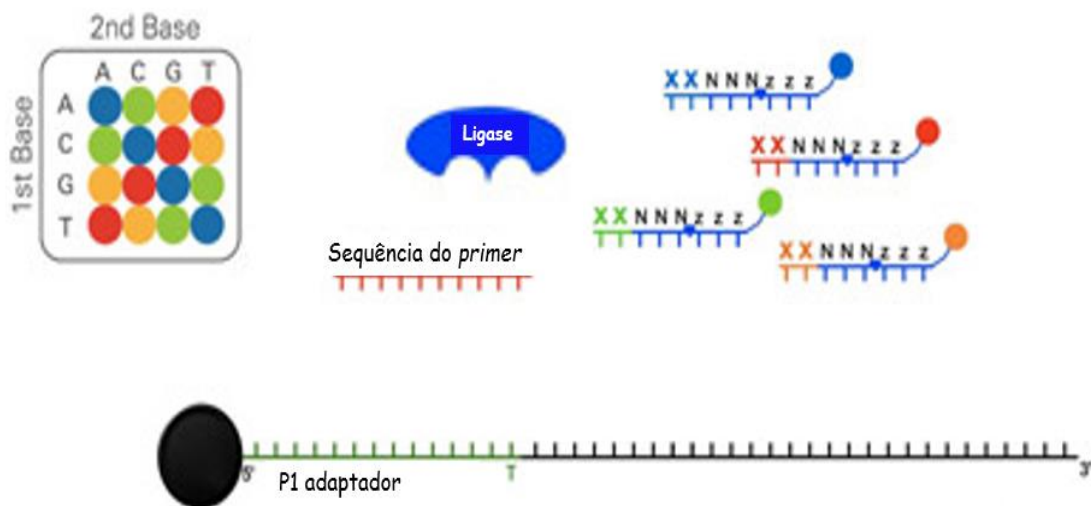


Figura 5. Plataforma de sequenciamento SOLiD, que apresenta quatro sondas diferentes, para cada sonda contém duas bases (XX), três bases degeneradas (NNN) e três bases universais ligados a fluoróforo. A reação é catalisada pela DNA ligase, a cada leitura um sinal de fluorescência é lido. **Fonte:** MARDIS, 2008.

Como ainda são escassos os estudos de vírus ocorrendo em espécies arbóreas/arbustivas no Brasil e que possivelmente estas espécies podem funcionar como reservatório natural de vírus novos para a Ciência ou de espécies virais já conhecidas por acometerem espécies cultivadas, realizou-se o presente trabalho no intuito de se obter mais informações sobre a diversidade viral em espécies importantes que ocorrem em vários biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa) e que vem sendo cultivadas em viveiro para produção de mudas utilizadas na arborização do Distrito Federal e Entorno.

Referências Bibliográficas

- ABRAF. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). Anuário Estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012. Brasília, DF, 2013. Acesso em 13 de janeiro de. 2015.
- ADAMS, A. N. The detection of *Plum pox virus* in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Annals of Applied Biology**, v. 90, p. 215-221, 1978.
- ALABI, N. S.; WHANGER, P. D.; WU, A. S. Interactive effect organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 911-919, 1985.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de. Clonagem e doenças do eucalipto. UFV - Viçosa. p. 442, 2004.
- ALFENAS, A. C. ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, **Imprensa Universitária**, 500 p., 2009.
- AMICO, L. A.; O'SHEA, M. T.; CASTELLO, J. D.; HIBBEN, C. R. Transmission of Tobacco mosaic and Tobacco ringspot viruses from *Moraine ash* in New York. **Plant Disease**, v. 69, p. 542, 1985.
- ARNDT, N.; BARGEN, S.V.; GRUBITS, E.; JALKANEN, R.; BÜTTNER, C. Occurrence of EMARAV and CLRV in tree species native to Finland. In: FELDMANN, F; ALFORD, DV.FURK, C. Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors. **Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft**. Braunschweig - Germany, p. 573-574, 2009.
- ARNDT, V.; ROGON, C.; HOHFELD, J. To be, or not to be - molecular chaperones in protein degradation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2525-2541, 2007.
- ASHBY, J. W; FORST, G. By *Cucumber mosaic virus*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 20, p. 533-534, 1977.
- BACHAND, G.D.; CASTELLO, J.D. Seasonal pattern of *Tomato mosaic Tobamovirus* infection and concentration in red spruce seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, 1436-1441, 1998.
- BANDTE, M.; ESSING, M.; OBERMEIER, C.; BÜTTNER, C. Virus-diseased *Ulmus laevis* in Eastern Germany. **Investigación Agraria, Sistemas Y Recursos Forestales**, v.13, p. 65, 2004.

- BANG, J. H.; CHOI, J. K.; LEE, S. Y. Characterization of *Peanut stunt virus* isolated from black locust tree (*Robinia pseudoacacia*). **Plant Pathology Journal**, v. 22, p. 125-130, 2006.
- BAO, X., ROOSSINCK, M. J. A life history view of mutualistic viral symbioses: quantity or quality for cooperation **Current Opinion in Microbiology**, v. 21; p. 514-518, 2013.
- 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.
- BARNETT, O. W. Mosaic of blackjack oak. **Plant Disease Management Reports**, v. 55, p. 411, 1971.
- BATISTA, J. G. **Ocorrência natural de espécies virais e avaliação de potenciais hospedeiras experimentais de *Begomovirus*, *Potyvirus* e *Tospovirus* em plantas arbóreas e berinjela (*Solanum melongena*)**. (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília, 2014.
- BERGH, O.; BORSHEIM, K. Y.; BRATBAK, G.; HELDAL, M. High abundance of viruses found in aquatic environments. **Nature**, v. 340, p. 467-468, 1989.
- BESERRA JR., J. E.; CARVALHO, M. G. de; BARGUIL, B. M.; ZERBINI, F. M. Partial genome sequence of a *Potyvirus* and of a virus in the order *Tymovirales* found in *Senna macranthera* in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 116-120, 2012.
- BIDDLE, P. G.; TINSLEY, T. W. *Poplar mosaic virus* in Great Britain. **New Phytologist**, v. 70, p. 61-66, 1971.
- BIDDLE, P. G.; TINSLEY, T. W. Virus diseases of conifers in Great Britain. **Nature**, v. 219, p. 1387-1388, 1968.
- BLATTNY, C. Further information on Poplar mosaic. **Lesn.Cas. Praha**, v. 11, 637-648, 1965.
- BOCCARDO, G.; LUISONI, E.; LOVISOLO, D. Characterization of an Italian isolate of *Poplar mosaic virus*. In: 2nd International Congress of Plant Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, U.S.A, v. 928, 1973.
- BOLDRINI, I. I.; FERREIRA, P. M. A.; ANDRADE, B. O.; SCHNEIDER, A. A.; SETUBAL, R. B.; TREVISAN, R.; FREITAS, E. M. Bioma Pampa: Diversidade florística e fisionômica. Porto Alegre, editora Pallotti p. 64, 2010.

- BONALDO, S. M.; BARCELI, A. C.; TRENTO, R. A.; GASPAROTTO, F.; TAFFAREL, C. Relato oficial da ocorrência de *Olivea tectonae* em teca (*Tectona grandis*) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 38, 153 p., 2011.
- BOONHAM, N.; KREUZE, J.; WINTER, S.; VAN DER VLUGT, R.; BERGERVOET, J.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. **Virus Research**, v. 186, p. 20-31, 2014.
- BORODYNKO, N.; HASIOW, B.; FIGLEROWICZ, M.; POSPIESZNY, H. Identification of the new strain of *Strawberry latent ringspot virus* isolated from black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). **Journal of Phytopathology**, v. 155, 738-742, 2007.
- BRUN, F.; MUNIZ, M. Doenças em Árvores e Plantas Ornamentais Urbanas. Disponível em: <<http://coral.ufsm.br/dcfll/seriestecnicas/serie6.pdf>> Acesso em 21 de janeiro de 2016.
- BRUNT, A. A.; CRABTTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L.; ZURCHER, E. J. Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: **Plant Viruses Online**, 1996.
- BRUNT, A. A.; CRABTTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L.; ZURCHER, E. J. (eds.) (1996 onwards).: Descriptions and Lists from the VIDE Database. **Plant Viruses Online** Version: 20th August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES>. Consultado em: 21 de janeiro de 2016.
- BRZOSTOWSKI, H. W.; GRACE, T. D. C. Virus-like particles isolated from diseased *Eucalyptus*, **Plant Disease Journal**, v. 58, p. 92-93, 1974.
- BÜTTNER, C.; VON BARGEN, S.; BANDTE, M. MYRTA, A. *Cherry leaf roll virus*. In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T. and Jelkmann, W. (eds) Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits. **American Physical Society**, St Paul, Minnesota, p. 119-125, 2011.
- BÜTTNER, C.; VON BARGEN, S.; BANDTE, M.; MÜHLBACH, H. P. Forest diseases caused by viruses. In Infectious Forest Diseases; Gonthier, P. N. G., Ed.; CABI: Wallingford, **Oxfordshire**, UK, p. 50-75, 2013.
- CADMAN, C. H. Biology of soil-borne viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 1, p. 143, 1963.
- CANDRESSE, T.; JELKMANN, W. Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits. **American Physical Society**, St Paul, Minnesota, p. 119-125, 2011.

- CARVALHO, M. C. D.; SILVA, D. C. G DA. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 735-744, 2010.
- CASALICCHIO, G. La punteggiatura cloro-necrotica del Fragsino maggiore (Chloro-necrotic spotting of ash). **Monti Boschi**, v. 16, p. 39-46, 1965.
- CASTELLO, J. D.; BERBEE, J. G. The detection and elimination of viruses from hybrid *Poplar* clones. **Phytopathology News**, v. 12, p. 186, 1978.
- CASTELLO, D.; AMICO, L. A.; O'SHEA, M. T. Detection of *Tobacco mosaic* and *Tobacco ringspot* viruses in White ash trees by enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Disease**, v. 68, p. 787-790, 1984.
- CASTELLO, J. D.; AMICO, L. A.; SHIEL, P. Seasonal distribution of Tobacco mosaic virus in Moraine ash - *Fraxinus holotricha*. Cultivar Moraine. **Phytopathology**, v. 73, p. 364, 1983.
- CATION, .C. Further studies on transmission of ringspot and cherry yellows viruses through seed. **Phytopathology**, v. 42, 1952.
- CECH, M.; KRAIK, O.; BLATTNY, C. Rod-shaped particles associated with virosis of spruce. **Phytopathology**, v. 5, p.183-185, 1961.
- CHAO, S. Forest peoples: numbers across the world. Moreton-in-Marsh. **Forest Peoples Programme**, 2012.
- CIFERRI, R.; CORTE, A.; RUI, D. Two viruses of *Fraxinus*: necrotic leaf curl and leaf marbling. **Rivista di Patologia Vegetale**, v.3, p. 241-250, 1961.
- COHEN, J.; GERA, A.; ECKER, R.; BEN-JOSEPH, R.; PERLSMAN, M.; GOKKES, M.; LACHMAN, O.; ANTIGNUS, Y. Lisianthus leaf curl - a new disease of lisianthus caused by *Tomato yellow leaf curl virus*. **Plant Disease**, v. 79, p. 416-420, 1995.
- COOPER, J. I. The prevalence of *Cherry leaf roll virus* in *Juglans regia* in the United Kingdom. **Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 15, p. 139-145, 1980.
- COOPER, J. I. Virus Diseases of Trees and Shrubs. Institute of Terrestrial Ecology. **Cambrian News Aberystwyth Cambridge**, 1979.
- COOPER, J. I.; MASSALSKI, P. R. Viruses and virus-like diseases affecting *Betula* spp. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B: **Biological Sciences**, v. 85, p. 183-195, 1984.

- COOPER, J. I.; SWEET, J. B. The detection of viruses with nematode vectors in six woody hosts. **Forestry**, v. 49, p. 73-78, 1976.
- COOPER, J. I.; SCHIMANSKI, H. H.; SCHMELZER, K.; ALBRECHT, H. J. Seed transmission of *Cherry leaf roll virus* in black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: **Allgemeine, landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie**, v. 131, p. 117-119, 1976.
- COOPER, J. I.; ATKINSON, MA. *Cherry leaf roll virus*, a cause of chlorotic symptoms in *Betula* spp. in the United Kingdom. **Forestry**, v. 48, p. 193-203, 1975.
- COSTA-LEONARDO, A. M. Cupins-Praga: morfologia, biologia e controle. Rio Claro: Divisa, 128p. 2002.
- DELWART, E. L. Viral Metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 115-131, 2007.
- DERAL Departamento de Economia Rural DERAL- Produtos Florestais. Disponível: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/produtos_florestais_2014_2015.pdf> Acesso em 13 de dezembro de 2015.
- ELLIS, P. J.; CONVERSE, R. H.; STACE-SMITH, R. Viruses of *Sambucus canadensis* in North America. **Acta Horticulturae**, v. 308, p. 69-80, 1992.
- EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/noticia/1713635/encontro-brasileiro-de-silvicultura-reune-setor-responsavel-por-45-do-pib-nacional>>. Acesso em: 27 de março de 2015.
- ERDILLER, G. Acer virus diseases in Turkey. **Journal of Turkish Phytopathology**, v. 15, p. 46-59. 1986.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FRA Termos e definições. Roma: Departamento de Florestas Organização das Nações Unidas 155 para a Agricultura e a Alimentação, 2000. Acesso em 05 de Janeiro de 2016.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Global Forest Resources Assessment FRA 2010. - Main report. FAO Forestry Paper 163 Rome: FAO, 2010.
- FARIAS, P. C. **Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus* e estudos de caracterização de vírus em *Mimosa caesalpinifolia***. (Monografia de graduação). Universidade de Brasília. Brasília, 2012.

- FERRIS, M. A.; CASTELLO J. D.; SINCLAIR, W. A. Effects of virus and MLO infection on green and white ash. **Phytopathology**, v. 79, p. 579-583, 1989.
- FERRIS, M. A.; CASTELLO, J. D. Detection of *Tomato ringspot virus* in white ash and adjacent vegetation Central New York. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 18, p. 813-817, 1988.
- FERRIS, M. A.; CASTELLO, J. D.; SINCLAIR, W. A. Symptom development on white ash and green ash seedlings inoculated with viruses and a mycoplasma-like organism. **Phytopathology**, v. 77, p. 116, 1987.
- FLACHMANN, M.; LESEMANN, D. E.; FRENZEL, B.; KOENIG, R. Isometric virus-like particles in *Abies alba* Mill. and other *Abies* species: partial purification and improved detection by means of immunoelectron microscopy. **Journal of Phytopathology**, v. 129, p. 193-202, 1990.
- FORD, R. E.; MOLINE, H. E.; MCDANIEL, G. L.; MAYHEW, D. E.; EPSTEIN, A. H. Discovery and characterization of *Elm mosaic virus* in Iowa. **Phytopathology**, v. 62, p. 987-992, 1972.
- FRENZEL, B. Studies on the hormone balance of coniferous trees in the North Black Forest being healthy, diseased by air pollution or effected by sulphur. Interim report, 3rd status colloquium, KfK-PEF 12, March 1987. <http://agris.fao.org/agris-seca>. Consultado em 15 de dezembro de 2015.
- FULTON, J. P.; FULTON, R. W. A comparison of some properties of elm mosaic and tomato ringspot viruses. **Phytopathology**, v. 60, p. 114-115, 1970.
- FULTON, J. P. Transmission of *Tobacco ringspot virus* to the roots of a conifer by a nematode. **Phytopathology**, v.59, p. 236, 1969.
- FULTON, R. W. *Prunus necrotic ringspot virus*. CMI/ AAB. **Descriptions of Plant Viruses**, v. 5, 1970.
- GAMA, M. I. C. S.; KITAJIMA, E. W.; ÁVILA, A. C.; LIN, M. T. Um *Carlavirus* em seringueira (*Havea brasiliensis*) **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 621, 1983.
- GONÇALVES, R.C. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil**. (Tese de Doutorado). Viçosa, UFV, 94 p., 2003.
- GOTLIEB, A. R. *Apple mosaic virus* infecting yellow birch in Vermont. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v. 2, p. 97, 1975.

- GOTLIEB, A. R.; BERBEE, J. G. Line pattern of birch caused by *Apple mosaic virus*. **Phytopathology**, v. 63, p. 470-477, 1973.
- GOTLIEB, A. R. **Isolation, characterization and transmission of *Apple mosaic virus* in white birch and isolation and characterization of a latent virus in yellow birch.** (PhD thesis). University Wisconsin, Madison. USA, 1974.
- GOULART, A. M. C. Diversidade de nematóides em agroecossistemas e ecossistemas naturais. Documentos /Embrapa Cerrados. p. 191, 2007.
- GRUNTZIG, M.; FUCHS, E.; KRATKOVA, J.; KEGLER, H.; KLEINHEMPEL, H.; RICHER, J. On the causal agent of detrimental canker of sweet and mazzard cherry in the GDR. **Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz**, v. 25, p. 203-207, 1989.
- GUGERLI, P.; VOSS, A.; BENZ, G. Electron microscopic demonstration of the presence of virus-like particles in extracts from Norway spruce needles. **Schweizerische Zeitschrift fur Forstwesen**, v. 137, p. 237-244, 1986.
- HAMACHER, J. Viruskontamination von Forstgehölzen unter besonderer Berücksichtigung der Birke. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft**, Berlin-Dahlem, Land, 1986.
- HAMACHER, J.; KREUTZ, G.; JACOB, S. Histological investigations on birch infected by *Cherry leaf roll virus*. Mededelingen van de Faculteit Land bouwwetenschappen, **Rijksuniversiteit Gent**, v. 52, p. 1049-1057, 1987.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, p. 245-249, 1998.
- HARDCASTLE, T.; GOTLIEB, A. R. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Apple mosaic virus* in yellow birch. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 10, p. 278-283, 1980.
- HARRISON, B.D.; NIXON, H.L. Purification and electron microscopy of three soil-borne plant viroses. **Virology**, v. 12, p. 104, 1960.
- HENTSCH, T.; FUCHS, E.; GRUNTZIG, M. Das. *Strawberry latent ringspot* (?), *Nepovirus* (SLRSV) in *Aesculus hippocastanum* L. [Strawberry latent ringspot (?) *Nepovirus* (SLRSV) on *Aesculus hippocastanum* L.]. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 31, p. 13-23, 1997.

- HIBBEN, C. R.; BOZARTH, R. F. Identification of an ash strain of Tobacco ash and adjacent vegetation in central New York. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 18, p. 813-817, 1972.
- HIBBEN, C. R.; REESE, J.; CASTELLO, J. D. Identification of *Tomato ringspot virus* in ash in New York. **Plant Disease**, v. 72, p. 75, 1988.
- HIBBEN, C. R.; HAGAR, S. S. Pathogenicity of an ash isolate of *Tobacco ringspot virus*. **Plant Disease Reporter**, v. 59, p. 57-60, 1975.
- HORVATH, J.; EKE, I.; GAL, T.; DEZSERY, M. Demonstration of virus-like particles in sweet chestnut and oak with leaf deformations in Hungary. **Z. PflKrankh PflSchutz**, v. 82, p. 498-502, 1975.
- IBÁ. INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). Relatório IBÁ - 2015. Indicadores de desempenho do setor nacional de árvores plantadas referentes ao ano de 2014. Disponível em: http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf. Acesso em em 03 de janeiro de 2016.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. ESTATÍSTICA. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.shtm>>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2016.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. Disponível em:<<http://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo>>. Acesso em 27 de março de 2015.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.shtm>>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2016.
- ICTV online. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. Disponível em http://www.ictvonline.org/Official_ICTV_Proposals.htm. 451 Acessado em 10 de dezembro de 2015.
- JACOBI, V.; CASTELLO, J. D. Infection of red spruce, black spruce, and balsam fir seedlings with *Tomato mosaic virus*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 22, p. 919-924, 1992.
- JALKANEN, R.; BÜTTNER C.; VON BARGEN, S. *Cherry leaf roll virus* abundant on *Betula pubescens* in Finland. **Silva Fennica**, v. 41, p. 755-762, 2007.
- JONES, A. T. A comparison of some properties of four strains of *Cherry leaf roll virus*. **Annals of Applied Biology**, v. 74, p. 11-17, 1973.

