

II. Fichas técnicas contendo justificativas para inclusão na lista e metodologias de identificação, preferencialmente moleculares

II.1 *Acute bee paralysis virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Dicistroviridae*
Gênero: *Aparavirus*
Espécie: *Acute bee paralysis virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Acute bee paralysis virus* (ABPV) é um vírus de distribuição mundial que infecta abelhas desde seu estágio larval até a fase adulta, causando paralisia aguda – motivo da designação do nome do vírus – seguida de morte (Chen e Siede, 2007). Esse vírus é associado à perda de colônias inteiras, especialmente quando estão infestadas com o ácaro *Varroa destructor*, pois este se alimenta de hemolinfa, enfraquecendo ainda mais o inseto parasitado (de Miranda et al., 2010). Apesar de ter como seu hospedeiro principal a espécie *Apis mellifera*, ABPV foi relatado infectando outras espécies do gênero *Apis* no continente Asiático (Chanpanitkitchote et al., 2018). No Brasil, são descritos relatos de infecção por este vírus não apenas em espécies de *Apis*, mas também em abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* na região Nordeste (Ueira-Vieira et al, 2015), nos estados do Espírito Santo e São Paulo (Teixeira et al., 2020) e na região Sul do país (Caesar et al., 2019). No território nacional são descritas mais de 400 espécies de abelhas nativas sem ferrão, muitas das quais pertencentes ao gênero *Melipona*, sendo destacadas como endêmicas e com uma importância ecológica elevada devido ao seu papel na reprodução da vegetação através da polinização (Santos, 2010). Para as populações de *Apis* sp., apesar de não serem espécies nativas brasileiras, Modro e colaboradores (2011) destacam seu papel fundamental na polinização de espécies vegetais de mais de 40 famílias botânicas localizadas em Minas Gerais, principalmente Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae e Bignoniaceae, e dão destaque que no estudo realizado, cerca de 62% das plantas visitadas eram nativas brasileiras. Nas regiões de Caatinga, Muniz e colaboradores (2020) destacam que *A. mellifera* é considerada como agente polinizador da maioria das espécies estudadas no bioma. Nas regiões de Cerrado, Mendonça e colaboradores (2008) demonstraram que a espécie *A. mellifera* foi responsável pela polinização de 30 famílias botânicas, dentre as quais Melastomataceae, Bignoniaceae,

Malpighiaceae, Myrtaceae, Fabaceae e Asteraceae. Foi destacado também que em cerrados de São Paulo, Mato Grosso e Minas Gerais, cerca de 75% das espécies de plantas são polinizadas de forma exclusiva, primária ou secundária por abelhas, nativas ou não, tendo estas papel crucial para a manutenção das comunidades. Desta maneira, dado o risco que esse vírus representa a espécies de abelhas nativas brasileiras, a importância ecológica e econômica das espécies de abelhas em geral, nativas ou não, e, considerando os impactos ambientais que poderiam ocorrer aos vegetais que dependem destes polinizadores para a reprodução, recomenda-se a não utilização do ABPV.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Aparavirus* é preciso confirmar que não se trate da espécie ABPV. Há várias técnicas moleculares descritas para detecção e identificação de vírus de RNA, como é o caso do ABPV. Todavia, em uma vasta quantidade de trabalhos a técnica escolhida pelos autores e utilizada com sucesso foi RT-PCR (Antúñez et al., 2005; Teixeira et al., 2008; de Miranda et al., 2010; Ueira-Vieira et al., 2015; Chanpanitkitchote et al., 2018; Caesar et al., 2019; Teixeira et al., 2020) e por tal motivo, somado à sua robustez e menor custeio, é a técnica indicada para a identificação deste vírus. Dentre os trabalhos levantados, sugere-se a utilização do protocolo proposto por Teixeira e colaboradores (2020), no qual uma RT-PCR foi realizada utilizando-se os *primers* ABPV-F e ABPV-R, desenhados a partir do genoma completo do vírus por Teixeira e colaboradores (2008), para amplificação de um fragmento de 500bp específico desse vírus. As sequências dos *primers* descritos estão discriminadas na tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências	Referência
ABPV-F	5'- TCTGATGATGCTGAAGAGAGAAA - 3'	Teixeira et al., 2008
ABPV-R	5'- AATCATCATTGCCGGCTCTA - 3'	

Referências Bibliográficas:

Antúñez, K., Alessandro, B. D., Corbella, E., & Zunino, P. (2005). Detection of *Chronic bee paralysis virus* and *Acute bee paralysis virus* in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 69–72.

Chanpanitkitchote, P., Chen, Y., Evans, J. D., Li, W., Li, J., Hamilton, M., & Chantawannakul, P. (2018). *Acute bee paralysis virus* occurs in the Asian honey bee *Apis cerana* and parasitic mite *Tropilaelaps mercedesae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 131–136.

- Chen, Y.P. e Siede, R. (2007). Chapter 2: Honey Bee Viruses. *Adv Virus Res.*; 70:33-80.
- De Miranda, J. R., Cordon, G., & Budge, G. (2010). The *Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus* complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S30–S47.
- Caesar, L., Cibulski, S.P., Canal, C.W., Blochtein, B., Sattler, A., and Haag, K. L. (2019). The virome of an endangered stingless bee suffering from annual mortality in southern Brazil *Journal of General Virology*; 100:1153–1164.
- Mendonça, K., Marchini, L.C., Souza, B. de A., Almeida-Anacleto, D. de., e Moreti, A. C. de C. C. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. *Neotropical Entomology* 37(5):513-521.
- Modro, A.F.H., Message, D., da Luz, C.F.P., Alves, J.A., e Neto, M. (2011). Flora de Importância Polínifera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG1. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.35, n.5, p.1145-1153.
- Muniz, V.I.M de S., Nascimento, J.E.M., Félix, J.A., Alves, J.E. (2020). Nicho polínico de *Apis mellifera* L. na Caatinga durante a floração de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*; 18:e18006.
- Santos, A.B. (2010). Abelhas nativas: polinizadores em declínio. *Natureza on line*; 8 (3): 103-106. ISSN 1806–7409.
- Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., & Evans, J. D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1), 117–119.
- Teixeira, E.W., Ferreira, E.A., da Luz, C.F.P., Martins, M.F., Araújo, Ramos, T.A., Lourenço, A.P. (2020). European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. *Journal of Invertebrate Pathology*; Volume 172, 107357.
- Ueira-Vieira, C., Almeida, L.O., de Almeida, F.C. et al. (2015). Scientific note on the first molecular detection of the *Acute bee paralysis virus* in Brazilian stingless bees. *Apidologie* 46, 628–630.

II.2 Arterivirus

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Pisuviricota*

Classe: *Pisoniviricetes*

Ordem: *Nidovirales*

Família: *Arteriviridae*

Gênero: *Arterivirus*

Espécies: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, *Equine Viral Arteritis*, *Lactate dehydrogenase-elevating Virus*, *Simian Hemorrhagic Fever Virus*.

Motivo da inclusão na lista:

Os *Arterivirus* são vírus envelopados de 45-65 nm de diâmetro, com uma superfície relativamente lisa e um nucleocapsídeo isométrico, ocasionalmente icosaédrico, com genoma de RNA de fita positiva que infectam mamíferos (Firth et al., 2011). Dos representantes, o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) e o vírus da arterite equina (EAV) são considerados patógenos veterinários com alto impacto em populações infectadas. Todavia, outras duas espécies, o vírus da elevação da lactato desidrogenase (LDV), que acomete camundongos, e o vírus da febre hemorrágica símia (SHFV), que acomete primatas não humanos, são descritas como ponto de atenção demandando maiores estudos (Snijder et al., 2013; Vanmechelen et al., 2018). De modo geral, estes vírus parecem ter os macrófagos como célula-alvo (Snijder et al., 2013), mas são observadas diferentes manifestações de acordo com a espécie responsável pela infecção. O EAV causa doença leve em equídeos, mas também pode causar dificuldade respiratória grave, geralmente em potros, ou levar ao aborto em éguas grávidas. O PRRS causa dificuldade respiratória e insuficiência reprodutiva em suínos, enquanto o SHFV causa a febre hemorrágica altamente letal em macacos (Vanmechelen et al., 2018). Os *Arterivirus* são descritos com ocorrência mundial (CABI, 2021). No Brasil, os rebanhos suínos são considerados livres de PRRS desde 1994 pela OIE (Ciacci-Zanella et al., 2004). Para o EAV, embora levantamentos soroepidemiológicos em locais de criação de equídeos comprovem sua circulação no país, o vírus não foi de fato isolado no Brasil (Lara et al., 2002). Não foram identificados trabalhos sobre a identificação de SHFV e LDV em animais do Brasil (criação ou nativos), e Snijder e colaboradores (2013) descrevem sua presença relatada apenas em espécies dos continentes asiático e africano. Os arterivirus são considerados patógenos invasivos pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Apesar dos vírus representantes não terem sido reportados em espécies nativas brasileiras, ressalta-se a amplitude de infecção citada, na qual sabe-se que estes patógenos infectam hospedeiros primatas, suínos, equinos e roedores. No país, são descritos 139 táxons de Primatas (espécies e subespécies), muitas das quais endêmicas e algumas ameaçadas de extinção (ICMBio, 2012). Quanto aos suínos, ocorrem três espécies de porcos-do-mato, os Queixadas (*Tayassu pecari*), o Caititu (*Pecari tajacu*) e o Cateto (*Pecari maximus*), que apesar de não serem considerados porcos verdadeiros, porque não são da família Suidae, e sim Tayassuidae, têm contato com os porcos verdadeiros que foram introduzidos em território brasileiro e que, inclusive, são consideradas espécies invasoras que interferem negativamente na fauna local (EMBRAPA, 2013). Há cerca de 244 roedores ocorrendo no Brasil, dentre eles o Camundongo-do-

mato (*Oryzomys flavescens*), de extrema importância para os ambientes de Mata-Atlântica, pois são essencialmente herbívoros, alimentando-se de frutos e grãos, exercendo um importante papel de dispersão, e também podem incluir artrópodes na sua dieta (ICMBio, 2014). Considerando o potencial de infecção a representantes nativos do Brasil, aliado à gravidade das doenças causadas e à característica de invasividade destes patógenos, recomenda-se a não utilização dos *Arteriviruses*.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso se estender ao gênero, quando houver pedidos de utilização de vírus da família *Arteriviridae*, é preciso confirmar que não se trate de espécies do gênero *Arterivirus*. Por serem vírus de RNA, as principais técnicas moleculares observadas nos trabalhos levantados para suas detecções e identificações consistem em técnicas de reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (Plut et al., 2021) ou a utilização de transcrição reversa seguida de *nested* (Christopher-Hennings et al., 1995) ou qPCR (Wasilk et al., 2004). Não foram encontrados trabalhos que propusessem a utilização de um único par de *primers* universal capaz de amplificar todas as espécies do gênero. Dessa maneira, sugere-se a utilização das abordagens e *primers* propostos em alguns trabalhos que foram desenvolvidos para identificar as principais espécies patogênicas do gênero. Dentre eles, a utilização da metodologia descrita no trabalho de Plut e colaboradores (2021), que para a identificação do PRRSV utilizaram a técnica de RT-PCR em uma única etapa única, que consistiu na realização da Transcrição reversa do RNA do vírus em DNA complementar (cDNA) com o uso da enzima transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase, utilizando os *primers* P1 e P2, desenhados a partir da ORF 7 em trabalho anterior. Para a detecção dos demais vírus sugere-se utilizar também a técnica de RT-PCR, porém com o uso de outros *primers* espécie-específicos e as condições descritas nos trabalhos que propuseram sua utilização. A descrição desses *primers* assim como suas referências pode ser visualizada na Tabela abaixo:

Espécie	Sequências dos <i>primers</i> (<i>forward/reverse</i>)	Referências
PRRSV	F-P1: 5' – CCAGCCAGTCAATCARCTGTG – 3' R-P2: 5' – GCGAATCAGGCGCACWGTATG – 3'	Donadeu et al., 1999
EAV	CE: 5' – TGGTAGGTGCTTCATTGGCT – 3' DE: 5' – GCGGCACAAG AACACTTCTG – 3'	Gilbert et al., 1997
LDV	EI006: 5' – TGTGACCGGTCAACCCCGGC – 3' EI007: 5' – 3GGTTTGTTCATCAGGAGATCC – 3'	Chen & Plagemann, 1997
SHFV	SHFV-F: 5' – GGCAAACCAAAAC-CAAATAACAAGGG – 3' SHFV-R: 5' – ATAAT-CAGTGTCTGGCCTAGGTGG – 3'	Vatter et al., 2015

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Arterivirus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/68598>. Acesso em: 26 de março de 2021.

Chen, Z., & Plagemann, P. G. (1997). Detection of lactate dehydrogenase-elevating virus in transplantable mouse tumors by biological assay and RT-PCR assays and its removal from the tumor cell. *Journal of virological methods*, 65(2), 227-236.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Nelson, J. K., Hines, R. J., Swenson, S. L., Hill, H. T., ... & Chase, C. C. (1995). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1730-1734.

Ciacchi-Zanella, J.R.; Trombetta, C.; Vargas, I.; Costa, D.E.M. da. (2004). Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.2, p.449-455.

Donadeu, M., Arias, M., Agüero, M., Romero, L. J., & Christianson, W. T. (1999). Using polymerase chain reaction to obtain PRRSV-free piglets from endemically infected herds. *Journal of Swine Health and Production*, 7(6), 255-261.

EMBRAPA. (2013). Javalis, Javaporcos e Suiformes Nativos: Saiba diferenciar e conserve a fauna nativa. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/96883/1/final7340.pdf>. Acesso em 28 de março de 2021.

Firth, A. E., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Wills, N. M., Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R., Atkins, J. F., ... Posthuma, C. C. (2011). Discovery of a small *Arterivirus* gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *Journal of General Virology*, 92(5), 1097–1106.

ICMBio. (2012). Documentos e Arquivos. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cpb/index.php/primatas-brasileiros>. Acesso em 28 de março de 2021.

Gilbert, S. A., Timoney, P. J., McCollum, W. H., & Deregt, D. (1997). Detection of *equine arteritis virus* in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 35(8), 2181-2183.

ICMBio. (2014). Documentos e Arquivos. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/3855-roedores>. Acesso em: 28 de março de 2021.

Lara, M.C.C.S.H.; Fernandes, W.R.; Timoney, P.J.; Birgel, E.H. (2002). Prevalência de anticorpos antivírus da arterite dos equinos em cavalos criados no Estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* [online], vol.54, n.3, pp.223-227.

Plut, J., Jamnikar-Ciglenecki, U., & Stukelj, M. (2020). Molecular detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus 2 and hepatitis E virus in oral fluid compared to their detection in faeces and serum. *BMC veterinary research*, 16, 1-8.

Snijder, E. J., Kikkert, M. e Fang, Y. (2013). *Arterivirus* molecular biology and pathogenesis. *Journal of General Virology*, 94 (Pt_10), 2141–2163.

Vanmechelen, B., Vergote, V., Laenen, L., Koundouno, F. R., Bore, J. A., Wada, J., ... Maes, P. (2018). Expanding the Arterivirus Host Spectrum: Olivier's Shrew Virus 1, A Novel *Arterivirus* Discovered in African Giant Shrews. *Scientific Reports*, 8(1).

Vatter, H. A., Donaldson, E. F., Huynh, J., Rawlings, S., Manoharan, M., Legasse, A., ... & Brinton, M. A. (2015). A simian hemorrhagic fever virus isolate from persistently infected baboons efficiently induces hemorrhagic fever disease in Japanese macaques. *Virology*, 474, 186-198.

Wasilk, A., Callahan, J. D., Christopher-Hennings, J., Gay, T. A., Fang, Y., Dammen, M., ... & Nelson, W. M. (2004). Detection of US, Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4453-4461.

II.3 *Baculovirus penaei*

Classificação taxonômica:

Realm: *Varidnaviria*
Reino: *Helvetiavirae*
Filo: *Dividoviricota*
Classe: *Laserviricetes*
Ordem: *Ligamenvirales*
Família: *Baculoviridae*
Gênero: *Baculovirus*
Espécie: *Baculovirus penaei*

Motivo da inclusão na lista:

O patógeno é um vírus que causa doença em camarões e por tal motivo também é denominado "vírus da poliedrose nuclear de envelope único em *Penaeus vannamei* " (PvSNPV). No entanto, é frequentemente referido apenas como *Baculovirus penaei* (BP), pois praticamente todas as espécies de camarões peneídeos no continente americano foram relatados como suscetíveis ao patógeno. É relatado nos estágios larval, pós-larval, juvenil e adulto dos camarões peneídeos cultivados em países da América do Norte, Central e do Sul. (Varela-Mejías e Valverde-Moya, 2019). Considerado um vírus entérico, causa danos ao hepatopâncreas, e os sintomas observados são inespecíficos, mas geralmente incluem reduções nas taxas de crescimento e alimentação, bem como aumentos nas infestações secundárias, sendo que os animais gravemente infectados podem apresentar coloração pálida no trato digestivo (Cuéllar-Anjel, 2015). BP é considerado um vírus invasivo pelo CABI, no Compendium de espécies invasivas. E, desta forma, a carcinocultura, como é chamada a criação de camarão, sofre altas perdas quando há a presença do patógeno, podendo se estender às populações nativas, quando os locais dos tanques são contenções feitas no mar e não tanques próprios externos ao ambiente natural (CABI, 2021). O Brasil é o quinto maior produtor mundial de camarões, com destaque para a criação de *Penaeus brasiliensis* no litoral nordestino, uma espécie nativa e de grande importância econômica e ecológica (Nunes, 2001). O BP tem sido relatado pela OIE como um agente capaz de causar alta mortalidade de camarões peneídeos em culturas do Brasil, demonstrando a presença do patógeno no país (Varela-Mejías, 2018). Devido aos impactos ambientais a diferentes espécies de camarão, incluindo espécie nativa brasileira, associado à sua característica de invasividade, recomenda-se a não utilização deste microrganismo para fins de introdução ambiental.

Método de identificação:

Devido às restrições de uso, quando houver pedidos de registro para vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, é importante confirmar se não se trata especificamente da espécie BP. Para garantir a precisa identificação do vírus, sugere-se, dentre os trabalhos levantados, utilizar o método molecular desenvolvido por Wang e colaboradores (1996), que ainda tem sido o método usado na maioria dos trabalhos publicados mais recentemente (OIE, 2019; Ramírez et al., 2020). No referido trabalho foram desenhados três conjuntos de *primers* para amplificar o vírus, sendo os *primers forward*: BPA, BPD e BPE e os *primers reverse* a serem utilizados com eles, respectivamente, BPB, BPF e BPG. Usados em conjunto, eles permitem a obtenção de um fragmento de aproximadamente

1430 pb do gene que codifica a poliedrina. Contudo, no trabalho de Ramírez e colaboradores (2020), que se baseou no trabalho de Wang e colaboradores (1996), apenas um dos conjuntos de *primers* (BPA e BPB) foi utilizado com sucesso, se mostrando capaz de identificar BP nas amostras estudadas de camarão. Os *primers* descritos se encontram na Tabela abaixo e, devido, aos resultados obtidos nos testes publicados, sugere-se utilizar inicialmente BPA e BPB, e os demais conjuntos apenas quando for necessário.

<i>Primers</i>	Sequências
BPA	5'- GATCTGCAAGAGGACAAACC - 3'
BPB	5'- ATCGCTAAGCTCTGGCATCC - 3'
BPD	5'- TGTTCCTCAGCCAATACATCG - 3'
BPE	5'- TACATCTTGGATGCCTCTGG - 3'
BPF	5'- TACCCTGCATTCCTTGTCGC - 3'
BPG	5'- ATCCTGTTTCCAAGCTCTGC - 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Baculovirus penaei*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/91860>. Acesso em: 29 de março de 2021.

Cuellar-Ánjel J. (2015). Baculovirosis tetraedrica. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University. [Online]. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tetrahedral-baculovirosis-es.pdf>. Acesso em 29 de março de 2021.

Nunes, A.J.P, (2001). Nota técnica Panorama da aquicultura. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/> Acesso em: 29 de março de 2021.

OIE (2019) - Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals: Tetrahedral Baculovirosis (*Baculovirus penaei*). Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_tetrahedral_baculovirosis.pdf. Acesso em 29 de março de 2021

Ramírez, B., Guevara, M., Alfaro, R., Montoya, V., Mai, H. N., Serna, M., ... & Aranguren, L. F. (2020). A cross-sectional study of shrimp pathogens in wild shrimp, *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Tumbes, Peru. *Aquaculture Research*.

Varela-Mejías, A. (2018). Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología. *Revista AquaTIC*, 50, pp. 13-30.

Varela-Mejías, A.; Valverde-Moya, J. (2019). *Baculovirus penaei* como factor de riesgo para infecciones bacterianas en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1):377-386.

Wang, S. Y., Hong, C., & Lotz, J. M. (1996). Development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25(1-2), 123-131.

II.4 Begomovirus

Classificação taxonômica:

Realm: *Monodnaviria*

Reino: *Shotokuvirae*

Filo: *Cressdnaviricota*

Classe: *Repensiviricetes*

Ordem: *Geplafuvirales*

Família: *Geminiviridae*

Gênero: *Begomovirus*

Espécies: *East African cassava mosaic virus*, *Squash leaf curl virus*, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tomato severe rugose virus*, *Pepper huasteco yellow vein virus*, *Watermelon chlorotic stunt virus*, *Cotton leaf curl geminivirus*, *Bean golden mosaic virus*, *Sida common mosaic virus*, *Sida micrantha mosaic virus*, *Sida mottle Alagoas virus*, *Sida yellow mosaic virus*, *Sida micrantha. Euphorbia mosaic virus*, *Euphorbia yellow mosaic virus*, *Macroptilium golden mosaic virus*, *Passion flower little leaf mosaic virus*, *Passion fruit severe leaf distortion virus* e *Tomato chlorotic mottle virus*.

Motivo da inclusão na lista:

Begomovirus são vírus de DNA de fita simples que infectam plantas e são responsáveis por sérias ameaças a diversos cultivares. Os representantes do gênero apresentam muita variação genética dentro do hospedeiro e evoluem tão rapidamente quanto os vírus de RNA (Lima et al., 2017). O gênero é o maior da família *Geminiviridae* em número de espécies, são mais de 300 e várias delas merecem destaque pelo fato de possuírem como hospedeiros espécies nativas brasileiras. Elas são: *East African cassava mosaic virus* (EACMV), que causa problemas foliares e radiculares em mandioca (*Manihot esculenta*). *Squash leaf curl virus* (SLCV), que causa danos às plantas inteiras de Cucurbitaceae e Fabaceae. *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) que causam danos à planta inteira de Solanaceae, principalmente culturas de tomate, mas que afetam também representantes das famílias Asteraceae, Fabaceae, Cucurbitaceae e Malvaceae. *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV), que causam danos às plantas das famílias Solanaceae e Cucurbitaceae. *Cotton leaf curl geminivirus* (CLCuD complex), que causa danos à planta inteira de algodão, da família Malvaceae, mas também foi registrado afetando Cucurbitaceae, Solanaceae e Euphorbiaceae (CABI, 2021, EPPO, 2021). *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Sida common mosaic virus* (SiCmMV), *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV), que afetam as plantas do gênero *Sida*, da família Malvaceae, com destaque para a espécie *Sida micrantha*. *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), que afetam a espécie *Euphorbia heterophylla*, da família Euphorbiaceae. *Macroptilium golden mosaic virus* (MGMV), que afeta a espécie *Macroptilium*

lathyroides, da família Fabaceae. *Passion flower little leaf mosaic virus* (PLLMV) e *Passion fruit severe leaf distortion virus* (PSLDV), que afetam as espécies *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*, da família Passifloraceae, e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), que afeta a espécie *Spilanthes oleracea*, da família Asteraceae. Os *Begomovirus* são de distribuição mundial, ocorrendo particularidades entre suas espécies, como o EACMV, que foi relatado apenas em países da África e CLCuD complex, registrado apenas na Ásia (CABI, 2021). No Brasil, foram encontrados relatos apenas da infecção por TYLCV, infectando plantações de tomate (Solanaceae) e de soja (Fabaceae) (Macedo et al., 2017 a, b). Todavia, ainda que as outras espécies não tenham sido identificadas no país, considerando-se a gravidade da doença causada por elas e o fato de várias espécies afetarem plantas nativas brasileiras e uma ampla gama de hospedeiros distribuídos em diferentes famílias, das quais também possuímos representantes nativos (Flora do Brasil, 2020), entende-se que há ameaça direta à nossa biodiversidade. Adicionalmente atribui-se o fato de serem vírus que possuem capacidade de invasão, recomendando-se, portanto, a não utilização das espécies do gênero sob quaisquer condições.

Método de identificação:

Quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Begomovirus* é preciso garantir que não se trate de uma das várias espécies citadas acima, que afetam plantas nativas brasileiras. Após levantamento dos trabalhos, observou-se que para a identificação da maioria dos begomovírus é possível utilizar *primers* degenerados projetados para amplificar fragmentos dos dois componentes genômicos presentes neles, denominados DNA-A e DNA-B, por meio de PCR convencional (Snehi et al., 2011; Srivastava et al., 2015). Diversos autores desenharam e propuseram diferentes combinações desses *primers* degenerados, os quais vêm sendo utilizados ao longo dos anos de forma sistemática e robusta em uma vasta gama de trabalhos que buscam identificar espécies de begomovírus. Dentre eles, destaca-se quatro conjuntos de *primers* projetados no trabalho de Rojas e colaboradores (2003): PAL1v1978/PAR1c496, PBL1v2040/PCRC1, PAL1v1978/PAR1c715 e PBL1v2040/PCRC2. As espécies EACMV, SLCV, TYLCV, ToSRV, BGMV, SimMV, SiMoAV, EuMV, EuYMV, PLLMV e ToLCNDV foram identificadas com a utilização dos *primers* PAL1v1978/PAR1c496, os quais amplificam, especificamente, uma região correspondente a proteína associada à replicação (Rep) e à capa proteica (CP) desses vírus (presente no DNA-A) e os *primers* PBL1v2040/PCRC1, os quais amplificam uma região conservada presente no DNA-B. As espécies PHYVV e WmCSV foram identificadas com a utilização dos *primers* PAL1v1978/PAR1c715 e PBL1v2040/PCRC2, também responsáveis por amplificar regiões conservadas do DNA-A e DNA-B, respectivamente. As espécies SiCmMV, SiYMV, MGMV e

PSLDV possuem sequências completas do genoma e/ou DNA-A e DNA-B depositadas. Dessa maneira, apesar de não terem sido encontrados trabalhos que utilizaram os *primers* projetados por Rojas para suas identificações, os mesmos também podem ser considerados como uma estratégia para tal. Para as demais espécies não foi possível confirmar a possibilidade de identificação com a utilização desses *primers*, mas foram encontrados trabalhos que propõem outros *primers* espécie-específicos que permitem essa identificação. Para a espécie CLCuD complex, sugere-se utilizar os *primers* beta01 e beta02, projetados no trabalho de Paximadis & Rei, 1997 e para a espécie ToCMoV os *primers* GWAttb1 e GWAttb2, projetados no trabalho de Ribeiro e colaboradores (2007).

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
PAL1v1978	5' - GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT - 3'	Rojas et al., 2003
PAR1c496	5' - AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG - 3'	Rojas et al., 2003
PBL1v2040	5' - GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA - 3'	Rojas et al., 2003
PCRc1	5' - CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA - 3'	Rojas et al., 2003
beta01	5' - GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC - 3'	Paximadis et al., 1999
beta02	5' - GGTACCTACCCTCCCAGGGGTACAC - 3'	Paximadis et al., 1999
GWAttb1	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGACGTCTGA GGAGCTCTTAG - 3'	Ribeiro et al., 2007
GWAttb1	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTAATACCGT TACCACGTGT - 3'	Ribeiro et al., 2007

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *African cassava mosaic virus* (African cassava mosaic). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/2535>. Acesso em: 01 de abril de 2021.

_____. *Cotton leaf curl disease complex* (Leaf curl disease of cotton). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16813>. Acesso em: 01 de abril de 2021.

_____. *Cotton leaf curl Gezira virus* (African cotton leaf curl Begomovirus). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/13816>. Acesso em: 01 de abril de 2021.

_____. *Squash leaf curl virus* (Leaf curl of squash). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/15038>. Acesso em: 01 de abril de 2021.

_____. *Tomato leaf curl New Delhi virus* (Tomato New Delhi virus). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/118179>. Acesso em: 01 de abril de 2021.

EPPO, 2020. EPPO Global database - *Pepper huasteco yellow vein virus*. In: EPPO Global database, Paris, France: EPPO. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/PHYVV0/distribution>. Acesso: 01 de abril de 2021.

_____. EPPO Global database - *Watermelon chlorotic stunt virus*. In: EPPO Global database, Paris, France: EPPO. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/WMCSV0/distribution>. Acesso: 01 de abril de 2021.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 31 de março de 2021.

Kashina, B. D., Alegbejo, M. D., Banwo, O. O., Nielsen, S. L., & Nicolaisen, M. (2013). Molecular identification of a new *Begomovirus* associated with mosaic disease of *Jatropha curcas* L. in Nigeria. *Archives of virology*, 158(2), 511-514.

Lima, A. T. M., Silva, J. C. F., Silva, F. N., Castillo-Urquiza, G. P., Silva, F. F., Seah, Y. M., ... Zerbini, F. M. (2017). The diversification of *Begomovirus* populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus Evolution*, 3(1). doi:10.1093/ve/vex005.

Macedo, M. A., Barreto, S. S., Costa, T. M., Rocha, G. A., Dianese, E. C., Gilbertson, R. L., & Inoue-Nagata, A. K. (2017a). First Report of *Tomato severe rugose virus*, a Tomato-Infecting *Begomovirus*, in Soybean Plants in Brazil. *Plant Disease*, 101(11), 1959–1959.