- JONES, A. T.; KOENIG, R.; LESEMANN, D. E.; HAMACHER, J.; NIENHAUS, F.; WINTER, S. Serological comparison of isolates of *Cherry leaf roll virus* from diseased beech and birch trees in a forest decline area in Germany with other isolates of the virus. **Journal of Phytopathology**, v. 129, p. 339-344, 1990.
- JONES, A.T. Purification and properties of *elderberry latent virus*, one of four sap-transmissible viroses obtained from American elder (*Sambucus canadensis* L.). **Annals of Applied Biology**, v. 70, p. 49-58, 1972.
- JONES, A.T. *Elm mottle virus*. Commonwealth Mycol. Inst. Assoc. Appl. Bioi. Descriptions. **Plant Viruses**, v. 1, 1974.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; GASPAROTTO, L.; MORAES, V. H. F.; SILVA, H. M.; LIM, M. T. New diseases caused by virus, fungi and also a bacterium on rubber from Brazil and their impact on international quarantine. In: Regional Conference on Plant Quarantine, Kuala Lumpur, Proceedings, ASEAN (Associação das Nações do Sudeste Asiático), Kuala Lumpur, **Support for Agricultural Development**, p. 253-260, 1985.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; GAMA, M. I. C. S.; KITAGIMA, H. W.; LASEMANN, D. E.; LIEBEREI, R. Virose da seringueira: uma nova enfermidade. EMBRAPA-Difusão de Tecnologia - CNPSD, (EMBRAPA-CNPSD). Comunicado técnico, v. 60, 5 p., 1987.
- KALLINEN, A. K.; LINDBERG, I. L.; TUGUME, A. K.; VALKONEN, J. P. Detection, distribution, and genetic variability of *European mountain ash ringspot-associated virus*. **Phytopathology**, v. 99, p. 344-352, 2009.
- KEHOE, M. A.; COUTTS, B. A.; BUIRCHELL, B. J.; JONES, R. A. C. Plant virology and next generation sequencing: Experiences with a *Potyvirus*. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.
- KENKNIGHT, G. *Prunus injacunda* Small and *Acer rubrum* L., natural hosts of *Peach rosette virus*. **Plant Disease Reporter**, v. 44, p. 220, 1960.
- KIM, K. S.; FULTON, J. P. Association of virus like particles with a ringspot disease of oak. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1029-1031, 1973.
- KIM, K. S.; MARTIN, E. M. Virus like particles associated with yellow ringspot of red bud. **Phytopathology News**, v. 12, p. 199, 1978.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado Brasileiro. Megadiversidade. **Conservation Biology**, v. 19, p. 707-713, 2005.
- KOPACHON, S.; SURIYA, K.; HARDWICK, K.; PAKAAD, G.; MAXWELL, J. F.; ANUSARNSUNTHORN, V.; BLAKESLEY, D.; GARWOOD, N. C.; ELLIOTT, S. Forest

- restoration research in northern Thailand, 1. The fruits, seeds and seedlings of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). **Natural History Bulletin of the Siam Society**, v. 44, p. 41- 52, 1996.
- KOPP, R.F., CASTELLO, J. D.; ABRAHAMSON, L.P. Viruses in *Salix* grown for bioenergy. **European Journal of Forest Pathology**, v.29, p. 117-122. 1999.
- LABONTÉ, J. M.; SUTTLE, C. A. Metagenomic and whole-genome analysis reveals new lineages of gokusho viruses and biogeographic separation in the sea. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 404, 2013.
- LANA, A.; AGRIOS, G. Properties of a Strain of *Tobacco mosaic virus* isolated from white ash trees. **Phytopathology**, v. 64, p. 1490 - 1495, 1974.
- LANA, A. F.; THOMAS, O. T.; PETERSON, J. F. A virus isolated from sugar maple. **Journal of Phytopathology**, v. 97, p. 214-218, 1980.
- LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C. da; TABARELLI, M.; LACHER JÚNIOR, T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, p. 139-146, 2005.
- LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L. Association of *Cassia mild mosaic virus* with dieback of *Cassia macranthera* in Central Brazil. **Plant Disease**, v. 64, p. 587-589, 1980.
- LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; CUPERTINO, F. P.; COSTA, C. L. Properties of a possible *Carlavirus* isolated from a Cerrado native plant, *Cassia sylvestris*. **Plant Disease Reporter**, v. 63, p. 501-505, 1979.
- LISTER, R. M.; BANCROFT, J. B.; NADKAVUKAREN, J. Some sap-transmissible viruses from apple. **Phytopathology**, v. 55, p. 859-870, 1965.
- LUISONI, E.; BOCCARDO, G.; MILNE, R. G. Purification and some properties of an Italian isolate of *Poplar mosaic virus*. **Phytopathology**, v. 85, p. 65-73, 1976.
- MACHADO-CABALLERO, J. E.; LOCKHART, B. E.; MASON, S. L.; MOLLOV, D.; SMITH, J. A. Identification, transmission, and partial characterization of a previously undescribed *Flexivirus* causing a mosaic disease of ash (*Fraxinus* spp.). In the USA, **Plant Management Network**. 2013.
- MAFIA, R. G. **Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto**. (Tese de Doutorado). Programa de pós-graduação em Fitopatologia. Viçosa, 2006.

- MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.9, p. 387-402, 2008.
- MARTIN, R. R.; BERBEE, J. G.; OMEUMU, J. O. Isolation of a *Potyvirus* from declining clones of *Populus*. **Phytopathology**, v. 72, p. 1158-1162, 1982.
- MASSALSKI, P. R.; COOPER, J. I. The location of virus-like particles in the male gametophyte of birch, walnut, and cherry naturally infected with *Cherry leafroll virus* and its relevance to vertical transmission of the virus. **Plant Pathology**, v. 33, p. 255-262, 1984.
- MCNAMARA, D. G. The spread of *Arabis mosaic virus* through noncultivated vegetation. **Plant Pathology**, v. 29, p. 173-176, 1980.
- MEGAHED, E. S.; MOORE, J. D. Differential mechanical transmission of *Prunus* viruses from seed of various *Prunus* spp. and from different parts of the same seed. **Phytopathology**, v. 57, p. 821-822, 1967.
- MENG, J. R.; LIU P. P.; ZOU, C. W.; WANG, Z. Q.; LIAO, Y. M.; CAI, J.H. First report of a *Tospovirus* in mulberry. **Plant Disease**, v. 97, p. 1001, 2013;
- MENG, J.; LIU, P.; ZHU, L.; ZOU, C.; LI, J.; CHEN, B. Complete genome sequence of Mulberry vein banding associated virus, a new *Tospovirus* infecting mulberry. **PLoS ONE**. 2015.
- MILINKO, I.; SCHMELZER, K. Zur Kenntnis der Mosaikkrankheit der *Robinia* (*Robinia pseudo-acacia*). **Phytopathology**, v. 4, p. 36-41, 1961.
- MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. O bioma Cerrado. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 27 de março de 2015.
- MOINI, A. A.; ROUMI, V.; MASOUMI, M.; IZADPANAH, K. Widespread occurrence of *Tomato ring spot virus* in deciduous fruit trees in Iran. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible **Diseases of Fruit Crops Julius-Kühn-Archiv**, v. 427, 2010.
- MOKILI, J. L.; ROHWER, F.; DUTILH, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 63-77, 2012.
- MORA, A. L.; GARCIA, C. H. A cultura do eucalipto no Brasil. **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, São Paulo, SP, 2000.
- MÜHLBACH, H. P.; MIELKE-EHRET, N. *Emaravirus*. In: KING, A.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee

- on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, San Diego, Califórnia, p. 767-770, 2011.
- NAVRATIL, S. A *Rhabdovirus* associated with vein yellowing and vein necrosis of balsam poplar. **Phytopathology**, v. 7, p. 245, 1981.
- NÉMETH, M.; NYERGES, K.; HANGYÁL, R.; KÓSA, G. Surveying viruses on ornamental trees and shrubs in two Hungarian botanical gardens and an arboretum. **Julius-Kühn-Archiv**, v.427, p. 293-299, 2010.
- NG, T. F.; DUFFY, S.; POLSTON, J. E.; BIXBY, E.; VALLAD, G. E.; BREITBART, M. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. **PloS One**, v. 6, 2011.
- NIENHAUS, F. Infectious diseases in forest trees caused by viruses, mycoplasma-like organisms and primitive bacteria. **Experientia**, v. 4, p. 597-603, 1985.
- NIENHAUS, F. Viren und virus verdachtige Erkrankungen in Eichen (*Quercus robur* and *Quercus sessiliflora*). **Z. Pflanzenerkr. Pflanzenschutz**, v. 82, p. 739-749, 1975.
- NIENHAUS, F.; CASTELLO, J. D. Viruses in forest trees. **Annual Review Phytopathology**, v. 27, p. 165-186, 1989.
- NIENHAUS, F.; HAMACHER, J. Virosen in Eschen. Allg. **Forstzeitg**, v. 16, p. 385-386, 1990.
- NIENHAUS, F.; HAMACHER, J. Virosen in Eschen. Allg. **Forstzeitg**, v. 16, p. 385-386, 1989.
- NIENHAUS, F.; YARWOOD, C. E. Transmission of virus from oak leaves fractionated with Sephadex. **Phytopathology**, v. 62, p. 313-315, 1972.
- OLIVEIRA, J. T.; TOMASELLO, M.; SILVA, J. C. Resistência natural da madeira de sete espécies de *Eucalyptus* ao apodrecimento. **Revista Árvore**. Viçosa, MG, v. 29, p. 993-998, 2005.
- OLIVEIRA, J. T. da S.; SOUZA, L. C. de; DELLA LUCIA, R. M.; SOUZA JUNIOR, W. P. de. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, v. 29, p. 819-826, 2005<<http://dx.doi.org>>. Consultado em: 24/01/2016.
- PEREIRA, L. G. B. A lagarta-parda, *Thyrinteina arnobia*, principal lepidóptero desfolhador da cultura do eucalipto. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais CETEC. **Dossiê Técnico**, 29 p. 2007.

- PIVETTA, K. F. L.; SILVA FILHO, D. F. Arborização Urbana. Boletim Acadêmico. Jaboticabal: UNESP/FCAV/FUNEP, 2002.
- POLÁK, Z.; ZIEGLEROVÁ, J. Spontaneous occurrence of *apple mosaic virus* in some forest and ornamental woody species. In: Cagan, L. and Praslicka, J. (eds) Proceedings of Fourteenth Slovak and Czech Plant Protection Conference (Slovak Republic), 3-4 September 1997. **Slovak University of Agriculture**, Nitra, Slovakia, p. 87-88, 1997.
- POSPIESZNY, H.; BORODYNKO, N.; JON´CZYK, M. First report of *Tomato black ring virus* (TBRV) in the natural infection of *Sambucus nigra* in Poland. **Journal of Plant Protection Research**, v. 44, p. 373-376, 2004.
- RANA, T.; CHANDEL, V.; HALLAN, V.; ZAIDI, V. V. Characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* infecting almonds in India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 3, p. 65-67, 2008.
- REBENSTORF, K.; CANDRESSE, T.; DULUCQ, M. J.; BÜTTNER, C.; OBERMEIER, C. Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, *Cherry leaf roll virus*. **Journal of Virology**, v. 80, p. 2453-2462, 2006.
- RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Research**, v. 650, p. 3-11, 2001.
- RONAGHI, M.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**. New York, N.Y., v. 281, p. 363-365, 1998.
- ROSSI, T. Identificação de espécies florestais, *Amburana cearensis* (Freire Allemão). IPEF - **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. São Paulo, 2008.
- ROWHANI, A.; MIRCETICH, S. M.; SHEPHERD, R. J.; CUCUZZA, J. D. Serological detection of *Cherry leaf roll virus* in English walnut trees. **Phytopathology**, v. 75, p. 48-52, 1985.
- SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: Ambiente e Flora**, Planaltina: Embrapa, p. 556, 1998.
- SANTOS, A. F.; FERREIRA, F. A. Uma ferrugem da acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia**. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-1582002000100017>>. Acesso em 24 de janeiro de 2016 [Online]. vol.27, p. 99-100. ISSN 1678-4677, 2002.
- SASTRY, K. S. M.; THAKUR, R. N.; GUPTA, J. A.; PANDOTRA, V. R. Three virus diseases of *Eucalyptus citridodora*. **Indian Phytopathology**, v. 24, p 123-126, 1971.

- SAVINO, V.; QUACQUARELLI, A.; GALLITELLI, D.; PIAZZOLLA, P.; MARTELLI, G. P. Occurrence of two sap transmissible viruses in walnuts. Mitteilungen, **Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft**, v. 170, p. 23-27, 1976.
- SCHIMANSKI, H. H.; ALBRECHT, H. J.; KEGLER, H. Seed transmission of *Cherry leaf roll virus* in birch (*Betula pendula*). **Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz**, v. 16, p. 1-32, 1980.
- SCHIMANSKI, H. H.; FUNK, T. Studies on the extent of transfer of *Cherry ringspot virus* by the seeds of wild cherry (*Prunus avium* L.). **Archiv Gartenbau** 16, 143-150. **Arch. Gartenbau. Plant Breeding Reviews**, v. 16, p. 143-150, 1968.
- SCHIMANSKI, H. H.; SCHMELZER, K.; ALBRECHT, H. J. Seed transmission of *Cherry leaf roll virus* in black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite natur wissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie**, v. 131, p. 117-119, 1976.
- SCHIMANSKI, H. H.; SCHMELZER, K.; KEGLER, H.; ALBRECHT, H. J. Wild growing *Prunus* species of the subgenera *Prunophora* and *Padus* as natural host plants for cherry ringspot viruses. **Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie**, v. 130, p. 109-120, 1975.
- SCHMELZER, K.; SCHMIDT, E. S.; SCHMIDT, H. B. Viruskrankheiten und virusverdächtige Erscheinungen an Forstgehölzen. **Archiv für Forstwesen**, v. 15, p. 107-120, 1966.
- SCHMELZER, K. *Cherry leaf roll virus* from birch (*Betula pendula* Roth.) **Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie**, v. 127, p. 10-12, 1972.
- SEABRA, P. V.; RIVAS, E. B.; DUARTE, L. M. L.; GALLETI, S. R.; ALEXANDRE, M. A. V. Detecção de *Carlavirus* em *Senna macranthera*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, SP, v.7, p.67-71, 2001.
- SFB. SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/snif/noticias-do-sfb/imagens-do-mural/lancamento-do-relatorio-fra-2015-pela-fao>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.
- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, p.1135-1145, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n10/abs/nbt1486.html>>. Acesso em: 5 junho. 2015.

- SHIEL, P. J.; CASTELLO, J. D. Detection of *Tobacco mosaic* and *Tobacco ringspot viruses* in herbaceous and woody plants near virus-infected white ash trees in central New York. **Plant Disease**, v. 69, p. 791-795, 1985.
- SMITH, C. M.; RODRIGUEZ-BUEY, M.; KARLSSON, J.; CAMPBELL, M. M. The response of the poplar transcriptome to wounding and subsequent infection by a viral pathogen. **New Phytologist**, v. 164, p. 123-136, 2004.
- SUBIKOVA, V. The mechanical transmission of *Euonymus mosaic virus*, maple leaf perforation by leaf extract or leaf nucleic acid to herbaceous plants. **Biologia Plantarum**, v. 1, p. 166-170, 1973.
- SWEET, J. B. The detection of viruses with nematode vectors in six woody hosts. **Forestry**, v. 49, p. 73-78, 1976.
- SZIRMAI, J. An Acer virus disease of maple trees planted in avenues. Acta Phytopathology. **Acta Botanica Hungarica**, v. 7, p. 197-207, 1972.
- SZIRMAI, J. An Acer virus disease of maple trees planted in avenues. Acta Academiae Scientiarum Hungaricae, **Acta Phytopathology**, v. 7, p. 197-207, 1972.
- THOMAS, P. R. Host status of some plants for *Xiphinema diversicaudatum* (Micol). and their susceptibility to viruses transmitted by this species. **Annals of Applied Biology**, v. 65, p. 169-178, 1970.
- TSUCHIZAKI, T; HIBINO, H; SAITO, Y. *Mulberry ringspot virus* isolated from mulberry showing ringspot symptom. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 37, p. 266-271, 1971.
- TUCCI, C. A. F.; LIMA, H. N.; LESSE, J. F. Adubação nitrogenada na produção de mudas de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Acta Amazônica**, Manaus, V. 39, n. 2, p. 289-294, 2009.
- VARNEY, E. H.; MOORE, J. D. Mechanical transmission of a virus from mosaic-infected elm to herbaceous plants. **Phytopathology**, v. 55, p. 22, 1965.
- VARNEY, E. H.; MOORE, J. D. Strain of *Tomato ringspot virus* from American elm. **Phytopathology**, v. 42, p.476-477, 1952.
- VELICEASA, D.; ENUNLU, N.; KÓS, P. B.; KOSTER, S.; BEUTHER, E.; MORGUM, B.; DESHMUKH, S. D.; LUKACS, N. Searching for a new putative cryltic virus in *Pinus silvestres* L. **Virus Genes**, v. 32, p. 177-186, 2006.

- VERDUM, R. O Pampa: Ainda desconhecido. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos - IHU Online**. São Leopoldo, v.183, p.4-9, 2006.
- VICENTINI, V. B.; PRATISSOLI, D.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V. T. de; ZINGER, F. D.; PINHEIRO, P. F. Potencial acaricida do extrato etanólico de *sapindus saponaria* e de solução sabão sobre *Tetranychus urticae*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, p. 118-126, 2015.
- VIKBAL, C.; BEN, H. K. Insect growth regulator activity of *Cestrum parqui* saponins: an interaction with cholesterol metabolism. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Belgium, v. 71, p. 489-96, 2006.
- WINTER, S.; NIENHAUS, F. Identification of viruses from European beech (*Fagus sylvatica* L.) of declining forests in Northrhine-Westfalia (FRG). **European Journal of Forest Pathology**, v. 19, p. 111-118, 1989.
- YARWOOD. C. E.; HECHT-POINAR, E. Viruses from rusts and mildews. **Phytopathology**, v. 63, p. 1111-1115, 1973.
- ZANUNCIO, J. C.; ALMADA, R. DE P. A.; SOSSAI, M. F.; ZANETTI, R; ZANUNCIO, T. V.; FIALHO, M. DO C. Q. *Sphallenum tuberosum* (Coleoptera: Cerambycidae) em plantas de *Eucalyptus* spp. No município de Prado, Bahia. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, p.339-343, 2005.