Macedo, M. A., Albuquerque, L. C., Maliano, M. R., Souza, J. O., Rojas, M. R., Inoue-Nagata, A. K., & Gilbertson, R. L. (2017b). Characterization of tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World *Begomovirus* infecting tomato in Northeast Brazil. *Archives of Virology*, 163(3), 737–743.

Paximadis, M., Idris, A. M., Torres-Jerez, I., Villarreal, A., Rey, M. E. C., & Brown, J. K. (1999). Characterization of tobacco geminiviruses in the Old and New World. *Archives of virology*, 144(4), 703-717.

Ribeiro, S. G., Lohuis, H., Goldbach, R., & Prins, M. (2007). Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. *Journal of virology*, 81(4), 1563-1573.

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., & Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate *primers* in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant disease*, 77(4), 340-347.

Snehi, S. K., Raj, S. K., Khan, M. S., & Prasad, V. (2011). Molecular identification of a new *Begomovirus* associated with yellow mosaic disease of *Jatropha gossypifolia* in India. *Archives of virology*, 156(12), 2303-2307.

Srivastava, A., Jaidi, M., Kumar, S., & Raj, S. K. (2015). Molecular identification of a new *Begomovirus* associated with leaf crumple disease of *Jatropha curcas* L. in India. *Archives of virology*, 160(2), 617-619

II.5 *Black queen cell vírus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Dicistroviridae*
Gênero: *Triatovirus*
Espécie: *Black queen cell virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Black queen cell virus* (BQCV) é um vírus que infecta abelhas e as larvas acometidas têm como sintoma uma aparência pálida, de cor amarelo escurecido e tegumento duro em forma de saco, semelhante a larvas infectadas com SBV (*Sacbrood virus*) (Chen e Siede, 2007). O BQCV se multiplica no estágio de pupa e o inseto, ao se infectar, pode morrer rapidamente bem como pode persistir crônico e principalmente assintomático na colmeia. (Spurny et al., 2019; Tapaszti et al., 2009). É um vírus com distribuição mundial (Chen e Siede, 2007). No Brasil, são descritos relatos de infecção por BQCV em 17 apiários de *Apis mellifera* em diferentes municípios dos três estados da região Sul do país, causando grandes perdas nas colmeias (Chagas et al., 2020). Apesar de não terem sido encontrados trabalhos que evidenciem casos de infecção em abelhas nativas brasileiras, Morfin e colaboradores (2021) relatam infecção em colmeias de abelhas do gênero *Melipona*, em Jalisco, México. Desta forma, sendo conhecido que o Brasil possui diversas espécies de abelhas nativas do gênero *Melipona* (Silveira et al., 2002) e levando em consideração que muitas são classificadas como endêmicas e com um papel fundamental para a manutenção da vegetação através da polinização (Santos, 2010), considera-se um alto risco a utilização de BQCV para a formulação de produtos que possam ser aplicados no ambiente. No caso de *A. mellifera*, apesar de não ser uma espécie nativa brasileira, Modro e colaboradores (2011) destacam seu papel fundamental na polinização de espécies vegetais de mais de 40 famílias botânicas localizadas em Minas Gerais, principalmente Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae e Bignoniaceae, e dão destaque que no estudo realizado, cerca de 62% das plantas visitadas eram nativas brasileiras. Nas regiões de Caatinga, Muniz e colaboradores (2020) destacam que *A. mellifera* é considerada como agente polinizador da maioria das espécies estudadas no bioma. Desta maneira, dada a importância ecológica e econômica das espécies de abelhas nativas ou não, e, considerando os impactos ambientais que poderiam ocorrer às espécies de abelhas e dos vegetais que dependem deste organismo para a polinização e reprodução, recomenda-se a não utilização do BQCV.

Método de identificação:

Quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Triatovirus* é preciso confirmar que não se trate da espécie BQCV. Este é um vírus de RNA e as principais técnicas moleculares sugeridas nos trabalhos levantados para sua detecção e identificação consistem nas técnicas de RT-PCR, RT-qPCR e real time RT-PCR (Grabensteiner et al., 2007; Teixeira et al., 2008; Tapaszti et al., 2009; Spurny et al., 2017; Morfin et al., 2020; Chagas et al., 2020). Dentre elas, a técnica de RT-PCR foi utilizada em diversos trabalhos, apresentando resultados robustos e, no geral, de menor custo. Portanto, para a identificação do vírus, sugere-se a utilização do protocolo proposto por Chagas e colaboradores (2020), no qual uma RT-PCR foi realizada utilizando-se os *primers* BQCV_11 e BQCV_12, que amplificam o gene responsável por codificar a proteína do capsídeo do vírus, os quais foram desenhados por Tsevegmid e colaboradores (2016) e geram um produto de 294 bp. As sequências dos *primers* descritos estão discriminadas na tabela abaixo:

<i>Primers</i>	Sequências	Referência
BQCV_11	5'- AGTGGCGGAGATGTATGC - 3'	Tsevegmid et al., 2016
BQCV_12	5'- GGAGGTGAAGTGGCTATATC - 3'	

Referências Bibliográficas:

Chagas, D.B.; Monteiro, F.L.; Barcelos, L. da S.; Frühauf, M. I.; Ribeiro, L. C.; Lima, M. de; Hübner, S. de O.; Fischer, G. (2020). *Black queen cell virus* and *Nosema ceranae* coinfection in Africanized honey bees from southern Brazil / Coinfecção por vírus da realeira negra (BQCV) e *Nosema ceranae* em abelhas africanizadas no sul do Brasil. *Pesqui. vet. bras*; 40(11): 892-897.

Chen, Y.P. e Siede, R. (2007). Chapter 2: Honey Bee Viruses. *Adv Virus Res.*; 70:33-80.

Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., & Nowotny, N. (2007). Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): *Acute bee paralysis virus*, *black queen cell virus* and *Sacbrood virus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 222–225.

Modro, A.F.H., Message, D., da Luz, C.F.P., Alves, J.A., e Neto, M. (2011). Flora de Importância Polínifera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG1. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.35, n.5, p.1145-1153.

Morfin, N., Gashout, H.A., Macías-Macías, J.O. et al. (2021). Detection, replication and quantification of *Deformed wing virus-A*, *Deformed wing virus-B*, and *Black queen cell virus* in the endemic stingless bee, *Melipona colimana*, from Jalisco, Mexico. *Int J Trop Insect Sci*; 41, 1285–1292.

Muniz, V.I.M de S., Nascimento, J.E.M., Félix, J.A., Alves, J.E. (2020). Nicho polínico de *Apis mellifera* L. na Caatinga durante a floração de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*; 18:e18006.

Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B. (2002). Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação. Ministério do Meio Ambiente: PROBIO – PNUD - Fundação Araucária; 253 p.: il. ISBN. 85-903034-1-1.

Spurny, R., Přidal, A., Pálková, L., Kiem, H.K.T., de Miranda, J.R., Plevka, P. (2017). Virion structure of *Black queen cell virus*, a common honeybee pathogen. *J Virol*, 91:e02100-16.

Tapasztai, Z., Forgách, P., Kővágó, C., Topolska, G., Nowotny, N., Rusvai, M., & Bakonyi, T. (2009). Genetic analysis and phylogenetic comparison of *Black queen cell virus* genotypes. *Veterinary Microbiology*, 139(3-4), 227–234.

Tsevegmid K., Neumann P. & Yañez O. (2016). The honey bee pathosphere of Mongolia: European viruses in Central Asia. *PLoS One*, 11(3):1-16.

II.6 *Canine distemper virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Negarnaviricota*
Classe: *Monjiviricetes*
Ordem: *Mononegavirales*
Família: *Paramyxoviridae*
Gênero: *Morbillivirus*
Espécie: *Canine distemper virus*

Motivo da inclusão na lista:

O vírus da cinomose canina (CDV) é um vírus envelopado e de RNA de fita simples como material genômico. É um paramixovírus intimamente relacionado aos vírus do sarampo e da peste bovina e causa uma doença febril aguda altamente contagiosa (Alis et al., 2018). A infecção por CDV está associada à alta morbidade e mortalidade. Animais infectados podem desenvolver distúrbios respiratórios, gastrointestinais, dermatológicos, oftálmicos ou neurológicos (Budaszewski et al., 2014). A doença ocorre em uma grande variedade de carnívoros terrestres, incluindo a família Canidae (cachorro, raposa, lobo, cão-guaxinim), Mustelidae (furão, visão americano, gambá, carcaju, marta, texugo, lontra), Procyonidae (guaxinim, coatimundi), Viverridae (civeta e gineta), Ailuridae (panda vermelho), Ursidae (ursos) e grandes Felidae (leões, tigres, leopardos, guepardos), bem como alguns outros mamíferos, como elefantes asiáticos e alguns primatas (CABI, 2021). Os cães domésticos e selvagens são considerados as principais espécies hospedeiras que servem como reservatório. O CDV é uma ameaça séria para a vida selvagem e estima-se que essa ameaça aumente proporcionalmente ao avanço da ocupação territorial humana (junto com seus cães) em áreas não urbanizadas pelo mundo. O CDV é considerado com distribuição mundial (Duque-Valencia, 2019) bem como é considerado um vírus invasivo pelo CABI, no Compendium de Espécies Invasivas. No Brasil, a cinomose canina é considerada endêmica e há registro de seu diagnóstico em espécies silvestres que ocorrem no Brasil, (lobo-guará - *Chrysocyon brachyurus*, e cachorro-vinagre - *Speothos venaticus*) (Monteiro et al., 2010). Com os dados apresentados, tendo em vista a elevada ocorrência de cinomose em cães domésticos e sua importância como doença emergente em animais silvestres, somada à sua conhecida característica de invasividade, recomenda-se a não utilização deste vírus.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Morbillivirus* é preciso confirmar que não se trate da espécie CDV. Este é um vírus de RNA e, portanto, a principal técnica molecular observada nos trabalhos levantados para sua detecção e identificação é a de RT-PCR (Frisk et al., 1999; Saito et al., 2006). Entretanto, também foram encontrados vários trabalhos de identificação e detecção de CDV por meio da utilização de técnicas de *nested*-PCR (Rzeżutka et al., 2002) e PCR quantitativo (qPCR) (Elia et al., 2006). Embora seja demonstrado que as técnicas de *nested* PCR e qPCR apresentam melhor sensibilidade de detecção em relação a RT-PCR, quando

o objetivo é apenas a identificação do vírus, a técnica de RT-PCR pode ser utilizada devido à sua capacidade de rastreá-lo e também devido ao seu baixo custo operacional. Sendo assim, dentre os trabalhos levantados, sugere-se a utilização da metodologia descrita no trabalho de Saito e colaboradores (2006), que visando à identificação do vírus utilizaram dois *primers*, CDV1 e CDV2, projetados em trabalho anterior, para amplificar fragmentos do gene que codifica a nucleoproteína do vírus. Os referidos *primers* podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
CDV1	5'- ACAGGATTGCTG AGGACCTAT - 3'	Frisk et al. (1999)
CDV2	5'- CAAGATAACCATGTACGGTGC - 3'	Frisk et al. (1999)

Referências Bibliográficas:

Anis, E., Newell, T.K., Dyer, N. et al. (2018). Phylogenetic analysis of the wild-type strains of *Canine distemper virus* circulating in the United States. *Virol. Journal*, 15, 118.

Budaszewski, R. da F., Pinto, L.D., Weber, M.N., Caldart, E.T., Alves, C.D., Martella, V., Ikuta, N., Lunge, V.R., Canal, C.W. Genotyping of *Canine distemper virus* strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Research*;13;180:76-83.

CABI (2021). *Canine distemper virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/96093>. Acesso em: 31 de março de 2021.

Duque-Valencia J, Sarute N, Olarte-Castillo XA, Ruíz-Sáenz J. (2019). Evolution and Interspecies Transmission of *Canine Distemper Virus*—An Outlook of the Diverse Evolutionary Landscapes of a Multi-Host Virus. *Viruses*; 11(7):582.

Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M. S., Lorusso, E., ... & Buonavoglia, C. (2006). Detection of *Canine distemper virus* in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*, 136(1-2), 171-176.

Frisk, A. L., König, M., Moritz, A., & Baumgärtner, W. (1999). Detection of *Canine distemper virus* nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3634-3643.

Monteiro, M. V. B.; Santos, M. P.; Costa, C. T. C.; Whiteman, C. W.; Monteiro, F. O. B. (2010). Cinomose canina nos animais domésticos e silvestres. *Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal*, v.53, n.2, p.216-223.

Rzeżutka, A., & Mizak, B. (2002). Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 95-103.

Saito, T. B., Alfieri, A. A., Wosiacki, S. R., Negrao, F. J., Moraes, H. S. A., & Alfieri, A. F. (2006). Detection of *Canine distemper virus* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in veterinary science*, 80(1), 116-119.

II.7 Cassava brown streak viruses

Classificação taxonômica:

Realm: *Monodnaviria*
Reino: *Shotokuvirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Alsuviricetes*
Ordem: *Tymovirales*
Família: *Alphaflexiviridae*
Gênero: *Potexvirus*
Espécie: *Cassava virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Cassava brown streak virus* é descrito como o vírus da faixa marrom da mandioca (CBSV) e tem 650 nm aproximadamente, com RNA de fita simples como seu material genético (Mulenga et al., 2018). O principal hospedeiro é a mandioca (*Manihot esculenta*), mas em testes laboratoriais de infecção controlada, foi demonstrado que o vírus é capaz de infectar diversas espécies de solanáceas (CABI, 2021). Os sintomas observados em mandioca consistem em uma faixa de veia necrótica ou amarela nas folhas; áreas necróticas marrom-escuras dentro do tubérculo e redução no tamanho da raiz; lesões nas raízes podem resultar na deterioração pós-colheita da cultura. Os sintomas da folha e/ou caule podem ocorrer sem o desenvolvimento de sintomas nos tubérculos (Mulenga et al., 2018). A presença do vírus é restrita ao continente africano, porém este patógeno é considerado um vírus invasivo (CABI, 2021). Segundo Ateka e colaboradores (2017), em levantamento feito pela FAO em 2013, a mandioca é o principal alimento básico para mais de 800 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, a mandioca é uma espécie nativa que é de extrema importância ambiental, social e econômica, pois é um vegetal que está relacionada ao nicho de várias espécies, principalmente da região amazônica, assim como desempenha um importante papel na manutenção da agricultura tradicional tropical (populações rurais e indígenas (Lobo et al., 2018). Desta forma, levando em consideração a importância da mandioca como espécie nativa que interfere no âmbito sócio-econômico e ecológico, e que o CBSV, se introduzido no país, poderia causar elevadas perdas e rapidamente se disseminar, devido ao seu potencial invasivo, recomenda-se sua não utilização.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas para a espécie CBSV, sempre que houver pedidos de registro de vírus do gênero *Potexvirus* é preciso realizar a sua precisa identificação para garantir que não se trata dessa espécie em questão. Por se tratar de uma espécie de vírus de RNA fita simples, para sua identificação por meio de técnicas moleculares, é necessário realizar técnicas de RT-PCR ou outras técnicas moleculares após a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. Durante muitos anos os principais *primers* utilizados para a detecção desse vírus foram os desenvolvidos por Monger e colaboradores (2001), projetados para o gene da proteína de revestimento do vírus CP (CBSV10 e CVSB11). Entretanto, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Abarshi e colaboradores (2012), que testaram os referidos *primers* em mais de 100 amostras contendo o vírus CBSV e por não obterem boa sensibilidade, desenharam outros *primers* a partir de regiões mais conservadas dos

genes que codificam a proteína de revestimento (CP), além da proteína HAM1he 3, regiões transcritas mas não traduzidas do vírus obtidas a partir de todas as sequências de isolados do vírus depositados nos bancos de dados. Dentre todos, o conjunto de *primers* CBSVF3 e CBSVR3 foi o que se mostrou mais eficiente no trabalho e é o indicado. Os mesmos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
CBSVF3	5' – GGARCCCRATGTAYAAATTTGC – 3'
CBSVR3	5' – AGGAGCWGCTARWGCAAA – 3'

Referências Bibliográficas:

Abarshi, M. M., Mohammed, I. U., Jeremiah, S. C., Legg, J. P., Kumar, P. L., Hillocks, R. J., & Maruthi, M. N. (2012). Multiplex RT-PCR assays for the simultaneous detection of both RNA and DNA viruses infecting cassava and the common occurrence of mixed infections by two cassava brown streak viruses in East Africa. *Journal of virological methods*, 179(1), 176-184.