Viroma de espécies arbóreas

RESUMO

A metagenômica juntamente com a bioinformática mostram-se excelentes ferramentas para a descoberta e caracterização de novos vírus, pois conseguem gerar um alto número de dados, como também possibilitam a recuperação de genomas inteiros a partir de diferentes amostras, não exigindo conhecimento prévio da sequência genômica do microorganismo. Com isso, o principal objetivo deste trabalho foi detectar espécies virais em plantas nativas do bioma Cerrado utilizando metagenômica. No viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) 60 amostras de 27 espécies florestais classificadas em 14 famílias botânicas foram coletadas apresentando sintomas similares àqueles exibidos por plantas infectadas por vírus. As plantas inicialmente foram submetidas a um processo de semipurificação, com posterior extração de ácido nucleico para que as amostras fossem enviadas (em um único *pool*) para sequenciamento pela tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*) e com o uso da plataforma Illumina MiSeq. Para a análise das amostras foi realizada uma montagem *de novo* das sequências no qual a análise conjunta dos dados gerou 5.005.013 milhões de *reads*. Das sequências obtidas, foram montados e produzidos 2.162 *contigs* que foram comparados ao banco de dados no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para comparação das sequências virais detectadas. Dentre os *contigs* analisados um deles, apresentou maior sequência genômica com 9.529 nucleotídeos (nt) e o maior número de *reads* (8.724). Esta sequência apresentou identidade nucleotídica de 23% com *Rice tungro spherical virus* (gênero *Waikavirus* e família *Secoviridae*). Análise da identidade de aminoácidos (23%) posicionou este vírus próximo a *Cricket paralysis virus - CrPV* (gênero *Cripavirus* e família *Dicistroviridae*). Além disso, houve similaridade na organização genômica da espécie em estudo com membros de *Dicistroviridae* por apresentarem 2 ORFs. Análises filogenéticas seguindo os critérios para a ordem *Picornavirales*, que incluem comparações entre a **pro-pol (Protease e RdRp - RNA polimerase dependente de RNA)** posicionaram a espécie em estudo no mesmo segmento de origem da família *Picornaviridae* sugerindo um ancestral comum para os membros de *Picornaviridae* e a espécie aqui estudada. Neste contexto acredita-se que esta espécie obtida por meio de NGS corresponda a um novo membro da ordem *Picornavirales* aqui denominado *Hovenia dulcis associated virus (HDAV)*. A partir de então, o ácido nucleico (RNA e DNA) de todas as amostras foi extraído. *Primers* específicos (HDAVF e HDAVR) foram sintetizados e realizou-se RT-PCR para todas as 60 amostras. Especificamente para a amostra uva do Pará (*Hovenia dulcis*) um amplicón de 803 pares de base (pb) obtido foi clonado em pGEM-T Easy e sequenciado, confirmando HDAV em uva do Pará. Outras sequências de tamanhos variando entre 595 - 1096 pb e *reads* de 17 - 60 menores foram observados. Nestes casos as espécies virais se assemelharam com membros das famílias *Caulimoviridae* (gêneros *Caulimovirus* e

Badnavirus) e *Secoviridae* (gêneros *Fabavirus*, *Comovirus* e *Nepovirus*). Primers já foram desenhados e serão testados nas plantas individuais futuramente.

Palavras - chave: metagenômica, *Picornavirales*, espécies arbóreas, uva do Pará.

Abstract

The metagenomic together with bioinformatics have shown to be excellent tools for the discovery and characterization of novel viruses since they can generate high number of data. It is also possible to obtain whole genome and also does not require prior knowledge of genomic sequence of the microorganism. Thus, the main objective of this work was to detect viral species native plants of the Cerrado biome using metagenomics. Sixty seedlings from 27 tree species, classified into 14 families, presenting viral - like symptoms were collected from the NOVACAP II (Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil) nursery. The plants were first subjected to a semipurification process, with subsequent extraction of nucleic acid. Then samples were sent for sequencing by NGS (Next Generation Sequencing), and using the Illumina platform MiSeq. For the analysis it was performed *de novo* assembly of sequences in which the joint analysis of data generated 5,005,013 million reads, the obtained sequences were assembled and produced 2,162 contigs that were compared to the database in the BLAST program (Basic Tool Local Alignment Search) for comparing the detected viral sequences. Among the sequences analyzed, one of them shows 9,529 nucleotides (nt) and the largest number of reads (8,724) and showed 23% nucleotide identity with *Rice tungro spherical virus* (genus *Waikavirus*, family *Secoviridae*). Analysis of amino acid identity (23%) positioned near this virus *Cricket paralysis virus* - CRPV (genus *Cripavirus*, family *Dicistroviridae*). Furthermore, there was similarity in the genomic organization of the species in studies with *Dicistroviridae* members by presenting two ORFs. Phylogenetic analyzes following criteria for *Picornavirales* order, including comparisons between pro-pol (protease and RdRp-RNA-dependent RNA polymerase) positioned species under study in the same family *Picornaviridae* source segment suggesting a common ancestor for members of *Picornaviridae* and the species studied here. In this context it is believed that this species obtained by NGS corresponding to a new member of *Picornavirales* order here called *Hovenia dulcis* associated virus (HDAV). Since then, the nucleic acid (RNA and DNA) of all samples was extracted. Specific primers (HDAV1 and HDAV2) were synthesized and RT-PCR was performed for all 60 samples. Specifically, for the sample of uva do Pará one amplicón of 803 base pair (bp) obtained was cloned into pGEM-T Easy and sequenced, confirming the HDAV (*Hovenia dulcis*) in uva do Pará. Other sizes sequences ranging from 595 - 1096 bp reads and 17 - 60 smaller were observed. In these cases the viral species resembled with members of *Caulimoviridae* families (genera *Caulimovirus* and *Badnavirus*) and *Secoviridae* (genera *Fabavirus*, *Comovirus* and *Nepovirus*). Primers have been designed and tested in individual plants in the future.

Keywords: metagenomics, viruses and tree species.

1. Metagenômica e vírus.

O termo metagenômica foi criado por Handelsman et al. (1998) e consiste na análise genômica de uma comunidade de microorganismos extraídos diretamente do ambiente independente do cultivo, podendo revelar a diversidade de organismos na natureza, como também infectando diversos organismos (BOONHAM et al., 2008).

Atualmente essa nova tecnologia aliada às plataformas de sequenciamento (454/ Roche, Illumina/ Solexa, ABI/ SOLID e Helicos) tem sido utilizada para o sequenciamento do genoma inteiro de diversos microrganismos, como também na descoberta e caracterização e na função do microrganismos em seu ambiente natural (MOROZOVA; MARRA, 2008).

Segundo Williamson (2011), a metagenômica surgiu para responder questões na microbiologia ambiental como: quem são? Quantos são? E o que estão fazendo aqui? Juntamente com as plataformas de nova geração tornou-se possível detectar, identificar e caracterizar novos vírus e viróides a partir de plantas sintomáticas ou assintomáticas sem o conhecimento prévio da sua sequência genômica (PRABHA et al., 2013). Uma vantagem adicional refere-se à possibilidade de detecção de sequências virais, mesmo em baixas concentrações na planta (BARBA et al., 2014).

Os primeiros estudos de metagenômica realizados utilizavam metodologias de sequenciamento tipo Sanger e na Virologia o primeiro trabalho de metagenômica, ainda utilizando o sequenciamento Sanger, revelou uma elevada abundância e diversidade em ambiente marinho (BREITBART et al., 2002).

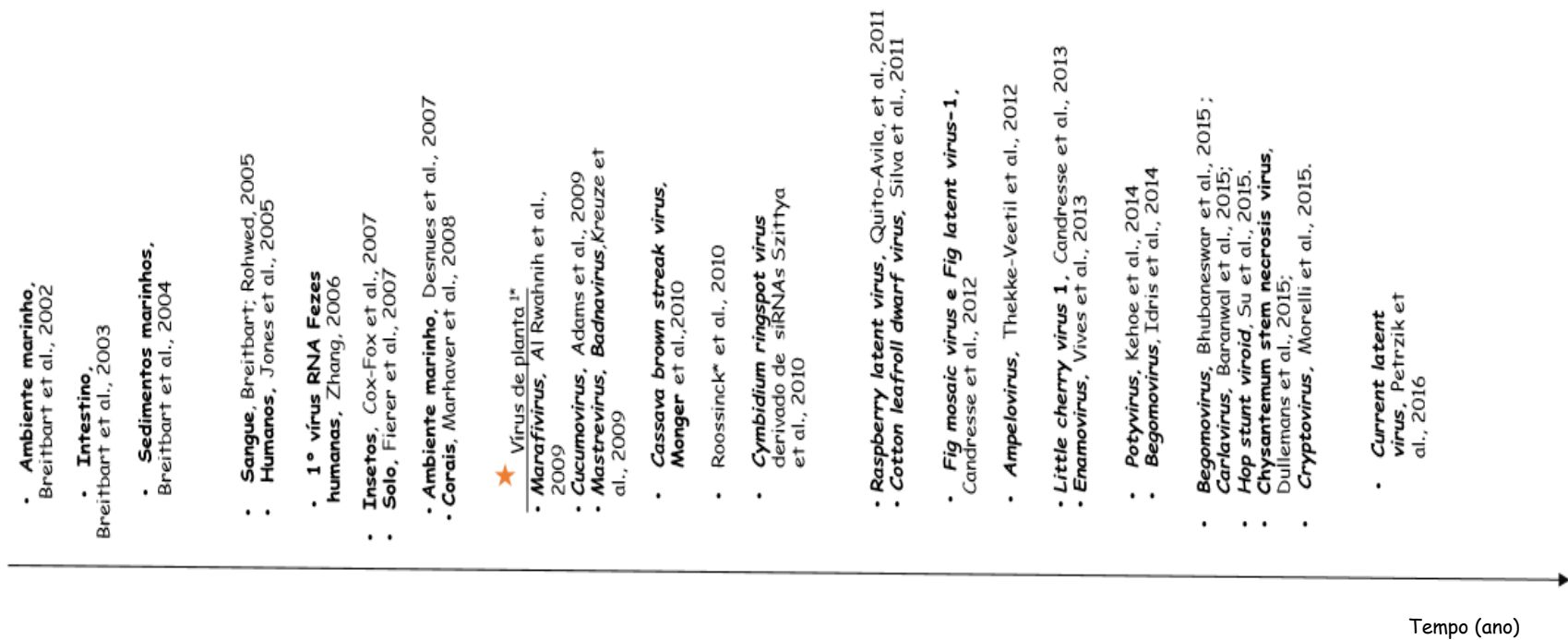
A partir de então, vários estudos foram realizados e novas espécies virais foram publicadas em diferentes ambientes/organismos: intestino (BREITBART et al., 2003); solo (WILLIAMSON et al., 2003); sangue (BREITBART; ROHWE, 2005) e corais (MARHAVER et al., 2008).

Para vírus de plantas, Al Rwahnih et al. (2009) foram os pioneiros a realizarem estudos da diversidade viral em plantas por meio da técnica de metagenômica, no qual detectaram um novo *Marafivirus* em videiras, denominado *Grapevine Syrah 1 virus*.

A partir de então, vários trabalhos vêm sendo realizados para detecção viral. No mesmo ano foram detectadas duas espécies de *Badnavirus* e uma espécie de *Mastrevirus* em batata (*Ipomoea batatas*) (KREUZE et al., 2009).

Adams et al. (2009) detectaram uma nova espécie de *Cucumovirus* em *Liatris spicatae* a qual denominaram de Gayfeather mild mottle virus - GMMV (gênero *Cucumovirus* e família *Bromoviridae*). Quito-Avila et al. (2011) relataram uma nova espécie denominada Raspberry

latent virus (família *Reoviridae*) infectando framboesas. A ordem cronológica de descoberta de novos vírus encontra-se na **Figura 1**.



*11 famílias virais infectando plantas:
Bromoviridae, Caulimoviridae, Chrysovriidae, Closteroviridae, Endornaviridae, Luteoviridae, Narnaviridae, Partitiviridae, Potyviridae, Totiviridae e Tymoviridae.

Figura 1. Vírus detectados/caracterizados por meio da metagenômica em ordem de descoberta (ano), autor. **Fonte:** MOKILI, 2012; BARBA; 2014; (BHUBANESWAR; BARANWAL; SU; DULLEMANS; MORELLI, 2015; PETRZIK, 2016. (adaptado).

Na busca por novos vírus utilizando a metodologia NGS em plantas Roossinck et al. (2010) avaliaram a diversidade viral proveniente de diferentes ambientes, um deles na Costa Rica e o outro nos Estados Unidos. Nesse trabalho, foram coletadas distintas espécies vegetais nas seguintes famílias listadas a seguir: Acanthaceae, Bignoniaceae, Caesalpinaceae, Commelinaceae, Cucurbitaceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Mimosaceae, Myrtaceae, Papilionaceae, Poaceae, Rubiaceae e Solanaceae. Do total de 344 espécies virais, encontrou-se que 30% correspondiam a espécies virais conhecidas (classificadas em 11 famílias: *Bromoviridae*, *Chrysoviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae*, *Endornaviridae*, *Luteoviridae*, *Narnaviridae*, *Partitiviridae*, *Potyviridae*, *Totiviridae* e *Tymoviridae*).

No mesmo ano, Pallett et al. (2010) detectaram a nova espécie *Cereal yellow dwarf virus* - CYDV (gênero *Luteovirus*) infectando panasco (*Dactylis glomerata*). De acordo com Wylie et al. (2012), doze espécies virais classificadas nos gêneros *Potyvirus*, *Nepovirus*, *Allexivirus* e *Carlavirus*, foram identificadas em plantas provenientes de parques da Austrália. Nesse trabalho quatro novas espécies virais foram propostas: Lily virus A - LVA, Blue squill virus A - BSA, Scaevola virus A - ScVA e Chocolate lily virus A - CLVA.

De modo geral, de acordo com Mokili et al. (2012) 60-99% das sequências geradas em diferentes estudos de metagenômica não são homólogas a nenhum vírus conhecido.

Para espécies arbóreas e florestais estudos utilizando metagenômica ainda são escassos, entretanto Loconsole et al. (2012) na Itália, identificaram cinco novas espécies virais e recuperaram o genoma completo de vírus e viroides, infectando plantas dos gêneros *Prunus*, *Citrus*, *Vitis*, *Ficus*, *Corylus*, *Diospyros* e *Morus*.

Poojari (2013), também utilizou metagenômica e técnicas de sequenciamento em larga escala para identificação dos agentes etiológicos Grapevine redleaf-associated virus - GRLaV (família *Geminiviridae*) e Grapevine fanleaf virus - GFLV (gênero *Nepovirus* e família *Secoviridae*) como causadores de manchas vermelhas em videiras.

A identificação correta de espécies virais é um passo importante para adoção de estratégias de controle. Se várias dificuldades foram encontradas no passado quanto à diagnose viral, atualmente com o uso da metagenômica e as plataformas modernas de sequenciamento, o problema concentra-se no entendimento da imensa quantidade de informação gerada, bem como na ausência de informações de sequência para comparação em bancos de dados.

A expansão das fronteiras agrícolas, incluindo áreas outrora ocupadas por algum bioma, inclusive pelo Cerrado e a crescente globalização favorecem o trânsito de materiais vegetais e patógenos, o que apresenta uma ameaça para espécies nativas (VINCENT et al., 2014). Além disso, a possibilidade de fluxo de espécies virais em novas hospedeiras pode propiciar muitos

eventos que geram variabilidade para a espécie viral como mutações e recombinações originando novas espécies virais.

Neste contexto, merece destaque especial viveiros e áreas de conservação. No Distrito Federal - DF existem dois importantes viveiros denominados viveiro I e viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) para produção de plantas ornamentais e arbóreas, respectivamente. O viveiro II é responsável por produzir mudas para arborização do DF e Entorno. A capacidade de produção de mudas deste viveiro situa-se em torno de 300 mil mudas ao ano, principalmente de espécies nativas dos biomas brasileiros.

2. Material e Métodos

2.1 Origem das espécies arbóreas

A coleta das mudas analisadas nesse trabalho foi realizada no viveiro II da NOVACAP no ano de 2014. No momento de coleta as mudas (sintomáticas e assintomáticas) apresentavam idade média de sete meses e encontravam-se em tubetes. Ao total 60 amostras distribuídas em 27 espécies e 14 famílias botânicas, foram coletadas e encontram-se listadas **na Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4**. No primeiro momento após as coletas, uma parte das plantas (aproximadamente duas folhas de cada amostra coletada) foram armazenadas em freezer (-80° C) e uma outra parte passou por um processo de semi-purificação de partículas virais, seguida de extração de RNA para envio das amostras para o sequenciamento de alto rendimento conforme descrito a seguir.

Tabela 1. Lista de espécies arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP), espécies identificadas pela família botânica, espécie arborea (nome comum e científico), número de amostras coletadas e sintomas observados.

Família Botânica	Espécies arbóreas Nome comum e científico		Número de amostras	Sintomas ¹
Anacardiaceae	Gonçalo Alves	<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott	3	CL/ DF
Apocynaceae	Guatambu	<i>Aspidosperma parvifolium</i> A. DC.	2	PC
Bignoniaceae	Ipê roxo	<i>Handroanthus impetiginosus</i> Mart. ex DC.	2	B/ N
	Ipê amarelo	<i>Handroanthus serratifolius</i> Vahl.	4	AM/ DF/ LN
	Bolsa de pastor	<i>Zeyheria tuberculosa</i> Vell.	2	AM
Cecropiaceae	Embaúba prateada	<i>Cecropia hololeuca</i> Miq.	2	DF/ SS
Fabaceae	Pau Brasil	<i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	3	PC
	Faveiro de Bolota	<i>Parkia pendula</i> Willd.	3	AM/ DF
	Eritrina	<i>Erytrina mulungu</i> Mart. ex Benth.	3	R
	Pau pereira	<i>Platycyamus regnelli</i> Benth.	3	AM/ DF
	Sete cascas	<i>Samanea tubulosa</i> Benth Barneby & J. W.	3	PC/ M/ MQ
	Pau ferro	<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. ex Tul.	1	CL
	Jacarandá	<i>Dalbergia violacea</i> Vogel	2	CL
	Copaíba	<i>Copaifeira langsdorfii</i> Desf.	2	CI/ 0
	Pau sangue	<i>Pterocarpus violaceus</i> Vogel	2	CL/ DF
	Amburana	<i>Amburana cearenses</i> Schwacke & Taub	2	PC
	Angico farinha seca	<i>Albizia hasslerii</i> Chodat	1	AM
Garapa	<i>Apuleia leiocarpa</i> Vogel	2	AM	

¹: **AM** - Amarelecimento; **B** - Bolhosidade; **CI** - Clareamento internerval; **CL** - Clorose; **LN** - Lesão necrótica; **DF** - Deformação foliar; **M** - Mosaico; **MQ** - Mosqueado; **N** - Necrose; **PC** - Pontos cloróticos; **R** - Rugosidade e **SS** - Sem sintoma observado.

Tabela 1. Lista de espécies arbóreas coletadas no Viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP), espécies identificadas pela família botânica, espécie arborea (nome comum e científico), número de amostras coletadas e sintomas observados.

Família Botânica	Espécies arbóreas Nome comum e científico		Número de amostras	Sintomas ¹
Guttiferae	Pau santo	<i>Kielmeyera variabilis</i> Mart. & Zucc	1	CL
Lecythidaceae	Jequitibá rosa	<i>Cariniana estrellensis</i> Raddi	3	DF
Malvaceae	Mutamba	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	3	CL
Melastomataceae	Quaresmeira	<i>Tibouchina granulosa</i> Desr.	2	M
Meliaceae	Mogno	<i>Swietenia macrophylla</i> King	2	PC/ DF
Myrtaceae	Eucalipto vermelho	<i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. Blake	2	DF/ SS
Rhamnaceae	Uva do Pará	<i>Hovenia dulcis</i> Thunb. Voucher.	2	CI/ M
Rutaceae	Guarantã	<i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	2	AM
Sapindaceae	Saboneteira	<i>Sapindus saponaria</i> L.	1	LN

¹: **AM** - amarelecimento; **B** - Bolhosidade; **CI** - Clareamento internerval **CL** - Clorose; **LN** - Lesão necrótica; **DF** - Deformação foliar; **M** - Mosaico; **MQ** - Mosqueado; **N** - Necrose e **PC** - Pontos cloróticos; **R** - Rugosidade e **SS** - Sem sintoma observado.

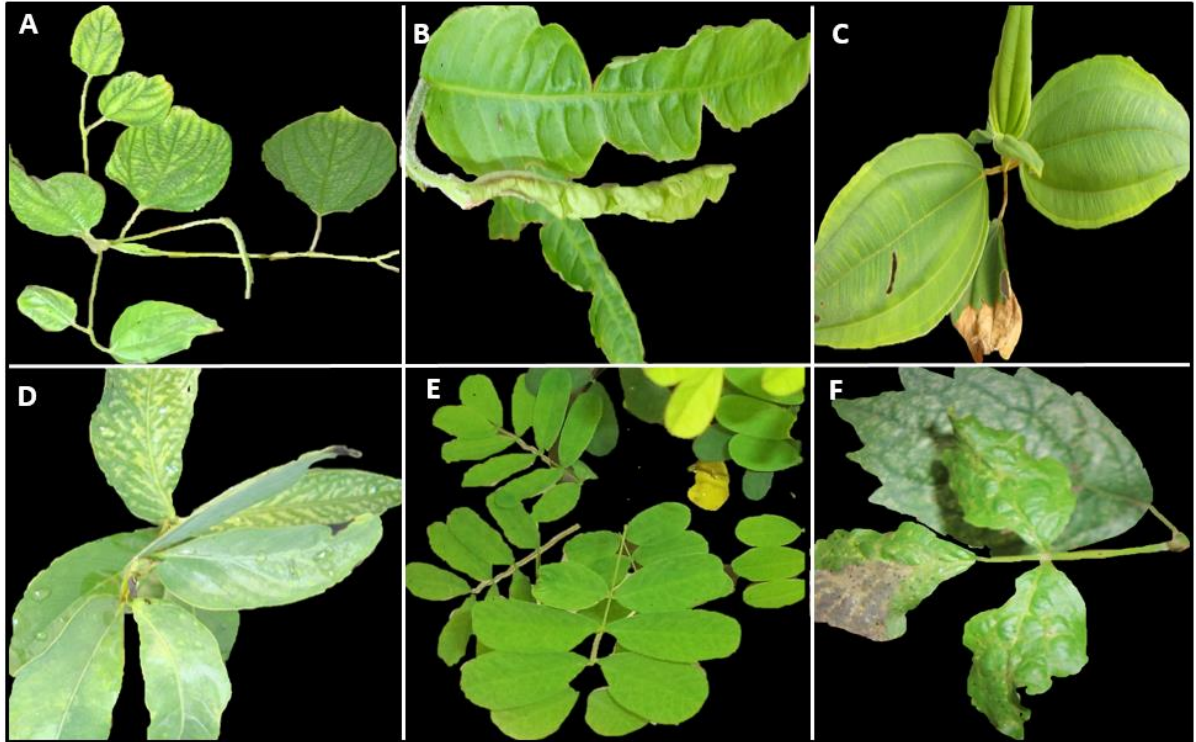


Figura 2. A-F: Espécies arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) apresentando sintomas similares àqueles induzidos por vírus de plantas. **A.** Uva do Pará - *Hovenia dulcis* (mosaico e clareamento internerval); **B.** Jequitibá rosa - *Cariniana estrellensis* (deformação foliar); **C.** Quaresmeira - *Tibouchina granulosa* (mosaico); **D.** Copaíba - *Copaifera langsdorfii* (clareamento internerval); **E.** Pau ferro - *Caesalpinia ferrea* (clorose) e **F.** Ipê roxo - *Handroanthus impetiginosus* (bolhosidades e necrose).

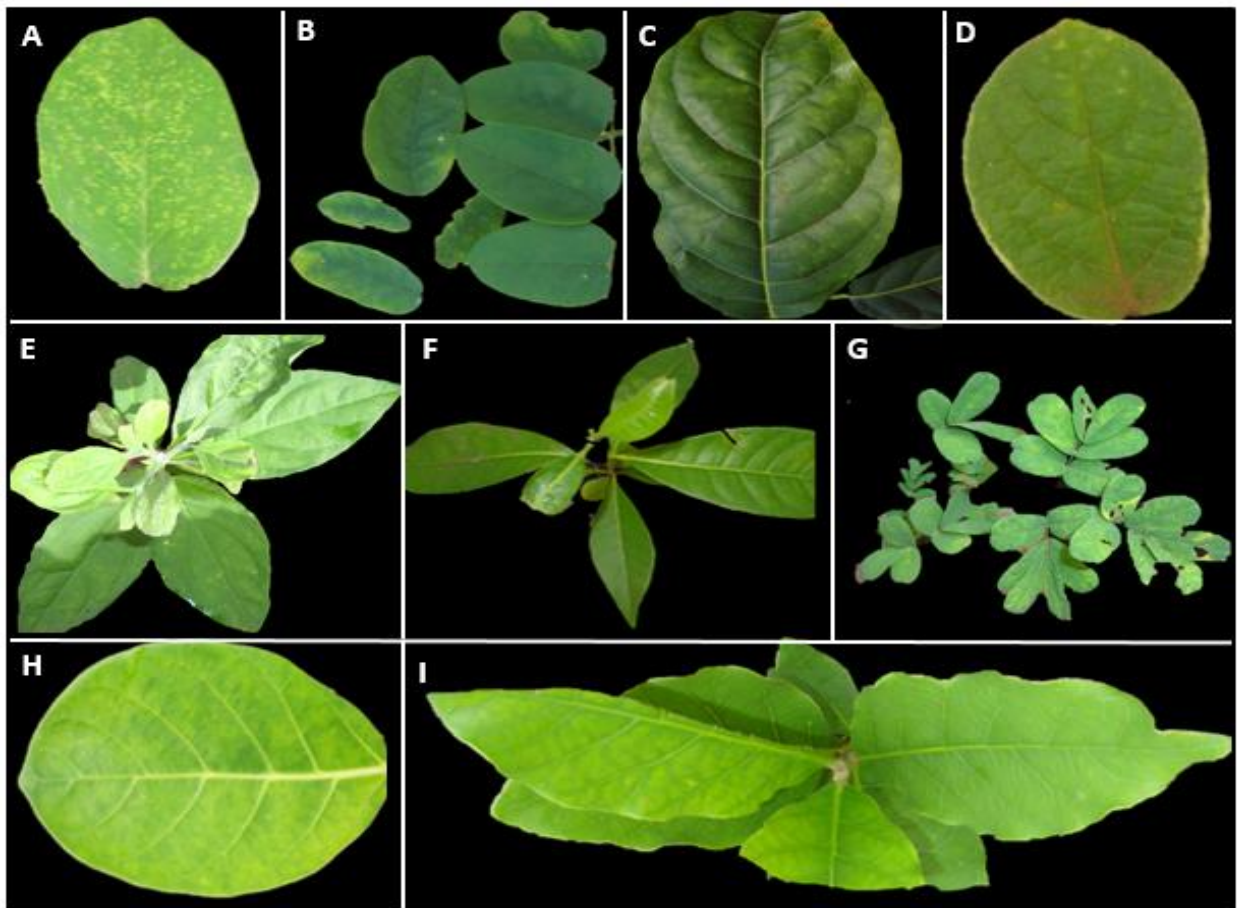


Figura 3. A-I: Espécies arbóreas coletadas em viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) apresentando sintomas similares àqueles induzidos por vírus de plantas. **A.** Garapa - *Apuleia leiocarpa* (pontos cloróticos); **B.** Amburana - *Amburana cearensis* (mosqueado e pontos cloróticos); **C.** Mogno - *Swietenia macrophylla* (pontos cloróticos); **D.** Bolsa de pastor - *Zeyheria tuberculosa* (pontos cloróticos); **E.** Pau pereira - *Platycyamus regnelli* (amarelecimento e deformação foliar); **F.** Guarantã - *Esenbeckia leiocarpa* (pontos cloróticos); **G.** Sete cascas - *Samanea tubulosa* (mosaico e mosqueado); **H.** pau santo - *Kielmeyera variabilis* (clorose e mosqueado) e **I.** Guatambu - *Aspidosperma parvifolium* (clorose).

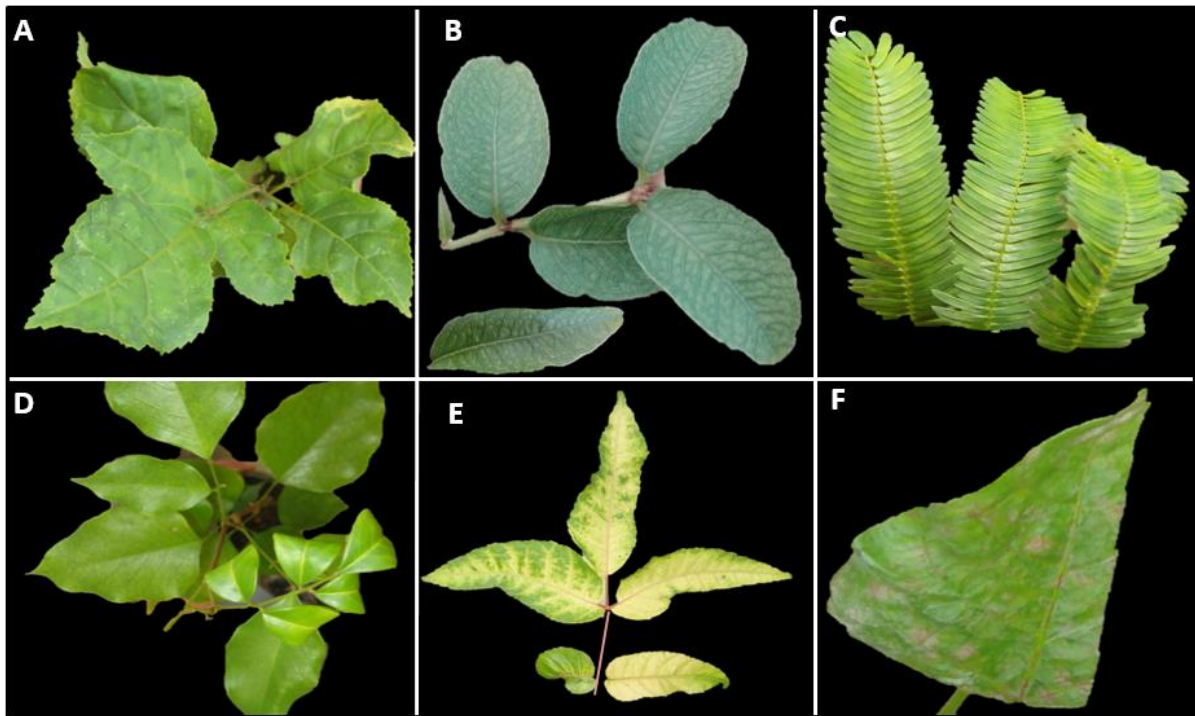


Figura 4. A-F: Espécies arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP) apresentando sintomas típicos induzidos por vírus de plantas. **A.** Ipê amarelo - *Handroanthus serratifolius* (clorose); **B.** Mutamba - *Guazuma ulmifolia* (clareamento internerval); **C.** Angico farinha seca - *Albizia hasslerii* (mosaico); **D.** Pau sangue - *Pterocarpus violaceus* (pontos cloróticos); **E.** Gonçalo Alves - *Astronium fraxinifolium* (clareamento internerval) e **F.** Eritrina - *Erythrina mulungu* (rugosidade).

2.2 Enriquecimento de partículas virais

A fim de realizar enriquecimento para partículas virais foi realizado um processo de semi-purificação (SILVA, 2015) das amostras que foram maceradas em nitrogênio líquido e organizadas em 3 *pools* de 10 g cada. Em seguida 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8 + EDTA 1 mM, pH 8 + β -mercaptoetanol 0,2% foi adicionado a cada *pool* das amostras maceradas e filtradas em gaze, sendo então, transferidas para tubos fálcon (50 mL) e centrifugados a 4°C numa rotação de 5.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrífuga e uma solução de sacarose a 20% foi adicionada no fundo do tubo formando um colchão de sacarose. Posteriormente as amostras foram ultracentrifugadas a 4°C em 33.000 g por 2 horas. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado restando os péletes. Em seguida procedeu-se à extração de RNA de acordo com o protocolo Trizol Reagent (Life technologies). Cada pélete formado foi ressuscitado em 1 mL de Trizol e transferido para outro tubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio por tubo. As amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex por 15 segundos e deixadas em temperatura ambiente por 3 minutos. Passado o tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g (ou rcf) por 15 minutos.

(min.) em temperatura de 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e adicionou-se 500 µL de isopropanol. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 10 min. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g (ou rcf) por 10 min. em uma temperatura de 4° C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 1 mL de etanol 75% e centrifugou-se a 7.500 g (ou rcf) por 5 minutos. Após a centrifugação o etanol foi descartado cuidadosamente para não perder o pélete, e então as amostras foram deixadas no gelo por aproximadamente 2 min. Para finalizar, o RNA foi ressuspendido em 40 µL de H₂O RNase-free (água tratada com DEPC - Dietil Pirocarbonato), colocadas no gelo por 10-15 min. e armazenadas no freezer a -80°C.

As amostras foram tratadas com RNAsable (Biomatrica) seguindo as recomendações do fabricante, para posterior envio para sequenciamento.

2.3 Sequenciamento e análise de dados

O genoma foi sequenciado utilizando a plataforma Illumina Miseq, realizado na Universidade Católica de Brasília (UCB). Esta plataforma pode produzir até 15 Gb de até 300 pb por corrida com alto rendimento (HELIXXA, 2014).

A partir dos *reads* (fragmentos sequenciados) que foram obtidos, pelo sequenciamento de alto desempenho (Illumina MiSeq), inicialmente procedeu-se uma limpeza a fim de remover as extremidades, resultando em sequências com boa qualidade utilizando-se o programa CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, 2015). A partir daí então, foi possível montar os *contigs* nesse mesmo programa.

Os *contigs* gerados foram importados para o programa Geneious v.7.1 (KEARSE et al., 2012) onde criou-se um banco de dados (Viral RefSeq) com sequências virais de interesse, em seguida os *contigs* gerados foram comparados contra esse banco de dados e também foram submetidos à análise com sequências depositadas no GeneBank (Genetic Sequence Database) do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), juntamente com o programa BLASTX (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990). Desta forma observou-se o alinhamento com diversas espécies virais.

A partir das sequências consenso geradas, baseadas nos vírus detectados pelo sequenciamento de alto desempenho, foi possível desenhar *primers* específicos (no programa VectorNTI, Invitrogen) para a detecção viral nas amostras individuais (**Tabela 2**).

Tabela 2. Sequência de *primers* sintetizados para a detecção de espécies virais obtidas a partir de NGS (*Next Generation Sequencing*)

Identificação	Sequência	Tm (°C)	Tamanho do amplicón (pb)
*HDAV ¹ F	5' CCACCCAATCGCGAGAGATTAA 3'	57	503
HDAV R	5' TTGTACAACCTGCGCCTCCGAC 3'		
MIKA ² F	5' ACAAACGGCTGGCAACTTG 3'	60	523
MIKA R	5' TTAATGGGGTTGCAGGGCTT 3'		
BBWV ³ F	5' CGCGCTCATAGCCAAACAAA 3'	59	558
BBWV R	5' GCTTTAGCTCGCATGATGCC 3'		
EVCV ⁴ F	5' ACACGGTAAATGATAGCTACAGACT 3'	59	566
EVCV R	5' TTCAATCCGTCCTTAGCCAAGA 3'		
CPMMV ⁵ F	5' TTCAAAGGCTGCTGATGGT 3'	60	619
CPMMV R	5' GTATGGCAGCGGGATTCTCA 3'		
CSMV ⁶ F	5' ATTGAAAACGCGACCTGCAC 3'	59	571
CSMV R	5' GCGGGATAAGCTCACCAAGT 3'		
SVBV ⁷	5' GCAAGTTCGGATAGCAGAAGG 3'	57	516
SVBV	5' TTCTGACCAGTGCCATTTCT 3'		

¹HDAV - *Hovenia dulcis* associated virus* (espécie selecionada para a recuperação do genoma completo);
²MIKA - *Mikania micrantha* mosaic virus; BBWV³ - *Broad bean wilt virus*; EVCV⁴ - *Eupatorium vein clearing virus*; CPMMV⁵ - *Cowpea mild mottle virus*; CSMV⁶ - *Cowpea severe mosaic virus* e SVBV⁷ - *Strawberry vein banding virus*.

2.4 Extração de RNA das plantas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP)

A extração de RNA foi realizada utilizando os protocolos Hot Phenol (VERWOERD,1989), no entanto para algumas amostras não foi possível extrair o ácido nucléico com qualidade seguindo esse protocolo. Desta forma utilizou-se um segundo protocolo CTAB (GASIC, 2004). Para a extração pelo protocolo Hot Phenol, 3 discos foliares (aproximadamente 250 mg do material vegetal) foram macerados em nitrogênio líquido e imediatamente adicionou-se 300 µL do tampão de extração (0,1M LiCl, 100 mM Tris HCl pH=8, 10 mM EDTA, 1% SDS) acrescido de 300 µL de fenol que foi inicialmente pré-aquecido a 80°C. Em seguida, adicionou-se 350 µL de HEPES e as amostras foram depositadas imediatamente em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 5 minutos à temperatura de 4° C. Após a centrifugação retirou-se 600 µL do sobrenadante que foi transferido para novo tubo de 2, 0 mL. Logo em seguida adicionou-se 600 µL de clorofil (clorofórmio/isoamílico 24:1) e as amostras foram agitadas manualmente por 2 minutos, seguida de centrifugação de 13.000 x g 4° C por 7 minutos. Aproximadamente 550 µL do sobrenadante foi transferido para novo tubo de 1, 5 mL e adicionou-se 550 µL de cloreto de lítio (LiCl) a 4M e as amostras foram deixadas precipitando a 4° C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi descartado todo o líquido, cuidadosamente, para não perder o pélete e os tubos foram deixados em papel toalha invertidos para secagem. Após a secagem foi adicionado 200 µL de tampão ProtK e 20 µL Protease K (20mg/mL) e as amostras foram incubadas a 37° C por 30 minutos. Após esse tempo na estufa adicionou-se 420 µL de fenol e procedeu-se à agitação manual, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 7 minutos a 4° C. A seguir, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado ao sobrenadante 380 µL de clorofórmio puro. Em seguida, os tubos foram agitados manualmente por inversão e com posterior centrifugação a 13.000 x g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi passado para um novo tubo e adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio (NaAc 3M pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol absoluto (EtOH). As amostras foram deixadas a - 20°C por 20 minutos. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 15 minutos a 4° C. O líquido foi descartado e adicionou-se 500 µL de etanol 70% (EtOH) e as amostras foram centrifugadas novamente a 13.000 x g por 5 minutos a 4°C para lavar o pélete. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perder o pélete e os tubos foram deixados invertidos em papel toalha para secarem. O pélete foi ressuscitado em 30 µL de TE (Tris-EDTA, 10/0,1 somente para RNA) e armazenados a -80°C. A extração foi confirmada em gel de agarose a 1% RNase free (Figura 5A).

A extração de RNA seguindo o protocolo CTAB (GASIC,2004) foi realizada apenas para as seguintes amostras: quaresmeira, pau Brasil, Gonçalves Alves e faveira de bolota da seguinte maneira: três discos foliares foram cortados e imediatamente congelados em N₂ líquido. Paralelamente 1,0 mL tampão de extração (TE) (2% CTAB - Brometo cetiltrimetilamônio); 2%

PVP; 100 mM tris/HCL, pH 8; 25 mM EDTA; 2 M NaCL; 2% mercaptoetanol) foi pré aquecido a 60°C e adicionou-se 2 % de mercaptoetanol imediatamente antes do uso. Logo após as amostras terem sido maceradas foi adicionado o tampão pré-aquecido no tecido vegetal. As amostras foram agitadas em vórtex por aproximadamente 10 segundos. A seguir, as amostras foram incubadas a 60 °C por 15 minutos sob agitação constante em *shaker*. Após a agitação foi adicionado um volume igual de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1), seguido de nova agitação por 10 minutos, e de centrifugação a 7.649 x g por 10 minutos. Coletou-se a fase aquosa para um novo tubo de 1, 5mL e repetiu-se os passos anteriormente citados. Em seguida, adicionou-se à fase aquosa 1/3 do volume da solução de cloreto de lítio a 7,5 M. e os tubos foram deixados na geladeira precipitando a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 7.649 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi então descartado. O precipitado foi solubilizado em 180 µL de H₂O milli Q (tratada com DEPC) e adicionou-se 0,2 volumes de etanol absoluto à cada amostra, as quais foram deixadas precipitando por 2 horas a - 20°C. Passado o tempo, as amostras foram centrifugadas a 7.649 x g por 30 minutos. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi lavado com etanol 70 % seguido de centrifugação a 7.649 x g por 10 minutos. O pélete formado foi solubilizado em 20 µL de H₂O Milli Q tratada com DEPC. A extração foi confirmada em gel de agarose a 1% RNase free (**Figura 5B**).