Ateka, E., Alicai, T., Ndunguru, J., Tairo, F., Sseruwagi, P., Kiarie, S., ... Boykin, L. M. (2017). Unusual occurrence of a DAG motif in the *Ipomovirus Cassava brown streak virus* and implications for its vector transmission. *Plos One*, 12(11), e0187883.

CABI (2021). Cassava brown streak viruses (cassava brown streak disease). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17107>. Acesso em: 29 de março de 2021.

Lobo, I.D.; Santos Júnior, C. F. dos.; Nunes, A. (2018). Importância socioeconômica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para a comunidade de Jaçapetuba, município de Cametá, PA. *Multitemas*, Campo Grande, MS, v. 23, n. 55, p. 195-211.

Monger, W. A., Seal, S., Cotton, S., & Foster, G. D. (2001). Identification of different isolates of Cassava brown streak virus and development of a diagnostic test. *Plant Pathology*, 50(6), 768-775.

Mulenga, R. M., Boykin, L. M., Chikoti, P. C., Sichilima, S., Ng'uni, D., & Alabi, O. J. (2018). Cassava Brown Streak Disease and Ugandan cassava brown streak virus reported for the First Time in Zambia. *Plant Disease*, 102(7), 1410–1418.

II.8 *Cheravirus* sp.

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Pisuviricota*

Classe: *Pisoniviricetes*

Ordem: *Picornavirales*

Família: *Secoviridae*

Gênero: *Cheravirus*

Espécies: *Apple latent spherical virus*, *Cherry rasp leaf virus*, *Stocky prune virus*.

Motivo da inclusão na lista:

Os *Cheravirus* são vírus não envelopados que apresentam RNA como material genômico. Dentre as espécies do gênero, há três de grande importância econômica e ambiental, sendo elas *Apple latent spherical virus* (ALSV), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV) e *Stocky prune virus* (StPV) (ICTV, 2012). A gama de hospedeiros depende de cada representante do gênero, sendo as espécies da família Rosaceae, as principais hospedeiras em geral, principalmente cerejeira-brava (*Prunus avium*), pessegueiro (*Prunus pérsica*) e macieiras (*Malus* sp.). Todavia, são relatados casos de infecção em diversas espécies como *Chenopodium* sp. (Amaranthaceae), *Cucumis* sp. e *Cucurbita* sp. (Cucurbitaceae), *Rubus* sp. (Rosaceae), *Malva* sp. (Malvaceae), *Nicotiana* sp. e *Solanum* sp. (Solanaceae) (EPPO, 2021). Os sintomas incluem folhas cloróticas, enroladas e aumentadas, com entrenós severamente encurtados e uma queda prematura muito severa dos pequenos frutos, causando uma perda de produção extremamente severa (Candresse et al., 2005). A distribuição geográfica do gênero é conhecida como restrito a plantações na China, EUA e Canadá, França, Bolívia e Peru (EPPO, 2021). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil, e destaca-se que o principal vetor nematoide *Xiphinema rivesi* é considerado uma espécie quarentenária no país, conforme publicado na Instrução Normativa Nº 39 do MAPA em 2018. Todavia, além dos vírus representantes do gênero *Cheravirus* apresentarem um risco econômico devido às perdas nos cultivos afetados, o país tem espécies nativas da família Rosaceae, principal hospedeira, como o pessegueiro-bravo, *Prunus myrtifolia*, árvore de porte médio e muito difundida em nosso território devido à disseminação dos seus frutos pelas aves e mamíferos (de Eston et al., 2007). Adicionalmente, o Brasil abriga sete espécies nativas do gênero *Rubus*, com ocorrência nas regiões Nordeste (BA, PE), Centro-Oeste (DF, GO), Sudeste (MG, SP, ES, RJ) e Sul (PR, SC, RS) (Barcelos e Heiden, 2015). Outro importante fator decorre da ampla gama de famílias de plantas que têm potencial de serem acometidas por este patógeno, muitas das quais possuem representantes de espécies nativas e endêmicas no país, tais como Solanaceae e Cucurbitaceae (Flora do Brasil, 2021). Assim, é importante controlar e restringir a introdução e utilização dos vírus do gênero *Cheravirus* no país, devido ao risco para integrantes da flora brasileira e aos potenciais prejuízos ambientais e econômicos que poderiam ocorrer.

Método de identificação:

Como a restrição de uso se estende a todas as espécies do gênero *Cheravirus*, quando houver pedidos de registro de vírus da família *Secoviridae*, é preciso confirmar que o isolado não pertence a esse

gênero em questão. Por ser um gênero da ordem *Picornavirales* que apenas recentemente foi incorporado à recém-criada família *Secoviridae* (Sanfaçon et al., 2009), a maioria dos trabalhos levantados ainda busca realizar o sequenciamento e a melhor caracterização de suas espécies. Assim, não foi encontrado nenhum trabalho que testou e proponha pares de *primers* degenerados comprovadamente capazes de amplificar os membros do gênero como um todo. Mas foram encontrados trabalhos que buscaram realizar a detecção e identificação de suas principais espécies por meio da técnica de RT-PCR, após desenharem *primers* a partir da análise de regiões conservadas dos genomas disponíveis. Sendo eles: os *primers* AVB14F e AVB752R para a espécie *Arracacha virus B* (AVB) (Duarte et al., 2016); vp24F e vp24R para a espécie *Cherry rasp leaf virus* (CRLV) (Ma et al., 2014); BabChV-1F e BabChV-1R para a espécie *Babaco cheravirus-1* (BabChV-1) (Cornejo-Franco et al., 2020); 104f e 208r para a espécie *Apple latent spherical virus* (ALSV) (Petrzik et al., 2015). Por não haver informação científica suficiente para afirmar se apenas um dos pares de *primers* mencionados seria capaz de amplificar também outras espécies do gênero e enquanto não houver a publicação de *primers* de amplo espectro, recomenda-se que para o registro de qualquer membro dessa família sejam realizadas, em um primeiro momento, reações de RT-PCRs com o uso de todos esses conjuntos descritos. Essa recomendação é importante para a confirmação de que o isolado não tenha a possibilidade de pertencer ao gênero *Cheravirus*. Todos os conjuntos estão listados na Tabela abaixo.

Espécie	Sequências dos <i>primers</i> (<i>foward/reverse</i>)	Referências
AVB	AVB14F: 5' – GTCAAAGACCGCCAGGAAAG – 3' AVB752R: 5' - ACAGCAAATGCCACGTTC – 3'	Duarte et al., 2016
CRLV	vp24F: 5' – GGCCCTGACCCTTTTTCTTTTCATTTG - 3 vp24R: 5'- GGTGTACTCAGCTTTGAGGGCTC - 3	Ma et al., 2014
ALSV	104f: 5' – ACCAGGAACAAATACCCATCTC – 3' 208r: 5' – ATGTGCTGCCAAATTCAGAG – 3'	Petrzik et al., 2015
BabChV-1	BabChV-1F: 5' - GCTTGTCATTAGCACGGCTAAC – 3' BabChV-1R: 5' – GCAGGAAAGAGCGTCTGATCA – 3'	Cornejo-Franco et al., 2020

Referências Bibliográficas:

Barcelos, L.B. e Heiden, G. (2015). Distribuição Geográfica de espécies de Amora (*Rubus*, Rosaceae) nativas do Brasil (Base: *Species Link*). Semana Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Univers. Federal de Pelotas. Disponível: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/135643/1/Laisa.Rubus.pdf>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Candresse, T., Svanella-Dumas, L., & Le Gall, O. (2005). Characterization and partial genome sequence of *Stocky prune virus*, a new member of the genus *Cheravirus*. *Archives of Virology*, 151(6), 1179–1188.

Cornejo-Franco, J. F., Medina-Salguero, A., Flores, F., Chica, E., Grinstead, S., Mollov, D., & Quito-Avila, D. F. (2020). Exploring the virome of *Vasconcellea x heilbornii*: the first step towards a sustainable production program for babaco in Ecuador. *European Journal of Plant Pathology*, 157(4), 961-968.

de Eston, M. R., Vallilo, M. I., Garbelotoni, M. L., Starzynski, R., & dos Santos, A. S. R. (2007). Aspectos químicos dos frutos de *Prunus myrtifolia* (L.) Urban, (Rosaceae) – Alimento de algumas aves silvestres 1. *Rev. Inst. Flor*, 19(1), 13-18.

Duarte, P. D. S. G., Figueira, A. D. R., Galvino-Costa, S. B. F., Sotero, A. D. J., Pompeu, D. C., Fernandes, J. R. C., & Carvalho, A. L. D. A. (2016). Establishment of a bank of positive controls for diagnosis of quarantine viruses and viroids in Brazil through PCR and RT-PCR. *Crop Protection*, 86, 31-41.

EPPO. (2021). *Cheravirus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/1CHEVG>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

ICTV (2012). Secoviridae. In: Part II – The Positive Sense Single Stranded RNA Viruses. *Virus Taxonomy*, 881–899. doi:10.1016/b978-0-12-384684-6.00075-6.

Ma, Y. X., Li, J. J., Li, X. D., & Zhu, S. F. (2014). First Report of *Cherry rasp leaf virus* infecting Cherry in Shandong Province, China. *Journal of Plant Pathology*, 96(4SUP), 4-113.

MAPA (2018). Instrução Normativa Nº 39, de 1 de outubro de 2018. Disponível: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43460217/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-39-de-1-de-outubro-de-2018-43460055. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Petrzik, K., Přibyllová, J., Špak, J., & Havelka, J. (2015). Partial genome sequence of currant latent virus, a new chera-like virus related to *Apple latent spherical virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 81(2), 142-145.

Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., Van der Vlugt, R., & Wetzels, T. (2009). *Secoviridae*: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Archives of virology*, 154(5), 899-907.

II.9 *Chronic bee paralysis virus*

Classificação taxonômica:

Classificação ICTV: Unassigned Viruses*

* Este vírus não possui classificação definida segundo o ICTV. Porém consta disponibilizada no site deste órgão a informação sobre suas características estruturais e moleculares para auxiliar na identificação e tomada de decisão sobre a identificação do vírus. Segue a nota abaixo na íntegra:

Nota: “Os vírions têm uma forma anisométrica incomum e são heterogêneos em tamanho, geralmente com cerca de 60 nm de comprimento, mas variando em diâmetro de 20 a 30 nm. As preparações de vírions purificados contêm dois fragmentos de ssRNA (3674 nt e 2305 nt), a maior codificando o RdRp. Os vírions contêm uma única proteína estrutural de 23,5 kDa. O vírus é prontamente transmitido por via oral às abelhas adultas e foi identificado em colônias mundialmente - Sequence accession numbers: EU122229/30”. (ICTV, 2021 - talk.ictvonline.org > ictv-reports > un_viruses > unassigned-viruses)

Espécie: *Chronic bee paralysis virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) é um vírus que infecta abelhas, atacando-as principalmente na fase adulta e causando paralisia de duas formas. A mais comum é caracterizada por tremores anormais do corpo e das asas, rastejamento no solo devido à incapacidade de voar, presença de abdomens inchados e asas deslocadas. A outra forma é caracterizada pela ausência de pelos nas abelhas infectadas, tegumento brilhante e com aparência preta. Ambas as formas podem ser observadas em abelhas da mesma colônia. Segundo estudos, isso pode acontecer devido a diferenças individuais entre as abelhas quanto à suscetibilidade hereditária para a multiplicação do vírus (Chen e Siede, 2007). Apesar de ser amplamente divulgado infectando abelhas do gênero *Apis* sp., CBPV foi descrito infectando também abelhas nativas da Argentina, incluindo *Bombus pauloensis*, *Halictillus amplilobus* e membros do gênero *Xylocopa*, bem como na espécie *Peponapis fervens* que é nativa no continente americano em todas as regiões temperadas e tropicais. Os autores destacam que este foi descrito como o primeiro caso do vírus na América do Sul em abelhas ditas não-*Apis* (Fernandez de Landa et al., 2020). No Brasil, apesar de não terem sido encontrados trabalhos que relataram casos de infecção pelo vírus, cabe destacar que dentre as espécies nativas brasileiras encontram-se diversos representantes do gênero *Xylocopa* e da espécie *Peponapis fervens* (EMBRAPA, 2021), ambas relatadas como susceptíveis ao vírus na Argentina. Cabe ressaltar também que são descritas mais de 400 espécies de abelhas nativas no Brasil, várias sendo destacadas

como endêmicas e com uma importância ecológica elevada devido ao seu papel na reprodução da vegetação através da polinização (Santos, 2010). Para as populações de *Apis* sp., apesar de não serem espécies nativas brasileiras, Modro e colaboradores (2011) destacam seu papel fundamental na polinização de espécies vegetais de mais de 40 famílias botânicas localizadas em Minas Gerais, sendo as principais Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae e Bignoniaceae, e dão destaque que no estudo realizado, cerca de 62% das plantas visitadas eram nativas brasileiras. Nas regiões de Caatinga, Muniz e colaboradores (2020) destacam que *A. mellifera* é considerada como agente polinizador da maioria das espécies estudadas no bioma. Nas regiões de Cerrado, Mendonça e colaboradores (2008) demonstraram que a espécie *A. mellifera* foi responsável pela polinização de 30 famílias botânicas, principalmente Melastomataceae, Bignoniaceae, Malpighiaceae, Myrtaceae, Fabaceae e Asteraceae. Foi destacado também que em cerrados de São Paulo, Mato Grosso e Minas Gerais, cerca de 75% das espécies de plantas são polinizadas de forma exclusiva, primária ou secundária por abelhas, nativas ou não, tendo estas papel crucial para a manutenção das comunidades. Desta maneira, devido ao fato de afetar espécies nativas brasileiras, a importância ecológica e econômica das espécies de abelhas em geral, nativas ou não, e, considerando os impactos ambientais que poderiam ocorrer aos vegetais que dependem destes polinizadores para a reprodução, recomenda-se a não utilização do CBPV.