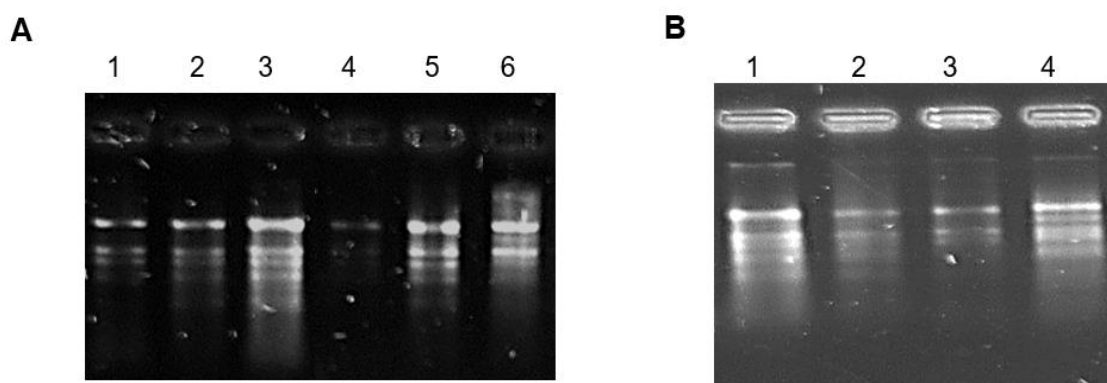


Figura 5 A-B. Gel da extração de RNA das amostras coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP). **A.** Protocolo Hot Phenol. **01.** Pau santo (*Kielmeyera variabilis*); **2.** Pau Pereira (*Platygyamus regnellii*); **3.** Saboneteira (*Sapindus saponaria*); **4.** Guatambu (*Aspidosperma parvifolium*); **5.** Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*); **6.** Uva do Pará (*Hovenia dulcis*). **B.** Protocolo CTAB. **1.** Quaresmeira (*Tibouchina granulosa*); **2.** Gonçalves Alves (*Astronium fraxinifolium*); **3.** Pau Brasil (*Caesalpinia echinata*); **4.** Faveiro de bolota (*Parkia pendula*). As amostras foram visualizadas em gel de agarose a 1%.

2.5 Análise molecular da sequência proveniente do sequenciamento de alto rendimento.

2.5.1 Detecção de Hovenia dulcis associated virus - HDAV por RT - PCR

O DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir da sequência do *primer* reverse que foi sintetizado de acordo com genoma da espécie aqui denominada Hovenia dulcis associated virus (HDAV) detectado a partir do sequenciamento de alto rendimento. A reação foi realizada utilizando-se a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) de acordo com o manual do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada para um volume total de 20 µL, sendo utilizada na reação 10 µL de RNA total, 1 µL do *primer* HDAVR (10 µM) 5' TTGTACAACCTGCGCCTCCGAC 3' e 1 µL de dNTP (10 mM) sendo incubada por 5 minutos a 70°C. Em seguida adicionou-se à reação 4 µL do tampão de enzima, 1 µL de RNase OUT (40 U/ µL, Invitrogen), 1 µL da enzima M-MLV (200 U/µL), 1 µL DTT 100 mM e 1 µL de H₂O milli-Q. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C e por 15 minutos a 70°C para inativação da enzima.

Para as reações de amplificação a partir do cDNA das amostras coletadas, utilizou-se o par de *primers* específicos denominados HDAVF/HDAVR (**Tabela 2**) e que foram sintetizados a partir da sequência genômica originada do sequenciamento de alto rendimento. Estes *primers* flanqueiam uma região para a capa proteica. O produto obtido após PCR ao utilizar esses *primers* é um amplicón de 803 (pb). Esse amplicón apresenta um sítio para BglIII gerando dois fragmentos (500 e 300 pb). As condições da PCR encontram-se descritas a seguir: **1.** temperatura inicial: 94°C durante 2 minutos e posteriormente 34 ciclos sendo cada um deles composto por **2. Desnaturação:** 94°C por 30 segundos, **3. Anelamento:** 60°C por 55 segundos e **4. Extensão:** 72°C por 1 minuto. As reações foram realizadas para um volume total de 12,5 µL. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% e corado em brometo de etídeo.

2.6 Clonagem do fragmento originado da RT- PCR com *primers* para Hovenia dulcis associated virus - HDAV cuja sequência foi obtida por NGS (*Next Generation Sequencing*)

Os amplicóns obtidos foram eluídos do gel de agarose utilizando o kit "GFX" (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foram ligados em pGEM-T Easy Vector (Promega) (**Figura 6**) gerando o pGEM-T Easy- HDAV 803. A reação de ligação do fragmento amplificado no vetor foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante do vetor. Para a ligação utilizou-se 1 µL de pGEM-T Easy Vector (50 ng/µL), 5 µL de tampão de ligação 2 X, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3 U/µL) e 3 µL do fragmento amplificado, em um volume final de 10 µL. Em seguida, a reação foi incubada a 4°C por 15h. Após a ligação, o DNA foi precipitado com N-butanol. Uma alíquota de 2 µL foi adicionada às células competentes (40 µL) de *Escherichia coli* DH5α para transformação por eletroporação. Em seguida foi adicionado 860 µL de meio LB líquido (solução autoclavada de 5 g NaCl, 5 g triptona e 2,5 g extrato de

levedura, em 500 mL de água destilada, a pH 7,5 e incubou-se por 1 h a 37°C. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (LB líquido adicionado de ágar bacteriológico) juntamente com ampicilina (100 µg/mL), 40 µL de X GAL (20 mg/L) e 10 µL de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (100 mM). As placas foram incubadas por uma noite a 37°C. Todos os procedimentos seguiram as recomendações dos fabricantes e indicações contidas em Sambrook et al. (1989). Após esse período colônias identificadas possuindo o inserto de cada placa foram retiradas e colocadas para crescimento em tubo fálcon contendo meio líquido LB e ampicilina (1:1). Os tubos foram incubados por 12 horas a 37° C com rotação de 174 rpm. No dia seguinte foi realizada extração de DNA plasmidial. Posteriormente, as amostras foram digeridas com endonuclease de restrição *EcoRI* em um volume de 15 uL. A digestão foi realizada com as seguintes condições: água Milli Q: 10 µL, Buffer H (10X): 1,5 µL, RNase A: 10 mg/mL: 0,1 µL, ECO RI: 0,4 µL e DNA: 3 µL. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 37°C durante 4 horas. Após a digestão o produto foi vizualiado diretamente em gel de agarose a 1%.

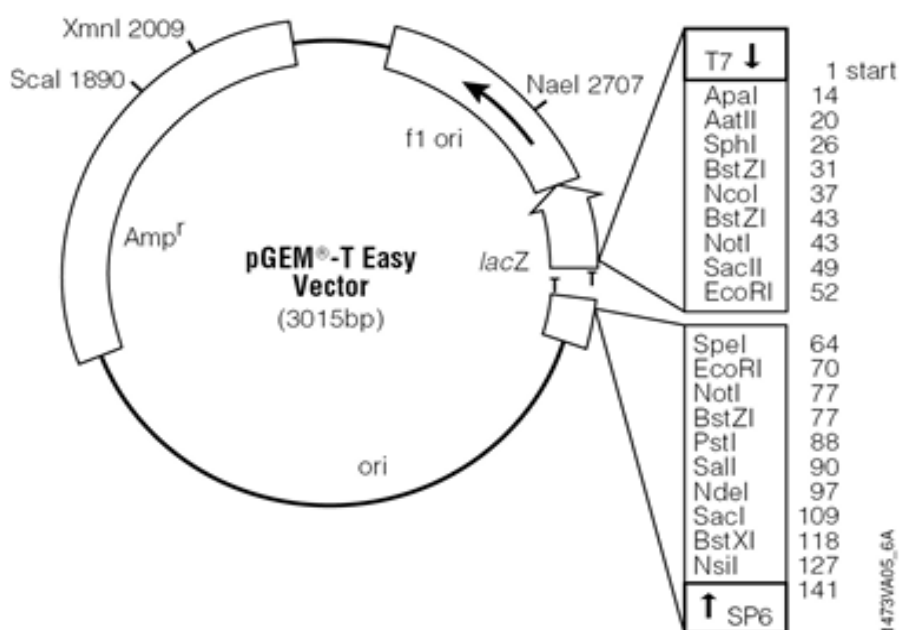


Figura 6. Esquema do vetor plasmidial pGEM-T Easy Vector. **Fonte:** promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems.

2.7 Extração de DNA das amostras arbóreas coletadas no viveiro II da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP)

O DNA total foi extraído das amostras utilizadas seguindo o protocolo CTAB (Brometo de Cetil Trimetilamônio) (BOITEUX et al., 1999) adaptado. Discos foliares de cada amostra foram

colocados em tubos de eppendorf (1,5 mL) e macerados em nitrogênio líquido. Depois de maceradas foram adicionados 700 µL de tampão CTAB e β-mercaptoetanol (0,2%). A seguir os tubos foram levados ao banho-maria por 10 minutos a uma temperatura de 65° C e deixados em temperatura ambiente por 3 minutos. Após esse tempo adicionou-se aos tubos 600 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1). Em seguida as amostras foram colocadas sob agitação vigorosa em vórtex. As amostras foram então, submetidas à centrifugação de 13.200 rpm por 5 minutos. Aproximadamente 450 µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 300 µL de isopropanol (2/3 do volume do sobrenadante). Os tubos foram agitados manualmente por inversão e em seguida foram centrifugados durante 13 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado em 500 µL de álcool 70% com posterior centrifugação de 13.200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados invertidos em papel toalha para secarem a temperatura ambiente. Os péletes formados foram ressuspensos em 100 µL de H₂O Milli-Q. O DNA foi visualizado em gel de agarose a 1% e corado em brometo de etídio. As amostras foram armazenadas em freezer - 20°C.

O DNA extraído das amostras também foi submetido à reação de RCA (Rolling circle amplification) (INOUE- NAGATA et al., 2004). O produto da RCA foi utilizado na reação de PCR para a identificação de *Begomovirus* com o uso dos *primers* PAL1v1978/PAR1c496 (tamanho do amplicón de aproximadamente 1.200 pb) (ROJAS et al., 1993). Esse par de *primers* foi utilizado nas amostras florestais.

2.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das amostras provenientes da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP)

Após a extração de DNA das amostras e RCA, realizou-se reações de PCR para detecção de espécies de *Begomovirus*, utilizando o par de *primers* PAL1v1978 (5'-GCATCTGCAGGCCCAACTYGTCTTTYCCNGT-3') e, PAR1c496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTRACATRGG-3') para o componente do DNA A (ROJAS et al., 1993). As reações foram realizadas para um volume total de 12,5 µL, contendo 1,25 µL de Tampão 10X da enzima Taq Polimerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 0,38 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,25 µL dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,25 µL de cada *primer* PAL1v1978/PAR1c1496 (10 µM), 0,1 µL da enzima Taq Polimerase (5U/µL, Invitrogen), 8,02 µL de água MiliQ e 2 µL de DNA. As reações foram amplificadas em termociclador (Bio-Rad) programado com as seguintes condições: **1.** temperatura inicial - 94°C durante 2 minutos e, posteriormente, 35 ciclos sendo cada um deles, **2. Desnaturação:** 94°C por 30 segundos, **3. Anelamento:** 55°C por 1 minuto e **4. Extensão:** 72°C por 3 minutos. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% e corado em brometo de etídeo.

2. 9 Análise filogenética da sequência de Hovenia dulcis associated virus - HDAV proveniente do NGS (*Next Generation Sequencing*)

Para a análise filogenética, as sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando-se a ferramenta MAFFT disponível no programa Geneious 7.1 (KEARSE et al., 2012) e, para a construção da árvore foi utilizado o método de máxima verossimilhança disponível no programa Geneious. Utilizou-se o algoritmo Fasttree (PRICE et al., 2009) com *bootstrap* de 1000 repetições.

Para a análise filogenética foram utilizadas as sequências das regiões conservadas dos seguintes domínios: Protease e RNA dependente de RNA polimerase (PRO/POL) pertencentes aos membros da ordem *Picornavirales*. As sequências que foram utilizadas estão depositadas GenBank e encontram-se listadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Sequências dos genomas de alguns representantes da ordem *Picornavirales* por família/gênero selecionadas de acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) para a construção da árvore filogenética utilizando os domínios (PRO/POL - protease e RNA dependente de RNA polimerase).

Famílias	Gêneros	Espécies	Número do acesso (GenBank)	Referência	
Dicistroviridae (3)*	<i>Cripavirus</i>	<i>Cricket paralysis virus (CrPV)</i>	NC_003924	Wilson et al., 2000	
		<i>Triatoma virus (TrV)</i>	NC_003783	Scodeller et al., 2000	
	<i>Aparavirus</i>	<i>Taura syndrome virus (TSV)</i>	NC_003005	Mari et al., 2002	
Iflaviridae (1)*	<i>Iflavirus</i>	<i>Infectious flacherie virus (IFV)</i>	NC_003781	Isawa et al., 1998	
		<i>Deformed wing virus (DWV)</i>	NC_004830.2	Lanzi et al., 2006	
		<i>Sacbrood virus (SBV)</i>	NC_002066	Ghosh et al., 1999	
		<i>Perina nuda virus (PnV)</i>	NC_003113	Wu et al., 2002	
		<i>Heterosigma akashiwo RNA virus (HaRNAV)</i>	NC_005281	Lang et al., 2004	
Marnaviridae (1)*	<i>Marnavirus</i>	<i>Heterosigma akashiwo RNA virus (HaRNAV)</i>	NC_005281	Lang et al., 2004	
	Picornaviridae (29)*	<i>Parechovirus</i>	<i>Human parechovirus (HPeV)</i>	NC_001897	Johansson et al., 2002
		<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichi virus (AIV)</i>	NC_001918	Yamashita et al., 1998
<i>Enterovirus</i>		<i>Human enterovirus C (HEV- C)</i>	NC_002058.3	Kafasla et al., 2010	
Secoviridae (8)* (2)**	** <i>Comovirus</i>	<i>Cowpea mosaic virus (CPMV)</i>	NC_003549	Lomonosoff; Shanks, 1983	
	** <i>Nepovirus</i>	<i>Arabidopsis mosaic virus (ArMV)</i>	NC_006057	Wetzel et al., 2004	
	* <i>Cheravirus</i>	<i>Cherry rasp leaf virus (CRLV)</i>	NC_006271	Thompson et al., 2004	
	* <i>Torradovirus</i>	<i>Tomato torrado virus (ToTV)</i>	NC_009013	Verbeek et al., 2007	
	***	<i>Strawberry mottle virus (SMoV)</i>	NC_003445	Thompson et al., 2002 ¹	
	* <i>Sequivirus</i>	<i>Parsnip yellow fleck virus (PYFV)</i>	NC_003628	Turnbull-Ross et al., 1993	
	* <i>Waikavirus</i>	<i>Rice tungro spherical virus (RTSV)</i>	NC_001632	Shen et al., 1993	

*informação entre parêntese refere-se ao número de gêneros classificados nas famílias, entretanto para análises filogenéticas seis gêneros foram considerados. ** refere-se a subfamília *Comovirinae* e *** gênero não definido de acordo com o ICTV (ictvonline.org/index.asp). Estes acessos foram selecionados de acordo com KING et al. (2012).

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise das sequências provenientes do sequenciamento de alto desempenho.

As sequências foram analisadas e após o sequenciamento obteve-se aproximadamente 5.005.013 milhões de reads (fragmentos sequenciados) no programa CLC Genomics Workbench v.8.0 (CLC Bio). Destes foram obtidos 2.162 contigs a partir das regiões concisas dos *reads* produzidos. Observou-se o alinhamento com diversas espécies virais tais como: *Cowpea mild mottle virus* -CPMMV (gênero *Carlavirus* e família *Betaflexiviridae*), *Eupatorium vein clearing virus* e *Strawberry vein banding virus* - SVBV (gênero *Caulimovirus* e família *Caulimoviridae*), *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (gênero *Comovirus* e família *Secoviridae*), *Broad bean wilt virus* - BBWV e *Mikania micrantha mosaic virus* - MMMV (gênero *Fabavirus* família *Secoviridae*). Com base nestas sequências de tamanhos (595 - 1096 pb) e *reads* (17 - 60) maiores que as demais, *primers* foram desenhados (**Tabela 2**) e serão testados nas plantas individuais futuramente.

Essas espécies e demais vírus que também foram detectados pela análise metagenômica encontram-se listados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Vírus detectados pela análise metagenômica, comprimento da sequência em pares de bases, identidade, E- value (valor estatístico do alinhamento) e número total de *reads* por espécie vírus.

Gênero	Organismo	Comprimento da sequência	% identidade	E - value	Total de <i>reads</i>
Badnavirus	<i>Banana streak mysore virus</i>	349	56.5	3.20e-31	8
	<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	241	48.6	3.04e-14	4
	<i>Dioscorea baciliform virus</i>	55	54.5	3.83e-28	41
Carlavirus	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	1186	95.6	1.58e-152	56
Caulimovirus	<i>Eupatorium vein clearing virus</i>	645	40	1.51e-12	60
	<i>Figwort mosaic virus</i>	374	46.2	1.02e-13	6
	<i>Lamium leaf distortion virus</i>	331	46.8	1.21e-22	20
	<i>Rudebeckia flower distortion virus</i>	262	58.8	7.72e-24	4
	<i>Strawberry vein banding virus</i>	595	33.9	3.60e-16	56
Comovirus	<i>Bean pod mottle virus</i>	346	68.9	2.08e-38	7
	<i>Cowpea severe mosaic virus</i>	635	65.7	8.09e-39	20
	<i>Turnip ringspot virus</i>	354	51.9	7.51e-19	14
Fabavirus	<i>Broad bean wilt virus</i>	1096	36.6	1.69e-27	24
	<i>Mikania micrantha mosaic virus</i>	781	58.2	1.03e-46	17
Petuvirus	<i>Petunia vein clearing virus</i>	442	38.4	9.29e-26	18
Tospovirus	<i>Groundnut ringspot virus</i>	79	98.3	6.40e127	15
Totivirus	<i>Black raspberry virus</i>	292	33.6	2.81e-16	18
Soymovirus	<i>Cestrum yellow leaf curling virus</i>	331	64	2.55e-29	4
	<i>Hovenia dulcis associated virus</i>	9529	23.4	4.21e-35	8724

*Destaque em azul - Espécies virais selecionadas (estudos futuros) de acordo com o comprimento da sequência genômica.

3.2. Novo membro da ordem *Picornavirales*: Hovenia dulcis associated virus - HDAV detectado pela análise metagenômica em espécies arbóreas no Distrito Federal

A análise genômica juntamente com as tecnologias de sequenciamento de nova geração tem revolucionado os estudos genômicos em termos de tempo e eficácia. Essas metodologias têm proporcionado o sequenciamento de genomas inteiros, além de que, essa tecnologia tem revelado uma alta diversidade viral em diferentes ambientes (ROOSSINCK, 2012), entretanto grande maioria dessa diversidade é representada por vírus ainda desconhecidos (ROSARIO; BREITBART, 2011). Vários estudos têm mostrado a detecção viral em ambientes como fezes humanas (FINKBEINER et al., 2008), solo (WILLIAMSON et al., 2003) e plantas (ADAMS; KREUZE, 2009).

Estudos envolvendo metagenômica e plataformas de sequenciamento de nova geração tem ajudado a compreender os vírus no ambiente, sua funcionalidade, como também realizar sua análise evolutiva (WILLIAMSON, 2011), entretanto a detecção viral em espécies arbóreas ainda é pouco explorada no Mundo e no Brasil. No Brasil, estudos de diversidade viral ocorrendo em sistemas naturais e em espécies arbóreas usadas para arborização é incipiente. De acordo com Roossinck (2012) um dos motivos para a falta de conhecimento sobre diversidade viral nestas espécies pode ser a falta de sintomas exibidos pelas plantas.

Neste trabalho utilizando-se NGS detectou-se várias espécies virais classificadas basicamente em duas famílias de vírus: *Caulimoviridae* (gêneros *Caulimovirus* e *Badnavirus*) e *Secoviridae* (gêneros *Fabavirus* e *Comovirus*) (Tabela 4). Entretanto uma espécie provavelmente nova para a Ciência foi recuperada com maior sequência genômica (9.529 nucleotídeos) e número de *reads* (8.724). Inicialmente esta sequência foi submetida a um BLASTX quando comparados contra um banco de dados no GenBank. Após algumas análises filogenéticas essa espécie foi denominada como Hovenia dulcis associated virus (HDAV) (ordem *Picornavirales*).

A ordem *Picornavirales* engloba espécies virais que apresentam ácido nucleicos do tipo ssRNA+, partículas com diâmetro variando entre 25 e 30 nm e um variado conjunto de hospedeiras que vão desde algas, vertebrados, invertebrados e plantas. Diferenças em hospedeiras, segmentação (mono ou bipartido) e organização genômica permitem a separação das cinco famílias classificadas nesta ordem (*Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Secoviridae* e *Picornaviridae*) (ICTV, 2014) (KING et al., 2012; ICTV, 2014).

Características das famílias e gêneros na ordem *Picornavirales* encontram-se listados abaixo. As informações sobre taxonomia foram extraídas de King et al. (2012) e ICTV (2014).

- 1- **Dicistroviridae** (gêneros *Aparavirus*, *Cripavirus* e *Triatovirus*): as espécies são caracterizadas pelo genoma monopartido, organização em 2 ORFs (**Figura 7**) e possuem insetos como hospedeiras.
- 2- **Iflaviridae** (gênero *Iflavirus*): membros desta família são caracterizados por apresentarem genoma monopartido, que codifica uma única poliproteína. A região inicial é constituída por proteínas que codificam as proteínas capsidiais, já a região final é responsável por codificar as proteínas não estruturais Helicase, Protease e RNA dependente de RNA polimerase (HEL/PRO/POL) **Figura 7**.
- 3- **Marnaviridae** (gênero *Marnavirus*): gênero monotípico que apresenta como espécie - tipo *Heterosigma akashiwo RNA virus* (LANG et al. 2004) e infecta algas.
- 4- **Secoviridae** (subfamília *Comovirinae* gêneros - *Comovirus*, *Fabavirus* e *Nepovirus* e gêneros sem subfamília *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Sequivirus*, *Torradovirus* e *Waikavirus*). Os membros dessa família apresentam genoma monopartido (*Sequivirus* e *Waikavirus*) e bipartido (RNA 1 e RNA 2) **Figura 7**. Todos os membros da família são conhecidos por infectarem plantas.
- 5- **Picornaviridae** (gêneros *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* e *Tremovirus*) (KING et al., 2012). Recentemente novos gêneros foram adicionados dentro dessa família são eles (*Aquamavirus*, *Avisivirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, *Gallivirus*, *Hunnivirus*, *Kunsagivirus*, *Megrivirus*, *Mischivirus*, *Mosavirus*, *Oscivirus*, *Pasivirus*, *Passerivirus*, *Rosavirus*, *Sakobuvirus*, *Salivirus* e *Sicinivirus*) (ICTV, 2014). Os gêneros descritos infectam os seguintes grupos de vertebrados: aves (13), humanos (9), suínos (4), bovinos (2), roedores (2) e equinos (1) entre outros.

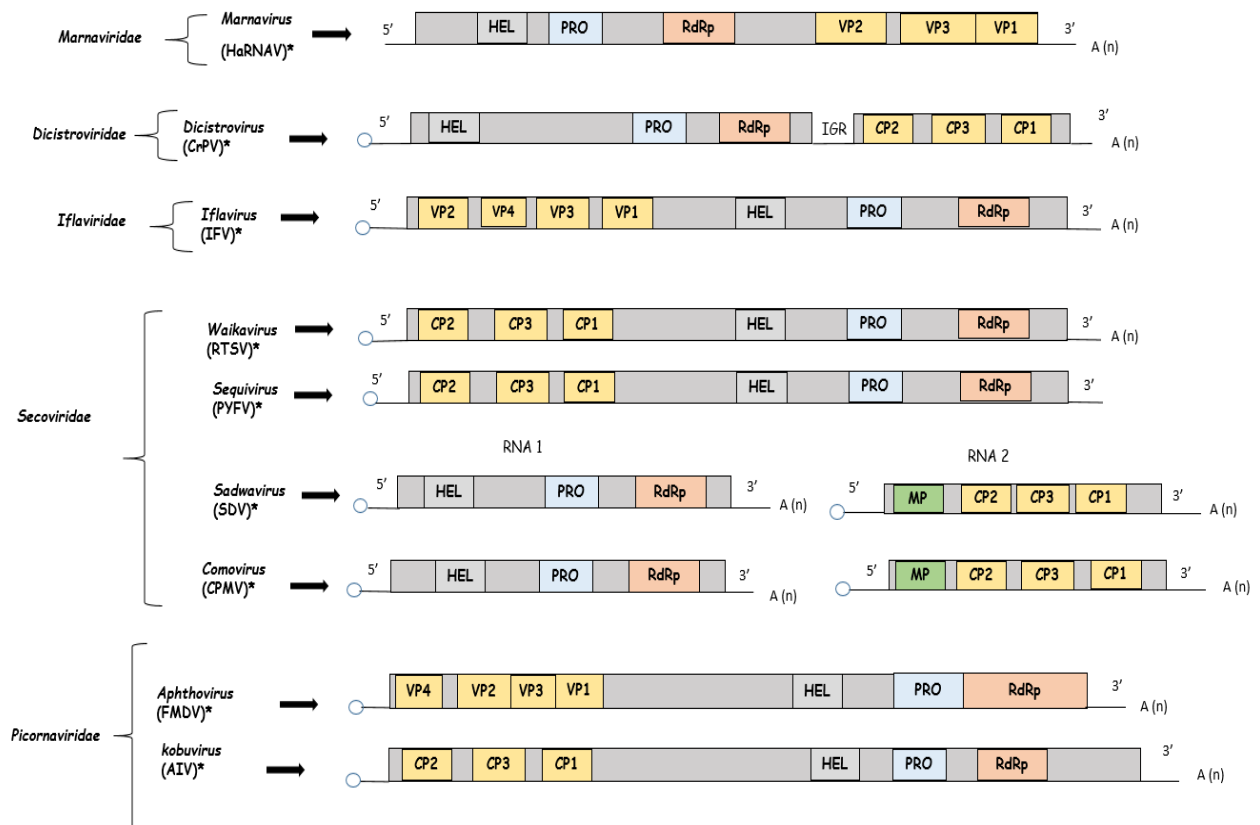


Figura 7. Organização genômica dos membros da ordem *Picornavirales*. Hel - Helicase; Pro - Protease; RdRp - RNA polimerase dependente de RNA. Na extremidade 5' os círculos representam a proteína VPg ligada covalentemente a essa extremidade; MP - proteína de movimento; Os quadrados em laranja representam os domínios para a capa proteica. Na extremidade 3' A (n) - cauda Poli A. HaRNAV - *Heterosigma akashiwo* RNA virus; CrPV - *Cricket paralysis virus*; IFV - *Infectious flacherie virus*; RTSV - *Rice tungro spherical virus*; PYFV - *Parsnip yellow fleck virus*; SDV - *Satsuma dwarf virus*; CPMV - *Cowpea mosaic virus*; FMDV - *Foot-and-mouth disease virus*; AIV - *Aichi virus*. (*) espécie tipo de cada gênero. **Fonte:** GALL et al. (2008) adaptado.

Hovenia dulcis associated virus (HDAV) apresentou 23% de identidade de nucleotídeos com uma espécie viral que infecta arroz: *Rice tungro spherical virus* - RTSV (gênero *Waikavirus*, e família *Secoviridae*). O gênero *Waikavirus* compreende três espécies virais que infectam plantas da família Poaceae (sorgo, trigo, milho, arroz e milheto) e Apiaceae (coentro e cicuta). Todas as espécies de *Waikavirus* são monopartidas com uma única ORF. O espécime estudado possui duas ORFs: **ORF 1:** apresenta 5.685 pb com os domínios helicase, protease e RNA dependente de RNA Polimerase (HEL/PRO/POL) e **ORF 2:** com 2.541pb e apresentando o domínio para a CP conforme representado na **Figura 8.**

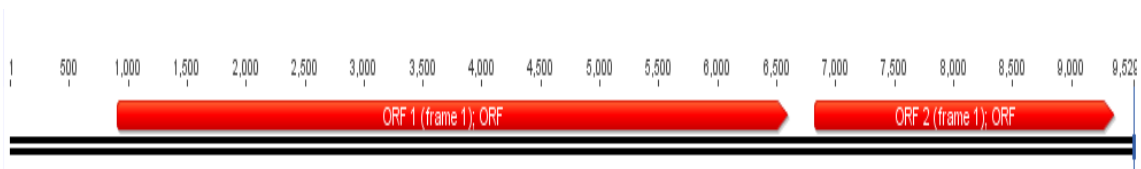


Figura 8. Organização genômica de *Hovenia dulcis* associated virus (HDAV) cuja sequência foi obtida por meio do sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*).

Observou-se ainda uma identidade de aminoácidos de 23% de HDAV com *Cricket paralysis virus* - CrPV (gênero *Cripavirus* e família *Dicistroviridae*). Esta família foi reconhecida por Mayo (2002) e é caracterizada por apresentar espécies com genoma monopartido contendo duas ORFs que codificam duas poliproteínas (**Figura 7**). A primeira está relacionada à replicação viral contendo os seguintes domínios conservados: **HEL/PRO/POL**. A segunda ORF é responsável por codificar a proteína capsidial. Na região 5' as espécies apresentam uma proteína VPg e uma cauda poli A na extremidade 3'.

O genoma apresenta ainda uma estrutura composta de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada IRES localizada entre as duas ORFs, responsável por iniciar o processo de tradução, independente da ação dos fatores de transcrição (JAN; SARNOW, 2002). Nesta família, até o presente foram descritas 15 espécies distribuídas nos gêneros *Aparavirus* e *Cripavirus* (ICTV, 2014). Todas as espécies apresentam em comum insetos (artrópodes) como suas hospedeiras.

O gênero *Aparavirus* é constituído por seis espécies que encontram-se listadas a seguir: *Israeli acute paralysis virus* - IAPV, *Kashmir bee virus* - KBV, *Mud crab virus*, *Solenopsis invicta virus 1* - SINV 1, *Taura syndrome virus* - TSV, sendo a espécie *Acute bee paralysis virus* - ABPV, a espécie tipo desse grupo.

O gênero *Cripavirus* é representado por nove espécies virais: RhPV, *Aphid lethal paralysis virus* - ALPV, *Plautia stali intestine virus* - PSIV, *Black queen cell virus* - BQCV, *Drosophila C virus* - DCV, *Himetobi P virus* - HiPV, *Homalodisca coagulata virus 1* - HoCV-1, *Triatoma virus* - TrV, sendo a espécie tipo desse gênero o vírus CrPV. Maiores detalhes podem ser encontrados na revisões de Booning (2009).

A organização genômica de HDAV se assemelha com a organização genômica de membros de *Dicistroviridae*, entretanto conforme mencionado anteriormente, nesta família, todas as espécies descritas infectam insetos (GORDON, 2006; BONNING, 2009; ICTV, 2014). De acordo com Gildow (1990) existe um único relato de que *Ropalosiphum padi virus*, uma das nove espécies de *Cripavirus*, comumente relatada infectando afídeos foi detectada em *Ropalosiphum padi* apresentando transmissão vertical e horizontal na planta. Neste caso, análises filogenéticas

realizadas comparando sequências de aminoácidos, coloca o RhPV próximo à família *Dicistroviridae* (KING et al., 1987), entretanto análises comparando com as sequências de RdRp colocam este vírus próximo ao gênero *Comovirus* (família *Secoviridae*) (MOON et al., 1998).

Neste caso, postulou-se, inicialmente, a hipótese de que HDAV poderia ser acomodado na família *Dicistroviridae*, próximo a *Cripavirus*, entretanto a identidade de aminoácidos entre eles foi baixa.

Além disso, análises filogenéticas seguindo os critérios para a ordem *Picornavirales*, que incluem comparações entre a **PRO-POL** posicionaram a espécie em estudo no mesmo segmento de origem da família *Picornaviridae* sugerindo um ancestral comum para os membros desta família e a espécie aqui estudada (**Figura 9**).

Nessa figura a maioria dos ramos ficaram bem representados com valor maior de 50% de *bootstrap*, entretanto a árvore foi alinhada a fim de proporcionar melhor visualização e não apresentar informações sobre a quantidade de mudanças genéticas que podem ter ocorrido entre os organismos.

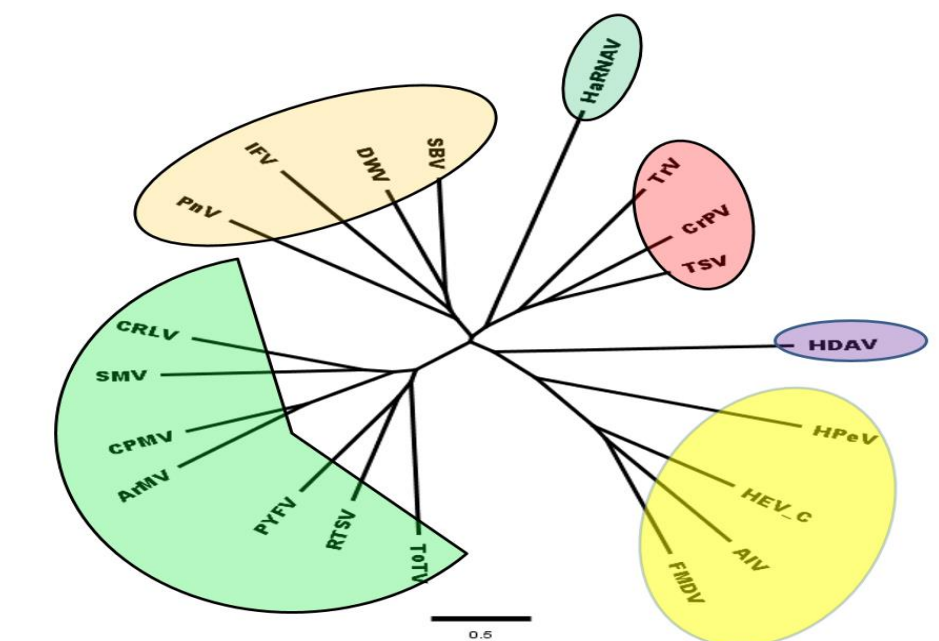


Figura 9. Árvore filogenética, gerada entre os membros da ordem *Picornavirales* e a espécie *Hovenia dulcis* associated virus (HDAV) detectada por NGS (*Next Generation Sequencing*). Para a construção da árvore foi utilizado os domínios (PRO/POL - protease/polimerase), derivada do método de Máxima Verossimilhança implementado no algoritmo Fastree e valor de *bootstrap* com 1000 replicatas. Os ramos em rosa representam: *Dicistroviridae*, em laranja família: *Flaviridae*, em azul família: *Marnaviridae*, em amarelo a família: *Picornaviridae* e em verde família: *Secoviridae*. Os acessos e acrônimos encontram-se na **Tabela 3**.

A espécie aqui relatada compartilha várias características com os membros da ordem *Picornavirales* (vírus de RNA fita simples, senso positivo), incluindo a organização genômica que apresenta uma região conservada com os seguintes domínios HEL/PRO/POL (KING et al., 2012). Possivelmente essa espécie apresenta um sítio catalítico na região 3C protease que mais se aproxima a uma serina que uma cisteína. De acordo com Gall et al. (2008) diferentes famílias na ordem *Picornavirales*, assim como famílias próximas aos picornavirus podem ser separadas de acordo com várias características. Dentre elas podemos citar serina (família Marnaviridae) e os demais representantes da ordem apresentam cisteína. A espécie aqui estudada possui serina e não cisteína (CULLEY et al., 2005), ao contrário dos outros membros desta ordem que apresentam uma cisteína na região da PRO.

A árvore filogenética revelou que a espécie detectada Hovenia dulcis associated virus apresenta características inerentes e que não se agrupa com nenhum gênero dentro da ordem *Picornavirales* e que, possivelmente, esta espécie (HDAV) esteja utilizando as plantas como possível hospedeira. Desta forma, fica claro que este trabalho mostra a necessidade de obter mais informações sobre essa nova espécie.

3.3 Detecção de Hovenia dulcis associated virus (HDAV) nas espécies arbóreas coletadas no viveiro II Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP)

O ácido nucleico (RNA total) foi extraído individualmente de todas as amostras. *Primers* específicos (HDAVF e HDAVR) foram sintetizados e realizou-se RT-PCR para cada uma das 60 amostras, para três amostras de três espécies botânicas distintas (bolsa de pastor - *Zeyheria tuberculosa*, pau santo - *Kielmeyera variabilis* e uva do Pará - *Hovenia dulcis* houve amplificação de fragmento de 803 pb (**Figura 10A**), entretanto após clivagem com BgIII, apenas a amostra uva do Pará mostrou os fragmentos de 500 e 300 pb como resultado da digestão (**Figura 10B**).

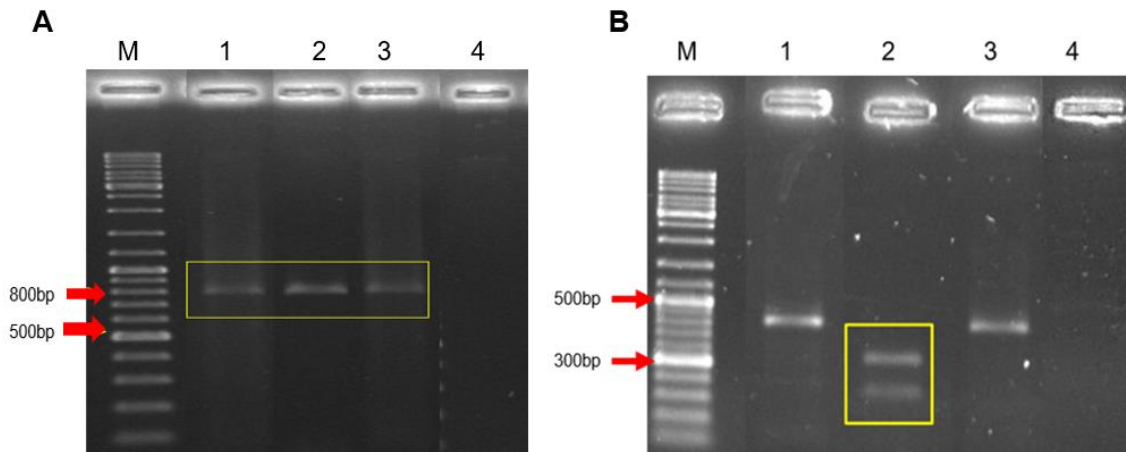


Figura 10 A-B. Resultado da RT- PCR para HDAV. Amostra positiva para *Hovenia dulcis* associated virus (HDAV). A - Gel de agarose a 1% após RT-PCR usando os primers HDAVF e HDAVR. (amplicón de 803 pares de base - pb) e B. Gel de agarose a 1% para verificar a digestão do amplicón de 803 pb com a enzima BgIII. Amostra 1. Uva do Pará (*Hovenia dulcis*), 2. Bolsa de Pastor - *Zeyheria tuberculosa* e 3. Pau Santo - *Kielmeyera variabilis*; 4. Controle negativo. M: marcador 1 kb Ladder (Thermo Scientific).

3.4 Confirmação da clonagem do amplicón proveniente da RT- PCR de *Hovenia dulcis* associated virus em pGEM-T Easy

A clonagem do pGEM-T Easy- HDAV 803 foi confirmada em gel de agarose a 1% (**Figura 11A**) mediante digestão com Eco RI. Uma digestão com BgIII também foi realizada após PCR com primers para HDAV visando confirmar o clone **Figura 11B**.