Método de identificação:

Como não há classificação disponível até a presente data de elaboração deste documento, faz-se necessária a condição negativa de registro neste caso, para a espécie *Chronic bee paralysis virus*. Ressalta-se, porém, que segundo Ribière e colaboradores (2010), a posição filogenética do CBPV, inferida a partir da sequência de aminoácidos deduzida dos domínios RdRp conservados, mostra que o vírus tem uma posição intermediária entre os agrupamentos da família *Nodaviridae* e *Tombusviridae*. Com isto, em caso de pedido de registro de qualquer vírus das famílias entre as quais ele está intermediário será necessário comprovar que o vírus proposto não se trata da espécie CBPV. Por se tratar de um vírus de RNA, dentre as técnicas moleculares descritas para sua detecção e identificação estão a RT-PCR, RT-qPCR, *real time* RT-PCR e *minus-strand-specific* PCR (Antúñez et al., 2005; Celle et al., 2008; Rüstemoğlu e Sipahioğlu, 2019; Fernandez de Landa et al., 2020; Teixeira et al., 2020). Levando-se em consideração sua precisão, confiabilidade e seu custo relativo ser menor, sugere-se a utilização da técnica de RT-PCR. Desta forma, dentre os trabalhos levantados indica-se a utilização do protocolo proposto por Rüstemoğlu e Sipahioğlu (2019), no qual uma RT-PCR foi realizada utilizando-se os *primers* CBPV-F e CBPV-R, que amplificam um fragmento de

434 pb do gene RdRp do vírus. As sequências dos *primers* descritos estão discriminadas na tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências	Referência
CBPV-F	5'- GCAAAGTGGCCACCAATAGT - 3'	Rüstemoğlu e Sipahioğlu, 2019
CBPV-R	5'- TGGTACGGAAGGTGTGTCAA - 3'	

Referências Bibliográficas:

Antúñez, K., Alessandro, B. D., Corbella, E., & Zunino, P. (2005). Detection of *Chronic bee paralysis virus* and *Acute bee paralysis virus* in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 69–72.

Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., Faucon, J.-P., & Ribière, M. (2008). Detection of *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Research*, 133(2), 280–284.

Chanpanitkitchote, P., Chen, Y., Evans, J. D., Li, W., Li, J., Hamilton, M., & Chantawannakul, P. (2018). *Acute bee paralysis virus* occurs in the Asian honey bee *Apis cerana* and parasitic mite *Tropilaelaps mercedesae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 131–136.

Chen, Y.P. e Siede, R. (2007). Chapter 2: Honey Bee Viruses. *Adv Virus Res.*; 70:33-80.

EMBRAPA. Acervo de Abelhas. Disponível: <https://www.embrapa.br/meio-ambiente/abelhas-nativas/abelhas-e-plantas>. Acesso em: 18 de junho de 2021.

Fernandez de Landa, G., Revainera, P., Brasesco, C., di Gerónimo, V., Plischuk, S., Meroi, F., ... Quintana, S. (2020). *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) in South American non-*Apis* bees. *Archives of Virology*. doi:10.1007/s00705-020-04697-1.

ICTV. Web Site Search Results: Chronic bee paralysis vírus - Unassigned Viruses (2011). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/search-124283882/?q=Chronic%20bee%20paralysis%20virus#gsc.tab=0&gsc.q=Chronic%20bee%20paralysis%20virus&gsc.page=1>. Acesso: 18 de junho de 2021.

Mendonça, K., Marchini, L.C., Souza, B. de A., Almeida-Anacleto, D. de., e Moreti, A. C. de C. C. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. *Neotropical Entomology* 37(5):513-521.

Modro, A.F.H., Message, D., da Luz, C.F.P., Alves, J.A., e Neto, M. (2011). Flora de Importância Polínifera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG1. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.35, n.5, p.1145-1153.

Muniz, V.I.M de S., Nascimento, J.E.M., Félix, J.A., Alves, J.E. (2020). Nicho polínico de *Apis mellifera* L. na Caatinga durante a floração de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*; 18:e18006.

Ribière, M., Olivier, V., & Blanchard, P. (2010). *Chronic bee paralysis*: A disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S120–S131.

Rüstemoğlu, M. & Sipahioğlu, H. M. (2019). Occurrence and prevalence of six honey bee viruses in Hakkari (Turkey) and their genomic divergence. *Munis Entomology & Zoology*, 14 (2): 574-583.

Santos, A.B. (2010). Abelhas nativas: polinizadores em declínio. *Natureza on line*; 8 (3): 103-106. ISSN 1806–7409.

Teixeira, E.W., Ferreira, E.A., da Luz, C.F.P., Martins, M.F., Araújo, Ramos, T.A., Lourenço, A.P. (2020). European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. *Journal of Invertebrate Pathology*; Volume 172, 107357.

II.10 *Citrus tatter leaf virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Alsuviricetes*
Ordem: *Tymovirales*
Família: *Betaflexiviridae*
Gênero: *Capillovirus*
Espécie: *Citrus tatter leaf virus*

Motivo da inclusão na lista:

Citrus tatter leaf virus (CTLV) é um vírus de RNA de fita única como material genômico. Este patógeno infecta uma ampla variedade de plantas cítricas pertencentes à família Rutaceae. A doença da folha esfarrapada de citros causa lesões cloróticas locais típicas e sintomas de mosaico sistêmico nas folhas, bem como folhas rasgadas e com incompatibilidade de união de gemas em copa cítrica enxertada (Lin, 2019). É relatado na África do Sul, Américas (Norte, Central e Sul), incluindo o Brasil, Ásia e Austrália (EFSA et al., 2017). No país a família das rutáceas possui mais de 34 gêneros nativos, abrangendo cerca de 194 espécies cuja ocorrência é principalmente na Amazônia e Mata Atlântica (Ribeiro, 2015). Rosa e colaboradores ressaltam através de levantamento feito em 2011, que o Brasil é responsável pela produção aproximada de 15 milhões de toneladas de laranja, que se encontram divididas em 700 mil hectares, seguido de 1,5 milhões de toneladas de limas-ácidas (limão Tahiti) e tangerinas. Ainda que o hospedeiro principal e natural sejam espécies cítricas, há evidências experimentais de que o CTLV seja capaz de infectar também várias outras espécies, como *Cucurbita pepo* (abobrinha), da família Cucurbitaceae, *Dianthus barbatus*, da família Caryophyllaceae, *Glycine max* (soja), da família Fabaceae, *Gomphrena globosa*, planta herbácea da família Amaranthaceae e que é nativa do Brasil, Panamá e Guatemala, dentre outras (EPPO, 2021). Com isto, ainda que as espécies de *Citrus* não componham a flora nativa brasileira, a área plantada é de grande extensão, aumentando o risco de disseminação para outros representantes da família Rutaceae, bem como para as demais famílias citadas como possíveis hospedeiros, algumas das quais possuem representantes nativos do país. Assim, devido às suas implicações fitossanitárias e levando em consideração que a possibilidade de disseminação no país poderia levar a perdas ambientais e econômicas, sugere-se sua exclusão de uso, dado o risco de ameaça à biodiversidade brasileira.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas para a espécie CTLV, quando houver pedidos de registro de vírus do gênero *Capillovirus*, é preciso confirmar que não se trata dessa espécie. A espécie se trata de um vírus de RNA fita dupla, sendo necessário realizar técnicas de RT-PCR ou outras técnicas moleculares após a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. Mais de um conjunto de *primers*, desenhados para amplificar especificamente essa espécie foram encontrados nos trabalhos levantados. Dentre eles, sugere-se utilizar a metodologia e o conjunto desenvolvido e proposto no trabalho de Hyun e colaboradores (2017), CTLV (2013)-F e CTLV(2013)-R, os quais foram

projetados para amplificar um fragmento de 607 pb do gene que codifica a proteína de revestimento do vírus (CP). No trabalho, os *primers* foram utilizados em ensaios de RT-PCR uniplex de duas etapas (síntese de cDNA primeiro seguido da PCR), mas também podem ser utilizados em ensaios multiplex. Esse conjunto também vem sendo utilizado com sucesso em trabalhos publicados ainda mais recentemente (Hyun et al., 2020). Os *primers* propostos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências
CTLV (2013)-F	5'- CGAAAACCCCTTTTGTCT- 3'
CTLV (2013)-R	5'- ATAGACCCGGCAAAGGAACT- 3'

Referências Bibliográficas:

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., ..., Candresse, T. (2017). Pest categorisation of *Tatter leaf virus*. *EFSA Journal:Scientific Opinion*; 15(10):5033, 22 pp.

EPPO. (2021). *Citrus tatter leaf virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/CTLV00>. Acesso em: 31 de março de 2021.

Hyun, J. W., Hwang, R. Y., & Jung, K. E. (2017). Development of multiplex PCR for simultaneous detection of citrus viruses and the incidence of citrus viral diseases in late-maturity citrus trees in Jeju Island. *The plant pathology journal*, 33(3), 307.

Hyun, J. W., Hwang, R. Y., Choi, C. W., Jung, K. E., & Han, S. G. (2020). Symptomatology of *Citrus mosaic sadwavirus* (CiMV) in Some *Citrus* Cultivars and Effect of CiMV Infection on *Citrus* Fruit Quality. *The plant pathology journal*, 36(1), 106.

Lin, C-Y. (2019). Biological and molecular characterization of *Citrus tatter leaf virus* in Taiwan. *Sustainable Humanosphere*, vol. 15, p.1-4.

Ribeiro, C. C. (2015). As Galipeinae (Galipeae, Rutaceae) no estado da Bahia, Brasil (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Rosa, N.T.; Alves, M.R.; Abreu, P.H.C.de; Amorin, F.R.de. Avaliação Econômica de Alternativas de Produção Citrícola: O Caso de um Produtor do Município de Itápolis-SP. *Revista Agropampa*, v. 3, n. 2, p. 2012-226.

II.11 *Cocksfoot mottle virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Sobelivirales*
Família: *Solemoviridae*
Gênero: *Sobemovirus*
Espécie: *Cocksfoot mottle virus*

Motivo da inclusão na lista:

O vírus *Cocksfoot mottle* (CfMV) é o agente causador de uma doença que afeta várias espécies de plantas da família Poaceae, geralmente causa manchas (mosaico) e sintomas de nanismo nas plantas, podendo ainda desenvolver clorose ou necrose à medida que as folhas envelhecem (Mohamed, 1980). Sua transmissão pode ser de forma mecânica ou pela atuação de besouros vetores (*Lema melanopa* L.), sendo que a transmissão por besouros adultos é mais frequente do que pelas larvas, contudo não têm sido registrados casos de transmissão via sementes (Serjeant, 1967). Essa doença já foi documentada em alguns países europeus, sendo eles: Dinamarca, França, Alemanha, Polônia, Rússia e Reino Unido. Além desses, também houveram registros no Japão, Canadá, Estados Unidos e Nova Zelândia (CABI, 2021). No Brasil não se tem registro desse vírus, o que alerta para a necessidade de controlar essa possível introdução, já que no país existem inúmeras espécies de plantas cultivadas da família Poaceae que são sabidamente infectadas por este vírus em outros países, como é o caso do trigo, aveia, cevada (Serjeant, 1967). Além disso, o Brasil apresenta uma grande diversidade de outras plantas da família Poaceae que são nativas, segundo Kawakita et al. (2016), são 225 gêneros e 1.486 espécies de Poaceae na flora Brasileira, o que reforça a necessidade de proteção dessas plantas contra possíveis agentes causadores de doença como o CfMV.

Método de identificação:

Devido às restrições de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Sobemovirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie CfMV. Este é um vírus de RNA e, portanto, as técnicas moleculares para sua identificação passam pela transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. De acordo com os trabalhos levantados, a técnica mais comumente utilizada para a identificação molecular do vírus é a de RT-PCR. Após levantamento dos trabalhos disponíveis, sugere-se utilizar a metodologia proposta por Trzmiel & Jeżewska (2017). Neste trabalho, os autores identificaram o vírus CfMV em plantas de *Dactylis glomerata* na Polônia. Para essa identificação, foi utilizada a técnica de RT-PCR a partir de dois pares de *primers*, sendo eles: CfCP-F1/CfCP-R2 e CfMV-F/CfMV-R, sintetizados para amplificar fragmentos da sequência do gene que codifica a proteína de revestimento do vírus. Recomenda-se utilizar os dois conjuntos, pois são capazes de amplificar dois fragmentos sobrepostos para que seja possível obter a sequência completa do gene-alvo (proteína de revestimento), aumentando a eficácia da identificação. Os conjuntos de *primers* descritos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Referências</i>
CfCP-F1	5'- GATGGAGCCAGTCTCTCG -3'	Alderman et al.(2016)
CfCP-R2	5'-ATCCGTCAATCTTCAAGC-3'	Alderman et al.(2016)
CfMV-F	5'- GCCCAAGTGTCTGTTTCGAT -3'	Trzmiel & Jeżewska (2017)
CfMV-R	5'- GACTTCATGGACGTGTGCAG-3'	Trzmiel & Jeżewska (2017)

Referências Bibliográficas:

Alderman SC, Martin RC, Gilmore BS, Martin RR, Hoffman GD, Sullivan CS, Anderson NP. (2016). First report of *Cocksfoot mottle virus* infecting *Dactylis glomerata* in Oregon and the United States. *Plant Disease*. May 8;100(5):1030. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1017-PDN>. Acesso em 02 de abril de 2021.

CABI (2021). *Cocksfoot mottle virus* (Cocksfoot mottle virus). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17218>. Acesso em: 02 de abril de 2021.

Kawakita, K., Rodrigues, R. S., & Filgueiras, T. S. (2016). Poaceae em uma planície de inundação no Brasil: listagem florística e novas ocorrências. *Hoehnea*, 43(2), 203-216.

Mohamed, N. A. (1980). *Cocksfoot mottle virus* in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 23(2), 273-275.

Serjeant, E. P. (1967). Some properties of *Cocksfoot mottle virus*. *Annals of Applied Biology*, 59(1), 31-38.

Trzmiel, K., & Jeżewska, M. (2017). First Report of *Cocksfoot mottle virus* Infecting *Dactylis glomerata* in Poland. *Plant Disease*, 101(6), 1067-1067. Disponível em <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1573-PDN>. Acesso em 02 de abril de 2021.

II.12 *Crinivirus* sp.

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Kitrinoviricota*

Classe: *Alsuviricetes*

Ordem: *Martellivirales*

Família: *Closteroviridae*

Gênero: *Crinivirus*

Espécies: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, *Abutilon yellows virus*, *Tomato infectious chlorosis virus* e *Lettuce infectious yellows virus*.