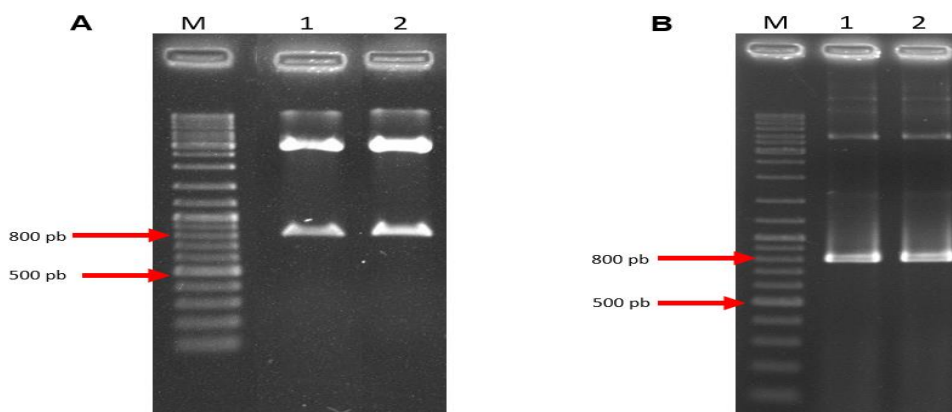


Figura 11A-B. Confirmação do clone pGEM-T Easy- HDAV 803. A. Gel de agarose a 1% com digestão com EcoRI para confirmar a clonagem do amplicón de 803 pb em vetor pGEM-T Easy. B. Fragmento obtidos após PCR usando primers para *Hovenia dulcis* associated virus - HDAV (M: marcador 1 kb Ladder (Thermo Scientific). Amostras: 1 e 2 Uva do Pará (*Hovenia dulcis*).

Após o sequenciamento Sanger das amostras que foram clonadas, observou-se que os fragmentos foram alinhados com a sequência da ORF 2 do HDAV (**Figura 12**). Esse resultado confirma a presença do HDAV em uva do Pará, visto que, a região utilizada para a clonagem apresentava um fragmento da sequência gerada por NGS. Esforços serão concentrados para a produção de clone infeccioso desta espécie viral visando determinar suas hospedeiras.

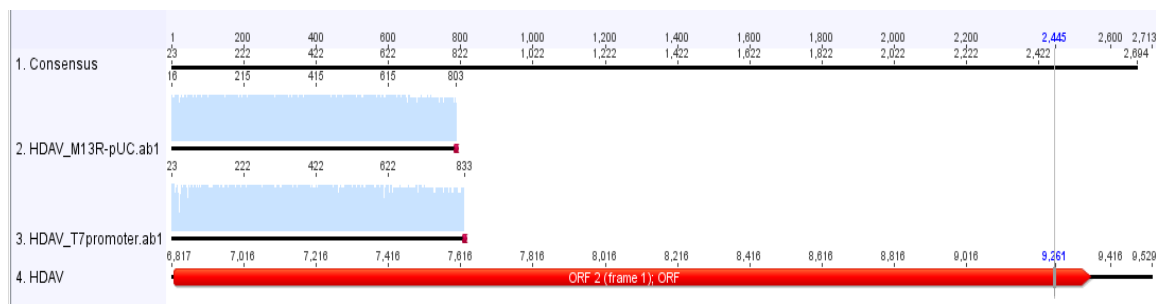


Figura 12. Alinhamento dos fragmentos oriundos do sequenciamento Sanger com a sequência do HDAV proveniente do NGS (*Next Generation Sequencing*).

3.5 RCA (*Rolling Circle Amplification*) e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para testes de detecção de espécies virais de DNA.

A RCA realizada em todas as amostras coletadas que foram utilizadas nesse estudo mostrou a presença de DNA circular, como mostra a **Figura 13**, que está representada apenas por seis das sessenta amostras. Com essa técnica é possível aumentar a concentração de DNA circular presente nestas amostras, tornando a PCR mais sensível para a detecção de espécies virais que apresentam genoma circular, como espécies de *Begomovirus* (Família *Geminiviridae*), *Babuvirus* (MANSOOR, et al., 2005) e *Nanovirus* (família *Nanoviridae*) (GRIGORAS et al., 2010).

Nesse estudo não houve reação positiva na PCR quando utilizou-se *primers* para a detecção de *Begomovirus* realizada nas amostras coletadas. No entanto o produto de cada reação de RCA foi submetido a ação da enzima de digestão MSPI para verificação de padrão de fragmentos. Cinco tipos de padrões foram observados com tamanhos variando entre 1,7 kb e 2,6 kb o que pode corresponder a genomas de membros da família *Geminiviridae*.

Os resultados até aqui obtidos mostram a necessidade de mais estudos para detectar outras espécies virais com genoma de DNA circular, por isso, amostras de RCA foram unificadas formando um único *pool* e serão enviadas para sequenciamento Illumina Hiseq futuramente.

Conclusões Gerais

- Em uva do Pará (*Hovenia dulcis*) foi detectada uma possível espécie nova denominada inicialmente *Hovenia dulcis associated virus* - HDAV, para a qual se propõe uma nova família dentro da ordem *Picornavirales*.
- As espécies *Cowpea mild mottle virus* - CPMMV (gênero *Carlavirus* e família *Betaflexiviridae*), *Eupatorium vein clearing virus* e *Strawberry vein banding virus* - SVBV (gênero *Caulimovirus* e família *Caulimoviridae*), *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (gênero *Comovirus* e família *Secoviridae*), *Broad bean wilt virus* - BBWV e *Mikania micrantha mosaic virus* - MMMV (gênero *Fabavirus* e família *Secoviridae*) também foram detectadas.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, I. P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W. A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 537-545, 2009.
- ADAMS, I. P.; MIANO, D. W.; KINYUA, Z. M.; WANGAI, A.; KIMANI, E.; PHIRI, N.; REEDER, R.; HARJU, V.; Glover, R.; Hany, U. Use of next generation sequencing for the identification and characterization of *Maize chlorotic mottle virus* and *Sugarcane mosaic virus* causing lethal necrosis in Kenya. **Plant Pathology**, v.10, p. 1365-3059, 2012.
- AL RWAHNIH, M.; DAUBERT S.; GOLINO D.; ROWHANI A: Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. **Virology**, v. 387, p. 395-401, 2009.
- AL RWAHNIH, M.; DAUBERT, S.; U'RBEZ-TORRES, J. R.; CORDERO, F.; ROWHANI, A. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. **Archives of Virology**, v. 156, p. 397-403, 2011.
- AL RWAHNIH, M.; DAVE, A.; ANDERSON, M.; UYEMOTO, J.K.; SUDARSHANA, M.R. Association of a circular DNA virus in grapevine affected by red blotch disease in California. In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA, 2012.
- AL RWAHNIH, M.; SUDARSHANA, M.R.; UYEMOTO, J.K.; ROWHANI, A. Complete genome sequence of a novel *Vitivirus* isolated from grapevine. In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA, 2012.
- ALABI, O. J.; ZHENG, Y.; JAGADEESWARAN, G.; SUNKAR, R.; NAIDU, R. High-throughput sequence analysis of small RNAs in grapevine (*Vitis. vinifera* L.) affected by grapevine leafroll disease. In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA, 2012.
- ALTSCHUL, S. F; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W; LIPMAND, J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AREGGER, M.; BORAH, B. K.; SEGUIN, J.; RAJESWARAN, R.; GUBAEVA, E. G.; ZVEREVA, A. S.; WINDELS, D.; VAZQUEZ, D.; BLEVINS, T.; FARINELLI, L. Primary and secondary siRNAs in *Geminivirus*-induced gene silencing. **PLOS Pathogens**, v. 8, 2012.

- BARANWAL, V. K.; JAIN, P.; SARITHA, R. K.; JAIN, R. K.; GAUTAM, N. K. Detection and partial characterization of *Cowpea mild mottle virus* in mungbean and urdbean by deep sequencing and RT-PCR. **Crop Protection**, v. 75, p. 77-79, 2015.
- BLEVINS, T.; RAJESWARAN, R.; AREGGER, M.; BORAH, B. K.; SCHEPETILNIKOV, M.; BAERLOCHER, L.; FARINELLI, L.; MEINS, F. JR.; HOHN, T.; POOGGIN, M. M. Massive production of small RNAs from a non-coding region of *Cauliflower mosaic virus* in plant defense and viral counter-defense. **Nucleic Acids Research**, 2011.
- BOITEUX, L. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p. 32-38, 1999.
- BONNING, B. C. The *Dicistroviridae*: an emerging family of invertebrate viruses. **Virologica Sinica**, v. 24, p. 415-27, 2009.
- BONNING, B. C.; MILLER, W. A. Dicistroviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 129-50, 2010.
- BORAH, B. K.; SCHEPETILNIKOV, M.; BAERLOCHER, L.; FARINELLI, L.; MEINS, F., JR.; HOHN, T.; POOGGIN, M. M. Massive production of small RNAs from a non-coding region of *Cauliflower mosaic virus* in plant defense and viral counter-defense. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 5003-5014, 2011.
- BREITBART, M.; HEWSON, I.; FELTS, B.; MAHAFFY, J. M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; ROHWER, F. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* 185:6220-6223. First application of the metagenomic approach to study viral communities in human feces, spearheading the virus discovery effort on clinical samples. Most sequences were unrelated to previously documented taxa in Genbank, 2003.
- BREITBART, M.; ROHWER, F. Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. **Biotechniques**, v.39, p. 729-736, 2005.
- BREITBART, M.; SALAMON, P.; ANDRESEN, B.; MAHAFFY, J. M.; SEGALL, A. M.; MEAD, D.; AZAM, F.; ROHWER, F. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U S A, v. 99, p. 14250-14255. 2002.
- BREITBART, M.; FELTS B.; KELLEY S.; MAHAFFY J.; NULTON J. Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. *Proc. R. Soc* **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 27, p. 565-574, 2004.

- BREITBART, M.; HEWSON, I.; FELTS, B.; MAHAFFY, J. M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; ROHWER, F. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* 2003, 185:6220-6223. First application of the metagenomic approach to study viral communities in human feces, spearheading the virus discovery effort on clinical samples. Most sequences were unrelated to previously documented taxa in Genbank, 2003.
- CANDRESSE, T.; MARAIS, A.; FAURE, C.; CARRIERE, S.; GENTIT, P. Use of 454 pyrosequencing for the fast and efficient characterization of known or novel viral agents in *Prunus* materials. In Proceedings of the 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible. **Diseases of Fruit Crops**, Rome, Italy, 3-8 June, 2012.
- CANDRESSE, T.; MARAIS, A.; FAURE, C.; GENTIT, P. Association of *Little cherry virus 1* (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. **Phytopathology**, v. 103, p. 293-308, 2013.
- CHIUMENTI, M.; GIAMPETRUZZI, A.; PIROLO, C.; MORELLI, M.; SILDARELLI, P.; MINAFRA, A.; BOTTALICO, G.; LA NOTTE, P.; CAMPANALE, A.; SAVINO, V. Approaches of next generation sequencing to investigate grapevine diseases of unknown etiology. In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA, 7-14 October, 2012.
- CHIUMENTI, M.; ROBERTO, R.; BOTTALICO, G.; CAMPANALE, A.; DE STRADIS, A.; MINAFRA, A.; BOSCIA, D.; SAVINO, V.; MARTELLI, G.P. Virus sanitation and deep sequence analysis of fig. In Proceedings of the 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, Italy, 3-8 June, 2012.
- COETZEE, B.; FREEBOROUGH, M.J.; MAREE, H.J.; CELTON, J.M.; REES, D.J.; BURGER, J.T. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. **Virology**, v. 400, p. 157-163, 2010.
- CONTALDO, N.; CANEL, A.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A.; NICOLAISEN, M. Phytoplasma detection and identification in grapevine by deep amplicon sequencing. In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA, 7-14 October, 2012.
- COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, p. 283-287, 2007.
- CULLEY, A. I.; LANG, A. S.; SUTTLE, C. A. *Marnaviridae*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANIHOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Virus taxonomy, VIII th report of the ICTV. **Elsevier/Academic Press**, London, p. 789-792, 2005.

- CZIBENER, C.; LA TORRE, J. L.; MUSCIO, O. A.; UGALDE, R. A.; SCODELLE, E. A. Nucleotide sequence analysis of *Triatoma virus* shows that it is a member of a novel group of insect RNA viroses. Printed in Great Britain. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1149-1154, 2000.
- DESNUES, C.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; RAYHAWK, S.; KELLEY, S.; TRAN, T.; FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M.; EDWARDS, R. A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7059-7066, 2007.
- DI SERIO, F.; GISEL, A.; NAVARRO, B.; DELGADO, S.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.-E.; DONVITO, G.; FLORES, R. Deep sequencing of the small RNAs derived from two symptomatic variants of a chloroplastic viroid: Implications, for their genesis and for pathogenesis. **PLoS One**, v. 4, p. 7539, 2009.
- DI SERIO, F.; MARTÍNEZ DE ALBA, A. E.; NAVARRO, B. A.; GISEL, A.; FLORES, R. RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. **Journal of Virology**, v. 84, p. 2477-2489, 2010.
- DOMBROVSKY, A.; GLANZ, E.; SAPKOTA, R.; LACHMAN, O.; BRONSTEIN, M.; SCHNITZER, T.; ANTIGNUS, Y. Next-generation sequencing a rapid and reliable method to obtain sequence data of the genomes of undescribed plant viruses. In Proceedings of the BARD-Sponsored Workshop-Microarrays and Next-Generation Sequencing for Detection and Identification of Plant Viruses, Beltsville, MD, USA, 17-19 November 2011.
- DONAIRE, L.; WANG, Y.; GONZALES-IBEAS, D.; MAYER, K. F.; ARANDA, M. A.; LIAVE, C.; DEEP DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D. G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; EHYA, F.; MONAVARFESHANI, A.; FARD, E. M.; FARSAF, L. K.; NEKOU EI, M. K.; MARDI, M.; SALEKDEH, G. H. Phytoplasmal-responsive microRNAs modulate hormonal, nutritional, and stress signalling pathways in Mexican lime trees. **PLoS One**, v. 8, p. 6372, 2013.
- DONAIRE, L.; WANG, Y.; GONZALES-IBEAS, D.; MAYER, K. F.; ARANDA, M. A.; LIAVE, C. Deep sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. **Virology**, v. 392, p. 203-214, 2009.
- DULLEMANS, A. M.; VERHOEVEN, J. TH. J.; KORMELINK, R.; VAN DER VLUGT, R. A. A. The complete nucleotide sequence of chrysanthemum stem necrosis virus. **Archives of Virology**, v. 160, p. 605-608, 2015.

- FABRE, F.; MONTARRY, J.; COVILLE, J.; SENOUSI, R.; SIMON, V.; MURRY, B. Modelling the evolutionary dynamics of viruses within their hosts: A case study using high-throughput sequencing. **PLOS Pathogens**, v. 8, 2012.
- FARIAS, P. C. **Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus* e estudos de caracterização de vírus em *Mimosa caesalpinifolia***. (Monografia de graduação). Universidade de Brasília. Brasília, 2012.
- FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M.; EDWARDS, R. A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7059-7066, 2007.
- FINKBEINER, S. R.; ALLRED, A. F.; TARR, P. I.; KLEIN, E. J.; KIRKWOOD, C. D.,. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. **PLOS Pathogens**, v. 4, 2008.
- GALL, O. LE; CHRISTIAN, P.; FAUQUET, C. M.; KING, A. M. Q.; KNOWLES, N. J.; NAKASHIMA, N.; STANWAY, G. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. . **Archives of Virology**, v. 153, p. 715-727, 2008.
- GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Report**, v. 22, p. 437-437, 2004.
- GENEIOUS. <http://www.geneious.com>. Acessado em:15 fevereiro de 2015.
- GIAMPETRUZZI, A.; ROUMI, V.; ROBERTO, R.; MALOSSINI, U.; YOSHIKAWA, N.; LA NOTTE, P.; TERLIZZI, F.; CREDI, R.; SILDARELLI, P. A new *grapevine virus* discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small small RNAs in CvPinot gris. **Virus Research**, v. 163, p. 262-268, 2012.
- GHOSH, R. C.; BALL, T B.V.; WILLCOCKSL, Z M. M.; CARTERL, M. J. The nucleotide sequence of *sacbrood virus* of the honey bee: an insect picorna-like vírus. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1541-1549 1999.
- GILDOW, F. E.; D'ARCY, C. J. Cytopathology and experimental host range of *Rhopalosiphum padi virus*, a small isometric RNA virus infecting cereal grain aphids. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 245-257, 1990.
- GORDON, K. H. J.; WATERHOUSE, P. M. Small RNA viruses of insects: expression in plants and RNA silencing. **Advances in Virus Research**, v. 68, p. 459-502, 2006.

- GRIGORAS, I.; VETTEN, H. J.; SULTANOVA, N. F.; WINTER, S.; HUSEYNOVA, I. M.; MAMEDOV, A. C. H.; KHEYR-POUR, A.; GRONENBORN, B. Single-stranded DNA Plant Viruses in Azerbaijan, the State of the Art. Proceedings of ANAS. **Biological Sciences**, v. 65, p. 152-157, 2010.
- HAGEN, C.; FRIZZI, A.; KAO, J.; JIA, L.; HUANG, M.; ZHANG, Y.; HUANG, S. Using small RNA sequences to diagnose, sequence, and investigate the infectivity characteristics of vegetable-infecting viruses. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1209-1216, 2011.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, p. 245-249. 1998.
- HANY, U.; ADAMS, I. P.; GLOVER, R.; BHAT, A. I.; BOONHAM, N. The complete nucleotide sequence of *Piper yellow mottle virus* (PYMoV). **Archives of Virology**, v. 158, p. 1824-2, 2013.
- HAYNES, M.; LIU, H.; FURLAN, M.; WEGLEY, L.; CHAU, B. Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites. **Nature**, v. 452, p. 340-343, 2008.
- HELIXXA, Helixxa bases for life. Disponível em: <http://www.helixxa.com.br/index.php>, 2014. Acesso em 02 de março de 2016.
- HU, Q.; HOLLUNDER, J.; NIEHL, A.; KORNER, C. J.; GEREIGE, D.; WINDELS, D.; ARNOLD, A.; KUIPER, M.; VASQUEZ, F. F.; POOGGIN, M. Specific impact of *Tobamavirus* infection on the *Arabidopsis* small RNA profile. **PLoS One**, v. 6, 2011.
- IDRIS, A.; AL-SALEH, M.; PIATEK, M. J.; AL-SHAHWAN, I.; ALI, S.; BROWN, J. K. Viral Metagenomics: Analysis of Begomoviruses by Illumina High-Throughput Sequencing. **Viruses**, v. 6, p. 1219-1236, 2014.
- ILLUMINA. Solexa Sequencing Technology. Disponível em: http://www.illumina.com/technology/solexa._technology.ilmn.illumina, PD. Guia do usuário do sistema MiSeq®, (2013).
- INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA, T. A. Simple method for cloning the complete *Begomovirus* genome using the bacteriophage phi29 DNA Polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 116, p. 209-211, 2004.
- ISAWA, H.; ASANO, S.; SAHARA, K.; IIZUKA, T.; BANDO, H. Analysis of genetic information of an insect picorna-like virus, *Infectious flacherie virus* of silkworm: evidence for evolutionary relationships among insect, mammalian and plant picorna (-like) viruses JOURNAL. **Archives of Virology**, v. 143, p. 127-143, 1998.

- JAN, E.; SARNOW, P. Factorless Ribosome Assembly on the Internal Ribosome Entry Site of *Cricket paralysis virus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 324, p.889-902, 2002.
- JOHANSSON, S.; NIKLASSON, B.; MAIZEL, J.; GORBALENYA, A. E.; LINDBERG, A. M. Molecular Analysis of Three L jungan Virus Isolates Reveals a New, Close-to-Root Lineage of the *Picornaviridae* with a Cluster of Two Unrelated 2A Proteins . **Journal of Virology**, v. 76, p. 8920-8930, 2002.
- JONES, M. S.; KAPOOR, A.; LUKASHOV, V. V.; SIMMONDS P.; HECHT F.; DELWART E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. **Journal of Virology**, v. 79, p. 8230-8236, 2005.
- KAFASLA, P.; MORGNER, N.; ROBINSON, C. V.; JACKSON, R. J. Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. **The EMBO Journal**, v. 29, p. 3710-3722, 2010.
- KASHIF, M.; PIETILA, S.; ARTOLA, K.; TUGUME, A. K.; MAKINEN, V.; VALKONEN, J.P.T. Detection of viruses in sweetpotato from Honduras and Guatemala augmented by deep-sequencing of small-RNAs. **Plant Disease**, v. 96, p. 1430-1437, 2012.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics applications note**, v. 28, p. 1647-1649, 2012.
- KEHOE, M. A.; COUTTS, B. A.; BUIRCHELL, B. J.; JONES, R. A. C. Plant Virology and Next Generation Sequencing: Experiences with a *Potyvirus*. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.
- KING, A.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, San Diego, California, p. 835-899, 2012.
- KING, L. A.; PULLIN, J. S. K.; STANWAY, G.; ALMOND, J. W.; MOORE, N.F. Cloning of the genome of *Cricket paralysis virus*: Sequence of the 39 end. **Virus Research**, v. 6, p. 331-344, 1987.
- KREUZE, J. F.; PEREZ, A.; UNTIVEROS, M.; QUISPE, D.; FUENTES, S.; BARKER, I.; SIMON, R. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. **Virology**, v. 388, p. 1-7, 2009.

- LANG, A. S.; CULLEY, A. I.; SUTTLE, C. A. Genome sequence and characterization of a virus (HaRNAV) related to picorna-like viruses that infects the marine toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*, **Virology**, v. 320, p. 206-217, 2004.
- LANZI, G.; DE MIRANDA, J. R.; BONIOTTI, M. B.; CAMERON, C. E.; LAVAZZA, A.; CAPUCCI, L.; ROSSI, C. Molecular and Biological Characterization of *Deformed wing virus* of Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Virology**, v.80, p. 4998-5009, 2006.
- LEE, C.; CHIU, Y.; WANG, L., KUO, Y.; CHUANG, E.; LAI, L.; TSAI, M. Common applications of next-generation sequencing technologies in genomic research. **Translational Cancer Research**, 2013.
- LI, R.; GAO, S.; HERNANDEZ, A. G.; WECHTER, W. P.; FEI, Z.; LING, K. S. Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation. **PLoS One**, v.7, 2012.
- LIN, K. Y.; CHENG, C. P.; CHANG, B. C. H.; WANG, W. C.; HUANG, Y. W.; LEE, Y. S.; HUANG, H. D.; HSU, Y. H.; LIN, N. S. Global analysis of small interfering RNAs derived from *Bamboo mosaic virus* and its associated satellite RNAs in different plants. **PLoS One**, v. 5, 2010.
- LOCONSOLE, G.; ONELGE, N.; POTERE, O.; GIAMPETRUZZI, A.; BOZAN, O.; SATAR, S.; DE STRADIS, A.; SAVINO, V.; YOKOMI, R.K.; SAPONARI, M. Identification and characterization of *Citrus Yellow vein clearing virus*, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. **Phytopathology**, v.102, p. 1168-1175, 2012.
- LOCONSOLE, G; SALDARELLI, P; DODDAPANENI, H; SAVINO, V; MARTELLI, GP; SAPONARI, M. Identification of a single-stranded DNA virus associated with *Citrus chlorotic dwarf* disease, a new member in the family *Geminiviridae*. **Virology**, v. 432, p. 162-172, 2012.
- LOMONOSSOFF, G. P.; SHANKS, M. The nucleotide sequence of *Cowpea mosaic virus* B RNA. **The EMBO Journal**, v. 2, p. 2253-2258, 1983.
- LU, J.; DU, Z. X.; KONG, J.; CHEN, L. N.; QIU, Y. H.; LI, G. F.; MENG, X. H.; ZHU, S. F. MAREE, H. J.; NEL, Y.; VISSER, M.; COETZEC, B.; MANICOM, B.; BURGER, J. T.; REES, D. J. G. The study of plant virus disease etiology using next-generation sequencing technologies. In Proceedings of the 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, Italy, 3-8 June; 2012.

- LU, J.; DU, Z. X.; KONG, J.; CHEN, L. N.; QIU, Y. H.; LI, G. F.; MENG, X. H.; ZHU, S. F. Transcriptome analysis of *Nicotiana tabacum* infected by *Cucumber mosaic virus* during systemic symptom development. **PLoS One**, v. 7, 2012.
- MARHAVER K. L.; EDWARDS R. A.; ROHWER, F. Viral communities associated with healthy and bleaching corals. **Environmental Microbiology**, v.10, p. 2277-2286, 2008.
- MARHAVER, K. L.; EDWARDS, R. A.; ROHWER, F: Viral communities associated with healthy and bleaching corals. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2277-2286, 2008.
- MARI, J.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V.; BONAMI, J. R. Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 915-926, 2002.
- MARTINEZ, G.; DONAIRE, L.; LLAVE, C.; PALLAS, V.; GOMEZ, G. High-throughput sequencing of Hop stunt viroid-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, p. 347-359, 2010.
- MAYO, M. A. Virus taxonomy - Houston. **Archives of Virology** , v. 147, p. 1071-1076, 2002.
- MOKILI, J. L.; ROHWER, F.; DUTILH, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 63-77, 2012.
- MONGER, W. A.; ALICAI, T.; NDUNGURU, J.; KINYUA, Z. M.; POTTS, M.; REEDER, R. H.; MIANO, D. W.; ADAMS, I. P.; BOONHAM, N.; GLOVER, R. H. The complete genome sequence of the Tanzanian strain of *Cassava brown streak virus* and comparison with the Ugandan strain sequence. **Archives of Virology**, v.155, p. 429-433, 2010.
- MOON, J. S. L. L.; DOMIER, N. K; MCCOPPIN, C. J.; D'ARCY, H. Nucleotide sequence analysis shows that *Rhopalosiphum padi virus* is a member of a novel group of insect-infecting RNA viruses. **Virology**, v. 243, p. 54 - 65, 1998.
- MORELLI, M.; CHIUMENTI, M.; DE STRADIS, A.; LA NOTTE, P.; MINAFRA, A. Discovery and molecular characterization of a new *Cryptovirus* dsRNA genome from Japanese persimmon through conventional cloning and high-throughput sequencing. **Virus Genes**, v. 50, p. 160-164, 2015.
- MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, p. 255-264. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.07.001> (2008).
- MUMFORD, R.; ADAMS, I. P.; GLOVER, R.; HANY, U.; BOONHAM, N. From high throughput to high output clondiag microarrays and 454 sequence for viral detection and discovery.

In Proceedings of the ARD-Sponsored Workshop-Microarrays and Next-Generation Sequencing for Detection and Identification of Plant Viruses, Beltsville, MD, USA, 17-19 November, 2011.

NAVARRO, B.; PANTALEO, V.; GISEL, A.; MOXON, S.; DALMAY, T.; BISTRAY, G.; DI SERIO, F.; BURGYN, J. Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insight on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. **PLoS One**, v. 4, 2009.

NG, T. F. F.; DUFFY, S.; POLSTON, J. E.; BIXBY, E.; VALLAD, G. E.; BREITBART, M. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. **PLoS One**, v. 6, 2011.

NICOLAISEN, M.; CONTALDO, N.; MAKAROVA, O.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A. Deep amplicon sequencing reveals mixed phytoplasma infection within single grapevine plants. **Bulletin of Insectology**, v. 64, p. 35-36, 2011.

PALLET, D. W.; HO, T.; COOPER, I.; WANG, H. Detection of *Cereal yellow dwarf virus* using small interfering RNAs and enhanced infection rate with Cocks foot streak virus in wild cocks foot grass (*Dactylis glomerata*). **Journal of Virological Methods**, v.168, p. 223-227, 2010.

PALMANO, S.; SACCARDO, F.; MARTINI, M.; ERMACORA, P.; SCORTICHINI, M.; ABBÀ, S.; MARZACHÌ, C.; LOI, N.; FIRRAO, G. Insights into phytoplasma biology through next generation sequencing. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 50-51, 2012.

PANTALEO, V.; SALDARELLI, P.; MIOZZI, L.; GIAMPETRUZZI, A.; GISEL, A.; MOXON, S.; DALMAY, T.; BISTRAY, G.; BURGYN, J. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot noir grapevine. **Virology**, v. 408, p. 49-56, 2010.

POOJARI, S.; ALABI, O. J.; FOFANOV, V. Y.; NAIDU, R. A. A leafhopper-transmissible DNA virus with novel evolutionary lineage in the family *Geminiviridae* implicated in grapevine redleaf disease by next-Generation sequencing. **PLoS One**, v. 8, 2013.

PRABHA, K.; BARANWAL, V. K.; JAIN, R. K. Applications of next generation high throughput sequencing technologies in characterization, discovery and molecular interaction of plant viruses. **Indian Journal of Virology**, v.24, p. 157-165, 2013.

PRADHANA, B.; NAQVIB, A. R.; SARAFB. S.; MUKHERJEEB, S. K.; DEYA, N. Prediction and characterization of Tomato leaf curl new delhi virus (ToLCNDV) responsive novel microRNAs in *Solanum lycopersicum*. **Virus Research**, v. 195, p. 183-195, 2015.

- PETRZIK, K.; KOLONIUK, I.; PRIBYLOVÁ, J.; PAK, J. S. Complete genome sequence of currant latent virus (genus *Cheravirus*, Family *Secoviridae*). **Archives of Virology**, v. 161, p. 491-493, 2016.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. Computing Large Minimum-Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, p. 1641-1650, 2009
- QI, X.; BAO, F. S.; XIE, Z. Small RNA deep sequencing reveals role *Arabidopsis thaliana* for RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. **PLoS One**, v.4, 2009.
- QUITO-AVILA, D. F.; JELKMANN, W.; TZANETAKIS, I.; KELLER, K.; MARTIN, R. Complete sequence and genetic characterization of *Raspberry latent virus*, a novel member of the family *Reoviridae*. **Virus Research at Science Direct**, v.155, p. 397-405, 2011.
- RAJESWARAN, R.; AREGGER, M.; ZVEREVA, A. S.; BORAH, B. K.; GUBAEVA, E. G.; POOGGIN, M. M. Sequencing of RDR6-dependent double-stranded RNAs reveals novel features of plant siRNA biogenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 6241-6254, 2012.
- REINGANUM, C., O'LOUGHLIN, G. T. AND HOGAN, T. W. A nonoccluded virus of Theoccatons of *Dina oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera: Gryllidae) **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 16, p. 214-220, 1970.
- ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Exploiting links in the plants armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review Phytopathology** 43:361–394, 2005.
- ROOSSINCK, M. J.; SAHA, P.; WILEY, G. B.; QUAN, J.; WHITE, J. D.; LAI, H.; CHAVARRIA, F.; SHEN, G.; ROE, B. A. Ecogenomics: Using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 81-88, 2010.
- ROSARIO, K; BREITBART, M. Exploring the viral world through metagenomics. **Current Opinion in Virology**, v. 1, p. 289-297, 2011.
- ROY, A.; CHOUDHARY, N.; GUILLERMO, L. M.; SHAO, J.; GOVINDARAJULU, A.; ACHOR, D.; WEI, G.; PICTON, D. D.; LEVY, L.; NAKHLA, M. K. A novel virus of the Genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis. **Phytopathology**, v. 103, p. 488-500, 2013.
- RUIZ-RUIZ, S.; NAVARRO, B.; GISEL, A.; PENA, L.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; DI SERIO, F.; FLORES, R. *Citrus tristeza virus* infection induces the accumulation of viral small RNAs (21–24 nt) mapping preferentially at the terminal region 3'- of the genomic RNA

- and affects the host small RNA profile. **Plant Molecular Biology**, v.75, p. 607-619, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 3, 1989.
- MANSOOR, S.; QAZI, J.; AMIN, I.; KHATRI, A.; KHAN, I. A.; RAZA, S.; ZAFAR, Y.; BRIDDON, R. W. A PCR-based method, with internal control, for the detection of Banana bunchy top virus in banana. Hints And Tips. **Molecular Biotechnology**, v. 30, p. 167-169, 2005.
- SHEN, P.; KANIEWSKA, M.; SMITH, C.; BEACHY, R.N. Nucleotide Sequence and Genomic Organization of Rice Tungro Spherical Virus, *Virology*, Volume 193, Issue 2, 1993, Pages 621-630, 1993.
- SILVA, K. N DA, **Caracterização molecular de Johnsongrass mosaic virus em plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*** (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília, 2015.
- SILVA, T. F.; ROMANEL, E. A. C.; ANDRADE, R. R. S.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; DELUEN, C.; CORREA, R. L.; SCHRAGO, C. E. G.; VASLIN, M. F. S. Profile of small interfering RNA a from cotton plants infected with the *Polerovirus Cotton leafroll dwarf virus*. **BMC Molecular Biology**, v. 12, p. 1471-2199, 2011.
- SNYMAN, M. C.; SOLOFOHARIVELO, M. C.; VAN DER WALT, A.; STEPHAN, D.; MURRAY, S.; BURGER, J. T. Deep sequencing analysis reveals modulated gene expression in response to aster yellow phytoplasma infection in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA, 7-14 October 2012.
- SU, X.; FU, S.; QIAN, Y.; XU, Y.; ZHOU, X. Identification of *Hop stunt viroid* infecting *Citrus limon* in China using small RNAs deep sequencing approach. **Virology Journal**, v. 12, p.103, 2015.
- SZITTYA, G.; MOXON, S.; PANTALEO, V.; TOTH, G.; RUSHOLME, P. R. L.; MOULTON, V.; BURGYN, J.; DALMAY, T. Structural and functional analysis of viral siRNAs. **PLOS Pathogens**, v.6, 2010.
- THEKKE-VEETIL, T.; SABANADZOVIC, S.; KELLER, K.E.; MARTIN, R.R.; TZANETAKIS, I.E. Genomeorganization and sequence diversity of a novel blackberry *Ampelovirus*. In Proceedings of the 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, Italy, 3-8 June 2012. v. 191, 2012.

- THOMPSON, J. R.; LEONE, G.; LINDNER, J. L.; JELKMANN, W.; SCHOEN, C. D. Characterization and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 229-239, 2002.
- THOMPSON, J. R.; PERRY, K. L.; JONG, W. DE. A new potato virus in a new lineage of picorna-like viruses. **Archives of Virology**, v. 149, 2141-2154, 2004.
- TURNBULL-ROSS, A. D.; MAYO, M. A.; REAVY, B.; MURANT, A. F. Sequence analysis of the parsnip yellow fleck virus polyprotein: evidence of affinities with picornaviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 555-561, 1993.
- VERBEEK, M.; DULLEMANS, A. M.; VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M.; MARIS, P. C.; VAN DER VLUGT, R. A. A. Identification and characterisation of *Tomato torrado virus*, a new plant picorna-like virus from tomato. **Archives of Virology**, v. 152, p. 881-890, 2007.
- VERWOERD, T. C.; DEKKER, B. M.; HOEKEMA, A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. **Nucleic Acids Reserch**, v. 17, p. 2362, 1989.
- VINCENT, S. J; COUTTS, B. A; JONES, R. A. C. Effects of introduced and indigenous viruses on native plants: Exploring their disease causing potential at the agro-ecological interface. **PLoS ONE**, v.9, p. 6-9, 2014.
- VIVES, M. C.; VELAZQUEZ, K.; PINA, J. A.; MORENO, P.; GUERRI, J.; NAVARRO, L. Identification of a new *Enamovirus* associated with citrus vein enation disease by deep sequencing of small RNAs. **Phytopathology**, v.103, p. 1077-1086, 2013.
- WETZEL; T.; BECK, A.; WEGENER, U.; KRCZAL, G. Complete nucleotide sequence of the RNA 1 of a grapevine isolate of *Arabis mosaic virus*. **Archives of Virology**, v. 149, p 989-995, 2004.
- WILLIAMSON, K. E; WOMMACK, K. E.; RADOSEVICH M. Sampling natural viral communities from soil for culture-independent analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.6628-6633, 2003.
- WILLIAMSON, S. J. Viral Metagenomics, in Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats (ed F. J. de Bruijn), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2011.
- WILSON, J. E.; POWELL, M. J.; HOOVER, S.E.; SARNOW, P. Naturally Occurring Dicistronic *Cricket Paralysis Virus* RNA Is Regulated by Two Internal Ribosome Entry Sites. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, p.4990-4999, 2000.

- WU, Q.; WANG, Y.; CAO, M.; PANTALEO, V.; BURGYAN, J.; LI, W. X.; DING, S. W. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by Deep sequencing and a new computational algorithm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 109, p. 3938-3943, 2012.
- WU, Y. C.; LO, C. F.; HUANG, C. J.; YU, H. T.; WANG, C. H. The Complete Genome Sequence of Perina nuda Picorna-like Virus, An Insect-Infecting RNA Virus with a Genome Organization Similar to That of the Mammalian Picornaviruses, **Virology**, v. 294, p. 312-323, 2002.
- WYLIE, S. J.; JONES, M. G. K. The complete genome sequence of a *Passion fruit woodiness virus* isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. **Archives of Virology**, v. 156, p. 479-482, 2011.
- WYLIE, S.J.; LUO, H.; LI, H.; JONES, M.G.K. Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. **Archives of Virology**, v. 157, p. 271-284, 2012.
- XU, Y.; HUANG, L.; FU, S.; WU, J.; ZHOU, X. Population diversity of *Rice stripe virus*-Derived siRNAs in three different hosts and RNAi-based antiviral immunity in *Laodelphax striatellus*. **PLoS One**, v. 7, 2012.
- YAMASHITA, T.; SAKAE, K.; TSUZUKI, H.; SUZUKI, Y.; ISHIKAWA, N.; TAKEDA, N.; YAMAZAKI, S. Complete Nucleotide Sequence and Genetic Organization of *Aichi virus*, a Distinct Member of the *Picornaviridae* Associated with Acute Gastroenteritis in Humans. **Journal of Virology**, v. 72, p. 8408-8412, 1998.
- YAN, F.; ZHANG, H.; ADAMS, M.; YANG, J.; PENG, J.; ANTONIW, J.; ZHOU, Y.; CHEN, J. Characterization of siRNAs derived from *Rice stripe virus* in infected rice plants by deep Sequencing. **Archives of Virology**, v. 155, p. 935-940, 2010.
- YANG, X.; WANG, Y.; GUO, W.; XIE, Y.; XIE, Q.; FAN, L.; ZHOU, X. Characterization of small interfering RNAs derived from the *Geminivirus*/beta satellite complex using deep sequencing. **PLoS One**, v. 6, 2011.
- YOSHIKAWA, N.; YAMAGISHI, N.; YAEGASHI, H.; ITO, T. Deep sequence analysis of viral small RNAs from a green crinkle-diseased apple tree. **Petria**, v.22, p. 292-297, 2012.
- ZHANG, T.; BREITBART, M.; LEE, W. H.; RUN, J. Q.; WEI, C. L.; SOH, S. W.; HIBBERD M. L.; LIU E. T; ROHWER F.; RUAN Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. **PLOS Biology**, v. 4, 2006.

ZHANG, Y.; SINGH, K.; KAUR, R.; QIU, W. Association of a novel DNA virus with the *Grapevine vein-clearing* and decline syndrome. **Phytopathology**, v. 101, p. 1081-1090, 2011.

ZHAO, H.; SUN, R.; ALBRECHT, U.; PADMANABHAN, C.; WANG, A.; COFFEY, M. D.; GIRKE, T.; WANG, Z.; CLOSE, T. J.; ROOSE, M. Small RNA profiling reveals phosphorous deficiency as a contributin factor in symptom expression for *Citrus Huanglongbing* disease **Molecular Plant**, v.6, p. 301-310, 2013.