Motivo da inclusão na lista:

Os *Crinivirus* são fitopatógenos que têm genomas de RNA. Das espécies conhecidas, quatro delas são destaque como agentes de grande importância, sendo elas *Cucurbit yellow stunting disorder vírus* (CYSDV), *Abutilon yellows virus* (AbYV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), das quais, a LIYV é a espécie tipo do gênero e com estudos mais aprofundados (CABI, 2021; EPPO, 2021; Kiss et al., 2013). *Crinivirus* infectam plantas do gênero *Abutilon*, da família das Malvaceae, diversos representantes da família Cucurbitaceae, dentre eles o melão, a melancia, o pepino e o curgete (também chamada de abobrinha-verde). Além disso, testes experimentais identificaram diversas outras plantas possíveis hospedeiras e pertencentes às famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Malvaceae, Fabaceae, Solanaceae e Brassicaceae (Wintermantel et al., 2009; CABI, 2021). Os hospedeiros, de forma geral, apresentam sintomas de amarelecimento severos que começam como manchas intervinais nas folhas mais velhas e se intensificam conforme as folhas envelhecem. Manchas cloróticas e nanismo severo podem ocorrer (Gadhave et al., 2018; EPPO, 2021). A presença dos *Crinivirus* causando infecções é descrita na África, Ásia, Europa, América do Norte e do Sul (EPPO, 2021; CABI, 2021). No Brasil, há relatos de infecções por CYSDV, TICV e LIYV (Lima et al., 2012; Macedo et al., 2018), mas não foram encontrados trabalhos relatando a presença de AbYV. No caso de TICV, a doença foi relatada no estado de São Paulo em 2008 e se espalhou rapidamente pelas principais áreas de produção de tomate no país (Macedo et al., 2018). Nos casos de CYSDV e LIYV, as doenças foram relatadas em produções de melão e melancia no Nordeste do país (Lima et al., 2012). Desta forma, considerando a ampla gama de hospedeiros de diferentes famílias, as quais há representantes nativos do Brasil, que além de serem importantes integrantes da flora brasileira, ainda são utilizadas como forrageio para diversas espécies da fauna do país (Flora do Brasil, 2021; Mazzocato et al, 2018), ressalta-se a importância de se restringir a utilização de espécies de *Crinivirus*, diminuindo riscos de impactos ambientais e econômicos.

Método de identificação:

Como a restrição de uso se estende apenas às espécies de vírus citadas, quando houver pedidos de registros de vírus do gênero *Crinivirus* é preciso confirmar que o isolado não pertence a elas, dado o risco que representam para as espécies nativas brasileiras. Por ser um gênero de vírus de RNA, para a identificação, é necessário realizar, primeiramente, a transcrição reversa dos RNAs em cDNA. Após pesquisa bibliográfica observou-se que para a identificação dos vírus do gênero, a técnica mais comumente utilizada é a de RT-PCR (Rubio et al., 2001; Tzanetakis et al., 2003). Foram levantados alguns trabalhos que propuseram *primers* para identificar apenas uma única ou poucas espécies do gênero em ensaios *multiplex* (Dovas et al., 2002) e no trabalho de Martin e colaboradores (2004) foi desenhado um par de *primers* degenerado que amplificava algumas espécies do gênero, mas não todas. Dessa maneira, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Wintermantel & Hladky (2010), que projetaram *primers* degenerados a partir do alinhamento de sequências do gene de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) no RNA1 de várias espécies do gênero (TICV, BPYV, BYVaV, CYSDV, LIYV, PYVV, SPCSV, SPaV and ToCV), o qual possui sequências 70% conservadas entre elas. Esse par de *primers*, CriniRdRp 251F e CriniRdRp 995R, mostrou-se capaz de amplificar todas as espécies de *Crinivirus* testadas no estudo e está descrito na Tabela abaixo. Das espécies levantadas nesta ficha, apenas o AbYV não foi abordado pelo trabalho sugerido. Este vírus é descrito como uma espécie cujo genoma permanece não caracterizado completamente; com exceção da proteína de revestimento e uma região dos genes que codificam poliproteínas associadas à replicação, através do genoma parcial depositado com número de acesso AY422069 no GenBank (Tzanetakis et al., 2013). Por isso, o ICTV (2019) destaca que para esse vírus comparações de sequências genômicas em pares, filogenias de ORFs individuais ou proteínas; comparações estruturais de proteínas codificadas ou vírions e características fenotípicas terão que ser usados para resolver as relações de classificação inferior à família. Com isto, apenas para o caso do AbYV, sugere-se a complementação da identificação com as características estruturais descritas por Tzanetakis e colaboradores (2013), as quais são descritas como partículas filamentosas flexíveis de 12nm de diâmetro e aproximadamente 850–900nm de comprimento.

<i>Primers</i>	Sequências
CriniRdRp 251F	5' – TNGGNAARGGNGARAG – 3'
CriniRdRp 995R	5' - GTRTTNGAYAACCAHGTRTTHG – 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17070>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Dovas, C. I., Katis, N. I., & Avgelis, A. D. (2002). Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease*, 86(12), 1345-1349. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2002.86.12.1345>. Acesso: 08 de abril de 2021.

EPPO. (2021). *Abutilon yellows virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/ABYV00>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

_____. *Lettuce infectious yellows virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/LIYV00>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

_____. *Tomato infectious chlorosis virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/TICV00/hosts>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Gadhav, K. R., Dutta, B., Coolong, T., Sparks, A. N., Adkins, S., & Srinivasan, R. (2018). First Report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in Cucurbits in Georgia, United States. *Plant Health Progress*, 19(1), 9–10.

ICTV (2019). ICTV Taxonomy history: *Abutilon yellows virus*. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202003005. Acesso em: 24 de junho de 2021.

Kiss, Z. A., Medina, V., & Falk, B. W. (2013). *Crinivirus* replication and host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00099.

Lima, A. J. A., Nascimento, A. K. Q., Barbosa, G. da S., Silva, F. R. da. (2012). Viruses Infecting Melon and Watermelon in Northeastern Brazil. Sociedade Brasileira de Virologia, *Virus Reviews and Research*. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Graziela_Barbosa4/publication/276094032_Viruses_infecting_melon_and_watermelon_in_Northeastern_Brazil/links/5a85c3f20f7e9b1a95485f49/Viruses-infecting-melon-and-watermelon-in-Northeastern-Brazil.pdf. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Macedo, M. A., Inoue-Nagata, A. K., Silva, T. N. Z., Freitas, D. M. S., Rezende, J. A. M., Michereff Filho, M., ... Bergamin Filho, A. (2018). Temporal and spatial progress of the diseases caused by the *Crinivirus Tomato chlorosis virus* and the *Begomovirus Tomato severe rugose virus* in tomatoes in Brazil. *Plant Pathology*. doi:10.1111/ppa.12920

Mazzocato, A. C., Dewes, I. S. L., Garcia, J. F., Leite, L. G., Artico, L. L. (2018). Levantamento de Espécies Forrageiras, Daninhas, Medicinais e Tóxicas do Herbário CNPO. *Revista Científica Rural*, Bagé-RS, volume 20, nº 2.

Martin, R. R., Tzanetakis, I. E., Gergerich, R., Fernandez, G., & Pesic, Z. (2003, July). *Blackberry yellow vein associated virus*: a new *Crinivirus* found in blackberry. In *X International Symposium on Small Fruit Virus Diseases* 656 (pp. 137-142). Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2003.87.11.1398C>. Acesso: 08 de abril de 2021.

NCBI – GenBank. (2016). *Abutilon yellows virus* methyltransferase gene, partial cds. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY422069>. Acesso em: 24 de junho de 2021.

Rubio, L., Abou-Jawdah, Y., Lin, H. X., & Falk, B. W. (2001). Geographically distant isolates of the *Crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus* show very low genetic diversity in the coat protein gene. The GenBank accession numbers of the sequences reported in this paper are AF312795–AF312810. *Journal of General Virology*, 82(4), 929-933.

Tzanetakis, I. E., Wintermantel, W. M., & Martin, R. R. (2003). First report of *Beet pseudo yellows virus* in strawberry in the United States: A second *Crinivirus* able to cause pallidosis disease. *Plant Disease*, 87(11), 1398-1398.

Tzanetakis, I. E., Martin, R. R., & Wintermantel, W. M. (2013). Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-15. doi:10.3389/fmicb.2013.00119

II.13 *Cucumber green mottle mosaic virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Alsuviricetes*
Ordem: *Martellivirales*
Família: *Virgaviridae*
Gênero: *Tobamovirus*
Espécie: *Cucumber green mottle mosaic virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Cucumber green mottle mosaic virus* (vírus do mosaico do pepino verde - CGMMV) é um vírus patogênico que causa danos em várias plantas cucurbitáceas, como melancia, melão e pepino, sendo um importante vírus de quarentena em todo o mundo e que pode ser transmitido por contato mecânico e por sementes contaminadas (Dombrovsky et al., 2017). Os sintomas dessa doença nas folhas e frutos infectados podem variar de acordo com as diferentes espécies de culturas de cucurbitáceas, podendo ainda ser variável dependendo do estágio de desenvolvimento das plantas. No pepino, por exemplo, manchas verdes ocorrem nas folhas jovens e nas superfícies dos frutos, e as plantas infectadas podem entrar em colapso, enquanto em melancias, as folhas têm sintomas similares ao pepino, mas essa doença atinge também caules e pedúnculos mediante o desenvolvimento de lesões necróticas marrons. Além disso, as folhas podem sofrer clorose, murchar e morrer prematuramente, porém nas folhas maduras cultivadas em campo aberto, os sintomas da folhagem às vezes desaparecem. Os frutos são malformados e a polpa pode desenvolver efeito de esponja, podridão, amarelamento ou descoloração, tornando-os não comercializáveis (Reingold et al., 2016; Dombrovsky et al., 2017). Essa doença é amplamente distribuída nos países asiáticos e europeus, sendo que 17 países da Ásia e 22 países da Europa já reportaram a presença desse patógeno e além desses, Estados Unidos e Canadá também já o reportaram, assim como a Austrália (CABI, 2021). No Brasil, não se tem registro dessa doença e um possível registro antigo não foi confirmado (Choudhury & Lin, 1982; CABI, 2021). Contudo, como no país se têm inúmeros cultivos das plantas que são acometidas por esse patógeno, assim como várias espécies de cucurbitáceas nativas (Moura, 2017), o controle da introdução desse vírus é de elevada importância.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas no nível de espécie, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Tobamovirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie CGMMV. Por ser um vírus de RNA, para sua identificação é necessário realizar a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. Foram desenvolvidas inúmeras técnicas de identificação/deteção desse vírus, baseadas tanto na RT-PCR convencional, como na RT-PCR com amplificação isotérmica mediada por loop, além da RT via amplificação de cadeia de polimerase por recombinase (RT-RPA) e *real time* RT-PCR (Hongyun et al., 2008; Li et al., 2013; Nematollahi et al., 2014; Zeng et al., 2019). Entretanto, de acordo com a literatura, para fins de detecção/identificação, apenas a RT-PCR convencional se

mostra uma técnica robusta o suficiente, com eficiência demonstrada nos trabalhos. Dentre eles, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Nematollahi e colaboradores (2014), que visando a identificação de CGMMV em Cucurbitáceas, realizaram RT-PCR convencional para amplificar um fragmento de 523 pb que cobre dois de seus genes, responsáveis por codificar a proteína de movimento (MP) e uma proteína de revestimento (CP). Para essa amplificação, foram utilizados os *primers* CGMMV-F e CGMMV-R, sintetizados anteriormente no trabalho de Yoon e colaboradores (2008), os quais se encontram descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
CGMMV-F	5'-GAAGAGTCCAGTTCTGTTTC -3'
CGMMV-R	5'- ACCCTCGAAACTAAGCTTTC -3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021) Datasheet: *Cucumber green mottle mosaic virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16951>. Acesso em 04 de abril de 2021.

Choudhury, M. M., & Lin, M. T. (1982). Occurrence of virus diseases of melon and squash in the Sao Francisco region. Occurrence of virus diseases of melon and squash in the Sao Francisco region, 14(4). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19821382748>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

Dombrovsky, A., Tran-Nguyen, L. T., & Jones, R. A. (2017). *Cucumber green mottle mosaic virus*: rapidly increasing global distribution, etiology, epidemiology, and management. *Annual review of phytopathology*, 55, 231-256.

Hongyun, C., Wenjun, Z., Qinsheng, G., Qing, C., Shiming, L., & Shuifang, Z. (2008). Real time TaqMan RT-PCR assay for the detection of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, 149(2), 326-329.

Li, J. Y., Wei, Q. W., Liu, Y., Tan, X. Q., Zhang, W. N., Wu, J. Y., ... & Tao, X. R. (2013). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Journal of virological methods*, 193(2), 583-588.

Moura, B. E. L. D. (2017). Estudos taxonômicos e morfológicos das Cucurbitáceas do Estado de Goiás, Brasil. Disponível em file:///tmp/mozilla_ubiana0/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Beryll%20Eirene%20Lutz%20de%20Moura%20-%202017.pdf Acesso em 04 de abril de 2021.

Nematollahi, S., Haghtaghi, E., Koolivand, D., & Hajizadeh, M. (2014). Molecular detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* variants from cucurbits fields in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(11), 1303-1310.

Reingold V, Lachman O, Belausov E, Koren A, Mor N, Dombrovsky A. (2016) Epidemiological study of *Cucumber green mottle mosaic virus* in greenhouses enables reduction of disease damage in cucurbit production. *Ann. Appl. Biol.* 168:29–40.

Zeng, R., Luo, J., Gao, S., Xu, L., Song, Z., & Dai, F. (2019). Rapid detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* by reverse transcription recombinase polymerase amplification. *Molecular and cellular probes*, 43, 84-85.

Yoon JY, Choi GS, Choi SK, Hong JS, Choi JK, Kim W, Lee GP, Ryu KH. (2008). Molecular and biological diversities of *Cucumber green mottle mosaic virus* from cucurbitaceous crops in Korea. *J Phytopathol.* 156:408–412.

II.14 *Cucumber vein yellowing virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Pisuviricota*

Classe: *Stelpaviricetes*

Ordem: *Patatavirales*

Família: *Potyviridae*

Gênero: *Ipomovirus*

Espécie: *Cucumber vein yellowing virus*

Motivo da inclusão na lista:

Cucumber vein yellowing virus (CVYV) é um fitopatógeno conhecido por causar grandes danos a espécies representantes das Cucurbitaceae. Durante a infecção, os sintomas observados são o amarelecimento das veias, atrofiamento e morte súbita das plantas de melões (*Cucumis melo*), as melancias (*Citrullus lanatus*) apresentam clorose leve de folha e frutos rachados com necrose interna, enquanto o pepino (*Cucumis sativus*) e a abóbora (*Cucurbita pepo*) apresentam obstrução das veias e manchas nas folhas (Louro et al., 2004). A família Cucurbitaceae está representada por 97 gêneros e aproximadamente 950 espécies presentes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, são reconhecidas 148 espécies, das quais há gêneros de espécies nativas que ocorrem nas regiões de Mata Atlântica e algumas em Cerrado e que exercem papel fundamental na vegetação associada e como fonte de alimento e abrigo para a fauna local. Economicamente é uma família de importância mundial, por apresentar espécies cultivadas para a alimentação e outras que despertam interesse na indústria farmacêutica pela presença de compostos bioativos (Gomes-Costa e Alves, 2012). O vírus CVYV é relatado na Ásia, África e Europa (CABI, 2021). Não foram encontrados trabalhos com relatos de casos no Brasil. Todavia, ressalta-se a ação patogênica deste vírus nas cucurbitáceas, uma família com hospedeiros importantes da flora brasileira e para o qual possuímos espécies nativas, e que representam grande importância ecológica. Por isso, dado o risco representado pela introdução e disseminação de CVYV no país, recomenda-se a não utilização desta espécie.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas no nível de espécie, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Ipomovirus*, é preciso confirmar que não se trate, especificamente, da espécie CVYV. Por ser um vírus de RNA, as técnicas moleculares para sua identificação passam pela transcrição reversa do seu RNA em cDNA. Dentre as metodologias levantadas, além da utilização da técnica de RT-PCR, existem muitos trabalhos que se baseiam na técnica de *real time* RT-PCR para a identificação do CVYV (Picó et al., 2005; Gil-Salas et al., 2009). Após análise das metodologias, observa-se que para fins apenas de identificação do vírus, a técnica de RT-PCR pode ser utilizada devido à sua capacidade de identificá-lo com sucesso e também ao seu baixo custo operacional e há vários trabalhos propondo o uso de diferentes *primers* para esse fim (Cuadrado et al., 2001; Lecoq et al., 2007). Dentre eles, sugere-se utilizar a metodologia e os *primers* propostos no trabalho de Cuadrado e colaboradores (2001), CVYVF e CVYVR, para amplificar parte do gene homólogo da proteína de

choque térmico 70 do vírus, por ser o mais comumente utilizado com sucesso, inclusive em trabalhos mais recentes (Unlu et al., 2020). Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
CVYVF	5' - AGCTAGCGCGTATGGGGTGAC – 3'
CVYVR	5' - GCGCCGCAAGTGCAAATAAAT – 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Cucumber vein yellowing virus* (cucumber vein yellowing). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17072>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Cuadrado, I. M., Janssen, D., Velasco, L., Ruiz, L., & Segundo, E. (2001). First report of *Cucumber vein yellowing virus* in Spain. *Plant Disease*, 85(3), 336-336. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2001.85.3.336A>. Acesso em 09 de abril de 2021.

Gil-Salas, F. M., Colyer, A., Boonham, N., Cuadrado, I. M., & Janssen, D. (2009). Resistance screening against *Cucumber vein yellowing virus* using a real-time (Taqman®) RT-PCR assay in cucumber (*Cucumis sativus*). *Crop Protection*, 28(1), 109-112.

Gomes-Costa, G. A. e Alves, M. (2012). Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Cucurbitaceae. *Rodriguésia*, 63(4), 817-829.

Lecoq, H., Dufour, O., Wipf-Scheibel, C., Girard, M., Cotillon, A. C., & Desbiez, C. (2007). First report of *Cucumber vein yellowing virus* in melon in France. *Plant Disease*, 91(7), 909-909. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-91-7-0909C>. Acesso em 09/04/2021.

Louro, D.; Quinot, A.; Neto, E.; Fernandes, J. E.; Marian, D.; Vecchiati, M.; Caciagli, P. e Vaira, A. M. (2004). Occurrence of *Cucumber vein yellowing virus* in cucurbitaceous species in southern Portugal. *Plant Pathology*, 53 , 241.

Picó, B., Sifres, A., & Nuez, F. (2005). Quantitative detection of *Cucumber vein yellowing virus* in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. *Journal of virological methods*, 128(1-2), 14-20.

Ünlü, E., Yetisi, H., Fidan H., & Denli, N. (2020). Resistance Sources to Zucchini Yellow Mosaic Virus in Turkish Bottle Gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] Germplasm.

II.15 *Cucurbit aphid-borne yellows virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Tolucaviricetes*
Ordem: *Tolivirales*
Família: *Luteoviridae*
Gênero: *Polerovirus*
Espécie: *Cucurbit aphid-borne yellows virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) é um vírus esférico, com aproximadamente 25 nm de diâmetro e genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (Kwak et al., 2018). CABYV causa a doença conhecida como “Amarelo do meloeiro”, devido ao sintoma característico de amarelecimento severo nas culturas de melão, mas também em outras Cucurbitaceae como pepino, melancia e abóbora (CABI, 2021). Além das principais culturas de cucurbitáceas, CABYV infecta outras espécies de diversas famílias, incluindo alface (Asteraceae), feijão de fava e grão de bico (Fabaceae) e maracujá-perene (Vidal et al., 2018). Em condições de laboratório, infecta beterraba forrageira (Amaranthaceae) e endro (Apiaceae). Os sintomas de CABYV incluem manchas amarelas e cloróticas intermediárias que eventualmente coalescem, tornando as folhas amarelas, espessas e quebradiças. Além disso, a queda da floração e um número reduzido de frutos são frequentemente observados (Kassem et al., 2007). É relatado mundialmente, inclusive no Brasil, em plantações de melão e de maracujá (CABI, 2021, Costa et al., 2019). Está listado como patógeno invasivo no Compendium de Espécies Invasivas do CABI. Dessa maneira, considera-se muito importante reforçar os cuidados em relação à disseminação de CABYV para que não ocorra o espalhamento da doença em outros hospedeiros, pois ressalta-se que o Brasil possui diversas espécies nativas de algumas das famílias afetadas por este fitopatógeno, como Cucurbitaceae, Asteraceae, Fabaceae e Passifloraceae (Flora do Brasil, 2020). Assim, devido à importância de controlar e restringir a disseminação no país, evitando que espécies nativas brasileiras sejam acometidas ocasionando problemas à flora, recomenda-se a sua não utilização.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Polerovirus*, é preciso realizar sua precisa identificação para garantir que não se trate da espécie CABYV. Por ser um vírus de RNA fita simples, a principal técnica molecular observada nos trabalhos levantados para sua detecção e identificação é a de RT-PCR, realizada em etapa única ou em duas etapas consecutivas. Existe uma grande diversidade de conjuntos de *primers*, propostos em diferentes trabalhos, para a identificação da espécie (Boubourakas et al., 2006; Knierim et al., 2010). Após análise dos mesmos, sugere-se utilizar a metodologia e o conjunto de *primers* propostos no trabalho de Choi e colaboradores (2015). Nesse trabalho, para realizar a caracterização molecular de isolados de CABYV, foi proposta a utilização do conjunto de *primers* CABYV-CP-For e CABYV-CP-Rev,

os quais foram projetados para amplificar o gene que codifica a proteína de revestimento do vírus (CP), considerando isolados de referência disponíveis no GenBank. Esse conjunto de *primers* foi utilizado com sucesso não só para a identificação, mas também análises filogenéticas da espécie e foi usado em trabalhos subsequentes que também visavam identificar esse vírus (Khanal e Ali, 2018). Os mesmos se encontram descritos na Tabela abaixo:

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
CABYV-CP-For	5'- ATGAATACGGCCGCGGCTAGAAATC - 3'
CABYV-CP-Rev	5'- CTATTTCGGGTTCTGGACCTGGCA - 3'

Referências Bibliográficas:

Boubourakas, I. N., Avgelis, A. D., Kyriakopoulou, P. E., & Katis, N. I. (2006). Occurrence of yellowing viruses (Beet pseudo-yellow virus, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucurbit aphid-borne yellows virus*) affecting cucurbits in Greece. *Plant Pathology*, 55(2), 276-283.

CABI (2021). *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (Cucurbit aphid-borne yellows). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/110067>. Acesso em: 31 de março de 2021.

Choi, S. K., Yoon, J. Y., & Choi, G. S. (2015). Biological and molecular characterization of a Korean isolate of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* infecting *Cucumis* species in Korea. *The plant pathology journal*, 31(4), 371.

Costa, T. M., Blawid, R., Aranda, M. A., Freitas, D. M. S., Andrade, G. P., Inoue-Nagata, A. K., & Nagata, T. (2019). *Cucurbit aphid-borne yellows virus* from melon plants in Brazil is an interspecific recombinant. *Archives of Virology*; 164:249-254.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 31 de março de 2021.

Kassem, M. A., Sempere, R. N., Juárez, M., Aranda, M. A., & Truniger, V. (2007). *Cucurbit aphid-borne yellows virus* Is Prevalent in Field-Grown Cucurbit Crops of Southeastern Spain. *Plant Disease*, 91(3), 232–238.

Khanal, V., & Ali, A. (2018). First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* infecting *Cucurbita pepo* in Oklahoma. *Plant Disease*, 102(5), 1046.

Knierim, D., Deng, T. C., Tsai, W. S., Green, S. K., & Kenyon, L. (2010). Molecular identification of three distinct *Polerovirus* species and a recombinant *Cucurbit aphid-borne yellows virus* strain infecting cucurbit crops in Taiwan. *Plant pathology*, 59(5), 991-1002.

Kwak, H.R., Lee, H.J., Kim, E.A., Seo, J.K., Kim, C.S., Lee, S.G., Kim, J.S., Choi, H.S., Kim, M. Complete Genome Sequences and Evolutionary Analysis of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* Isolates from Melon in Korea. *Plant Pathol J.* Dec;34(6):532-543.

Vidal, A. H., Sanches, M. M., Alves-Freitas, D. M. T., Abreu, E. F. M., Lacorte, C., Pinheiro-Lima, B., ... Ribeiro, S. G. (2018). First World Report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* Infecting Passionfruit. *Plant Disease*. doi:10.1094/pdis-04-18-0694-pdn.

II.16 *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Alsuviricetes*
Ordem: *Martellivirales*
Família: *Closteroviridae*
Gênero: *Crinivirus*
Espécie: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

Motivo da inclusão na lista:

O vírus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) é o agente causador de doença que acomete extensivamente várias plantas da família Cucurbitaceae causando a redução do número de flores e frutos e do vigor das plantas (Luis-Arteaga et al. 1998). Dentre os demais sintomas, o mais comum é que plantas afetadas por esse vírus apresentem manchas cloróticas, amarelamento e nanismo severo, resultando em reduções importantes na produção de plantas infectadas, com consequências econômicas correspondentes (Marco & Aranda, 2005). Esse vírus é transmitido pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*), contudo, se multiplica apenas nas plantas infectadas, não se tendo registros de multiplicação no inseto vetor (Louro et al., 2000; CABI, 2021). Dessa maneira, a principal forma tanto de introdução quanto de disseminação do vírus a longas distâncias é por meio do deslocamento de plantas contaminadas (CABI, 2021). Esse patógeno já está bem distribuído mundialmente, principalmente em áreas quentes e temperadas, não havendo registros de sua ocorrência apenas na América do Sul e Oceania. Em contrapartida, na Ásia atualmente há 10 países com registros dessa doença, seguido da Europa com 8 países, África com 4 e América do Norte com 3 países (CABI, 2021). Embora no Brasil não se tenha registro dessa doença, o fato de possuímos inúmeras plantas tanto cultivadas como nativas (Moura, 2017) pertencentes à família Cucurbitaceae, as quais podem vir a ser hospedeiras e afetadas por esse vírus, torna-se imprescindível o controle da introdução desse patógeno no território nacional.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Crinivirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie CYSDV. Este é um vírus de RNA e, portanto, para sua identificação molecular é preciso, inicialmente, realizar a transcrição reversa do seu RNA em cDNA. Dentre os métodos moleculares levantados para a identificação/detecção desse vírus e que ainda são usados recentemente, podemos citar principalmente a RT-PCR convencional (Kousik et al., 2020), além da amplificação da polimerase de recombinação de transcrição reversa isotérmica (exo RT-RPA) via *real time* (Kalischuk et al., 2020). Contudo, para fins apenas de identificação, a RT-PCR tem se mostrado eficaz, sendo vastamente utilizada com sucesso nos trabalhos. Dentre eles, sugere-se utilizar o método convencional desenvolvido por Kousik e colaboradores (2020). Neste trabalho, foram realizadas duas RT-PCR para a identificação de CYSDV, na primeira delas foi realizada a amplificação do gene da proteína de revestimento (CP) utilizando-se os *primers* CysCP5206F e

CysCP5600R. Para as amostras positivas na primeira RT-PCR foi realizada, em seguida, a amplificação do gene Hsp70h utilizando-se os *primers* CYShspF e CYShspR para garantir, de forma mais confiável, a identificação do vírus. Os *primers* descritos haviam sido previamente projetados em trabalhos anteriores e podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
CysCP5206F	5'- TTTGGAAAAGAACCTGACGAG -3'	Polston et al. 2008
CysCP5600R	5'- TTCATCAACAGATTGGCTGC -3'	Polston et al. 2008
CYShspF	5'- TGATGTATG-ACTTCGGAGGAGGAAC -3'	Kuo et al. 2007
CYShspR	5' -TCAGCGGACAAA-CCACCTTTC-3'	Kuo et al. 2007

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17070#2123352D-A0B2-42AE-920C-D0B204489B52>. Acesso em: 05 de abril de 2021.

Kalischuk, M. L., Roberts, P. D., & Paret, M. L. (2020). A rapid fluorescence-based real-time isothermal assay for the detection of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in squash and watermelon plants. *Molecular and Cellular Probes*, 53, 101613.

Kousik, Chandrasekar S., and Scott Adkins. (2020) Detection of *Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus* Infecting Watermelon in South Carolina. p. 133-134.

Kuo, Y. W., Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., & Wintermantel, W. M. (2007). First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in California and Arizona, in association with *Cucurbit leaf crumple virus* and *Squash leaf curl virus*. *Plant Disease*, 91(3), 330-330. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-3-0330B>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

Louro, D., Vicente, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P. (2000). *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (genus *Crinivirus*) associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. *Plant Disease*, 84(10):1156; 2 ref. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.10.1156A>. Acesso em: 05 de abril de 2021.

Luis-Arteaga, M., Alvarez, J.M., Alonso-Prados, J.L., Bernal, J.J., Garcia-Arenal, F., Lavina, A., Batlle, A. and Moriones, E. (1998) Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease* 82: 979–982. Disponível em <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.9.979>. Acesso em 05 de abril de 2021.

Marco, C. F., & Aranda, M. A. (2005). Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Journal of General Virology*, 86(3), 815-822.

Moura, B. E. L. D. (2017). Estudos taxonômicos e morfopolínicos das Cucurbitáceas do Estado de Goiás, Brasil. Disponível em file:///tmp/mozilla_ubiana0/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Beryl%20Eirene%20Lutz%20de%20Moura%20-%202017.pdf. Acesso em 04 de abril de 2021.

Polston, J. E., Hladky, L. L., Akad, F., & Wintermantel, W. M. (2008). First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in cucurbits in Florida. *Plant disease*, 92(8), 1251-1251. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-8-1251B>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

II.17 *Deformed wing vírus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Iflaviridae*
Gênero: *Iflavirus*
Espécie: *Deformed wing virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Deformed wing virus* (DWV) é um vírus que infecta abelhas, sendo um dos mais bem descritos dada a sua estreita associação com a espécie *Varroa destructor*. Este ácaro ectoparasita causa um enfraquecimento agudo da abelha parasitada que, ao ter a resposta imune defasada, permite que o vírus se multiplique em densidades elevadas e isto acaba levando toda a colmeia à morte (de Miranda e Genersch, 2010). A ocorrência e distribuição de DWV tem sido relatada mundialmente e com sintomas característicos, dentre os quais as abelhas acometidas apresentam asas encolhidas e amassadas e tamanho corporal reduzido, além da presença de descoloração em abelhas adultas (Chen e Siede, 2007). Brettell e colaboradores (2017) ressaltam que em colônias não expostas a *V. destructor* também há detecção de DWV, porém neste caso observa-se abelhas assintomáticas. Além disso, destacam que este vírus consiste em uma ampla diversidade de variantes. No Brasil, são descritos relatos de infecção por DWV causando perdas de colmeias em São Paulo (Teixeira et al., 2008), por toda a região Nordeste do país, bem como Santa Catarina, Goiás, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Roraima (Souza et al., 2019), tendo diversas espécies de abelhas nativas brasileiras do gênero *Melipona* como hospedeiras silvestres. Adicionalmente, também acomete a espécie *Apis mellifera* de apiários comerciais, como relatado pelos autores. Em todo território nacional são descritas mais de 400 espécies de abelhas nativas, conhecidas como abelhas sem ferrão ou por nomes populares como Jataí, Mandaçaia, Mirim, Plebeia, Uruçu e outros, pertencentes aos gêneros *Melipona*, *Trigona* e *Plebeia*. Muitas são classificadas como endêmicas e de papel crucial para a vegetação que ao ser utilizada na produção do mel e da própolis, são polinizadas e completam seu ciclo reprodutivo durante a coleta do pólen pelas abelhas (Santos, 2010). No caso de *A. mellifera*, apesar de não ser uma espécie nativa brasileira, Modro e colaboradores (2011) destacam seu papel fundamental na polinização de espécies vegetais de mais de 40 famílias botânicas localizadas em Minas Gerais, sendo as principais Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae e Bignoniaceae, e dão destaque que no estudo realizado, cerca de 62% das plantas visitadas eram nativas brasileiras. Nas regiões de

Caatinga, Muniz e colaboradores (2020) destacam que *A. mellifera* é considerada como agente polinizador da maioria das espécies estudadas no bioma. Desta maneira, devido ao fato do vírus afetar espécies nativas brasileiras, a importância ecológica e econômica das abelhas em geral, sejam elas nativas ou não, os impactos ambientais que poderiam ocorrer também às espécies de vegetais que dependem deste organismo para a polinização e reprodução, além da diversidade de variantes que este vírus apresenta, recomenda-se a não utilização do DWV.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Iflavirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie DWV. Por ser um vírus de RNA, a principal técnica molecular observada nos trabalhos levantados para sua detecção e identificação consiste na técnica de RT-PCR, além de *real time* RT-PCR (Teixeira et al., 2008; Rodríguez et al., 2014; Brettell et al., 2017; Souza et al., 2019). Entre elas, a técnica de RT-PCR foi a mais utilizada pela maioria dos autores, apresentando resultados precisos e relativamente de menor custo (Chen e Siede, 2007). Dentre os trabalhos levantados, sugere-se a utilização do protocolo proposto por Rodríguez e colaboradores (2014), no qual uma RT-PCR foi realizada para a identificação do vírus utilizando-se os *primers* DWV-F e DWV-R. Esses *primers* foram descritos anteriormente por Tentcheva e colaboradores (2004) e permitem a amplificação de um produto de 395 bp específico do vírus. As sequências dos *primers* descritos estão discriminadas na tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências	Referência
DWV-F	5'- TTTGCAAGATGCTGTATGTGG - 3'	Tentcheva et al., 2004
DWV-R	5'- GTCGTGCAGCTCGATAGGAT - 3'	

Referências Bibliográficas:

Brettell, L.E.; Mordecai, G.J.; Schroeder, D.C.; Jones, I.M.; Da Silva, J.R.; Vicente-Rubiano, M.; Martin, S.J. (2017). A Comparison of *Deformed wing virus* in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. *Insects*, 8, 28.

Chen, Y.P. e Siede, R. (2007). Chapter 2: Honey Bee Viruses. *Adv Virus Res.*; 70:33-80.

De Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). *Deformed wing virus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S48–S61.

Modro, A.F.H., Message, D., da Luz, C.F.P., Alves, J.A., e Neto, M. (2011). Flora de Importância Polinífera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG1. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.35, n.5, p.1145-1153.

Muniz, V.I.M de S., Nascimento, J.E.M., Félix, J.A., Alves, J.E. (2020). Nicho polínico de *Apis mellifera* L. na Caatinga durante a floração de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*; 18:e18006.

Rodríguez, M., Vargas, M., Antúnez, K., Gerding, M., Ovídio Castro, F., & Zapata, N. (2014). Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío Region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(2), 170–177.

Santos, A.B. (2010). Abelhas nativas: polinizadores em declínio. *Natureza on line*; 8 (3): 103-106. ISSN 1806–7409.

Souza, F.S. de., Kevill, J. L., Correia-Oliveira, M. E., Carvalho, C. A. L. de & Martin, S. J. (2019). Occurrence of *Deformed wing virus* variants in the stingless bee *Melipona subnitida* and honey bee *Apis mellifera* populations in Brazil. *Journal of General Virology*; 100:289–294.

Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., & Evans, J. D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1), 117–119.

Tentcheva, D., Gauthier, L., Jouve, S., Canabady-Rochelle, L., Dainat, B., Cousserans, F., et al. (2004). Polymerase chain reaction detection of *Deformed wing virus* (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35:431-439.

II.18 *Duck hepatitis A virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Picornaviridae*
Gênero: *Picornavirus*
Espécie: *Avihepatovirus A*

Motivo da inclusão na lista:

O *Duck hepatitis A virus* (DHAV-1) é um vírus de RNA que causa a hepatite viral em aves no geral, mas principalmente em patos, sendo caracterizado como uma infecção viral aguda altamente contagiosa e com altas taxas de mortalidade (50–95%) (Hisham et al., 2020). Relatado em diversos países da Ásia, e também em Moldávia, na Hungria e nos EUA, causando sinais gerais de fraqueza, paresia, paralisia das pernas e membros superiores e alterações oftalmológicas, como a enoftalmia (olhos fundos), aumento da mortalidade em bandos, efeito opistótono (tipo de posição anormal causada por fortes espasmos musculares) e morte súbita nas aves infectadas (CABI, 2021). A disseminação pode ocorrer em longas distâncias, ainda que em áreas isoladas, pois o fato de muitas aves serem migratórias deve ser considerado. De acordo com o ICMBio (2017), são registradas em todo o mundo cerca de 10.426 espécies de aves (dados da *BirdLife International*), das quais 1.919 são encontradas no Brasil, segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO). Isto coloca o Brasil dentre os três países detentores da maior diversidade de aves do mundo e apesar da grande maioria das espécies passarem todo o ciclo de vida em território brasileiro, algumas vêm do hemisfério Norte, do sul da América do Sul ou de países a oeste do Brasil, passando apenas parte do ciclo de vida em nosso país. Foi encontrado um registro da doença causada pelo patógeno em marrecos de criação relatado por Corrêa (1957), para o Brasil, mas não houve relatos mais recentes. Acredita-se que o controle do vírus no país, nos locais de criação, seja devido à vacinação das aves (Hisham et al., 2020). Assim, o fato de DHAV-1 afetar aves como um grupo em geral é um problema, pois sua utilização pode representar um alto risco à biodiversidade de aves brasileiras, uma vez que as espécies de vida livre não são vacinadas contra o patógeno.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Picornavirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie DHAV. Este é um vírus de RNA e, portanto, as técnicas moleculares para sua identificação passam pela transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA, sendo a RT-PCR e a *real time* RT-PCR as mais comumente utilizadas nos trabalhos. Esse vírus, atualmente, é subdividido em três sorotipos, sorotipos DHAV-1, DHAV-2 e DHAV-3. Considerando os trabalhos levantados, muitos autores propõem metodologias para detectar e identificar apenas alguns desses sorotipos específicos em reações únicas ou duplex (Yang et al., 2008; Soliman et al., 2015; Wen et al., 2014). Dessa maneira, após análise desses trabalhos, sugere-se a utilização da

abordagem descrita no trabalho de Fu e colaboradores (2008), pois eles projetaram um par de *primers* espécie-específico, DHAV PCR-1 e DHAV PCR-2, desenhado para amplificar regiões 5' não traduzidas (5' UTR) totalmente conservadas nos três sorotipos disponíveis a partir de ensaios de RT-PCR. Esses *primers* foram desenhados após o alinhamento de todos os genomas dos sorotipos disponíveis e se mostraram capazes de detectá-los em geral, sendo ainda muito usado em trabalhos recentes (Hisham et al., 2020). Os mesmos estão descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
DHAV PCR-1	5' – CCTCAGGAAGTCTGGA – 3'
DHAV PCR-2	5' – GGAGGTGGTGCTGAAA – 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Duck hepatitis A virus. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/84185>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

Fu, Y., Pan, M., Wang, X., Xu, Y., Yang, H., & Zhang, D. (2008). Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens. *Veterinary microbiology*, 131(3-4), 247-257.

Hisham, I., Ellakany, H. F., Selim, A. A., Abdalla, M. A., Zain El-Abideen, M. A., Kilany, W. H., ... & Elbestawy, A. R. (2020). Comparative Pathogenicity of Duck Hepatitis A Virus-1 Isolates in Experimentally Infected Pekin and Muscovy Ducklings. *Frontiers in veterinary science*, 7, 234.

ICMBio (2017). Aves – Amazônia. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/2798-aves-amazonia>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

Soliman, M., Alfajaro, M. M., Lee, M. H., Jeong, Y. J., Kim, D. S., Son, K. Y., ... & Kang, M. I. (2015). The prevalence of duck hepatitis A virus types 1 and 3 on Korean duck farms. *Archives of virology*, 160(2), 493-498.

Wen, X. J., Cheng, A. C., Wang, M. S., Jia, R. Y., Zhu, D. K., Chen, S., ... & Chen, X. Y. (2014). Detection, differentiation, and VP1 sequencing of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 by a 1-step duplex reverse-transcription PCR assay. *Poultry science*, 93(9), 2184-2192.

Yang, M., Cheng, A., Wang, M., & Xing, H. (2008). Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type1. *Journal of virological methods*, 153(1), 55-60.

II.19 *Eggplant mottled dwarf virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Negarnaviricota*

Classe: *Monjiviricetes*

Ordem: *Mononegavirales*

Família: *Rhabdoviridae*

Gênero: *Alphanucleorhabdovirus*

Espécie: *Eggplant mottled dwarf alphanucleorhabdovirus*

Motivo da inclusão na lista:

Eggplant mottled dwarf alphanucleorhabdovirus (EMDV) é um vírus de RNA que causa doença em representantes das famílias Solanaceae, Malvaceae, Cucurbitaceae, Liliaceae, Amaranthaceae e Piperaceae e plantas ornamentais como Pitósporo-japonês, Madressilva, Sardinheiras e Hibisco (Pappi et al., 2015). Plantas infectadas podem apresentar folhas deformadas de intensidade variável, que também podem exibir aspecto enrugado e com descolorações cloróticas a amarelas. Os sintomas foliares podem ser acompanhados de nanismo leve a grave e falta de frutas. As flores aparentemente não são afetadas, enquanto os frutos, quando presentes, são pequenos, deformados e ásperos por rachaduras. Há relatos de casos em poucos países da África, Ásia e Europa, bem como na Austrália (CABI, 2021; Miglino et al., 2013). Não foram encontrados registros de casos ocorrendo no Brasil. EMDV é listado como um vírus invasivo no Compendium de Espécies Invasivas disponibilizado pelo CABI. Por isso, devido à ampla gama de hospedeiros que possui e, adicionalmente, ao fato de possuir características de invasividade, a introdução deste fitopatógeno tem potencial de causar desequilíbrio ambiental, pois representantes das famílias hospedeiras possuem importância ambiental, sendo utilizadas como alimento para diversas espécies, além de possuírem alguns representantes nativos do Brasil, principalmente das famílias Solanaceae e Cucurbitaceae, que compõem a flora brasileira (Flora do Brasil, 2020). Por tais motivos, recomenda-se a não utilização de EMDV.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Alphanucleorhabdovirus*, é preciso confirmar que não se trate, especificamente, da espécie EMDV. Por ser um vírus de RNA, para sua identificação, é necessário realizar a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA e a técnica mais comumente utilizada é a de RT-PCR. Na última década alguns autores propuseram diferentes *primers* direcionados para a identificação específica dessa espécie (Choi et al., 2013; R. Miglino et al., 2013; Tang et al., 2015). Após análise dos trabalhos levantados, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Desbiez e colaboradores (2019), que para identificar e avaliar a diversidade molecular de vírus infectantes de membros dos gêneros *Cucurbita* e *Solanum* projetaram e propuseram *primers* específicos para a identificação de genes do EMDV, os quais demonstraram serem capazes de promover sua identificação. Os *primers* desenvolvidos no referido trabalho podem ser visualizados na Tabela abaixo:

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
EMDV-3500-5	5'- GCATTGAGTTYTTCTATGAGGG - 3'
EMDV-4656-3	5'- CCTGCTTGATTGACTATCTC – 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Eggplant mottled dwarf virus (Tomato vein yellowing virus)*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/20496>. Acesso em: 06 de abril de 2021.

Choi, H., Cho, W. K., Yu, J., Lee, J. S., & Kim, K. H. (2013). Highly specific detection of five exotic quarantine plant viruses using RT-PCR. *The plant pathology journal*, 29(1), 99.

Desbiez, C., Verdin, E., Moury, B., Lecoq, H., Millot, P., Wipf-Scheibel, C., ... & Huseynova, I. (2019). Prevalence and molecular diversity of the main viruses infecting cucurbit and solanaceous crops in Azerbaijan. *European Journal of Plant Pathology*, 153(2), 359-369.

Flora do Brasil (2020). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 06 de abril de 2021.

Migolino, R., Sorrentino, R., De Stradis, A., Zoina, A., & Alioto, D. (2013). Necrotic potato tubers infected by *Eggplant mottled dwarf virus* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 619-621.

Pappi, P. G., Chaintoutis, S. C., Dovas, C. I., Efthimiou, K. E., & Katis, N. I. (2015). Development of one-tube real-time qRT-PCR and evaluation of RNA extraction methods for the detection of *Eggplant mottled dwarf virus* in different species. *Journal of Virological Methods*, 212, 59–65.

Tang, J., Elliott, C., Ward, L. I., & Iqram, A. (2015). Identification of *Eggplant mottled dwarf virus* in PEQ *Hibiscus syriacus* plants imported from Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 10(1), 1-3.

II.20 *Faba bean necrotic yellows virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Monodnaviria*

Reino: *Shotokuvirae*

Filo: *Cressdnaviricota*

Classe: *Arfiviricetes*

Ordem: *Mulpavirales*

Família: *Nanoviridae*

Gênero: *Nanovirus*

Espécie: *Faba bean necrotic yellows virus*

Motivo da inclusão na lista:

Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) é o agente causador de uma doença que atinge várias espécies de diferentes gêneros da família Fabaceae, tais como *Vigna*, *Vicia*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Mendicago*, dentre outros, além de algumas espécies das famílias Apocynaceae, Solanaceae e Amaranthaceae, sendo as principais plantas acometidas, o feijão fava e o grão-de-bico (Kraberger et al., 2018; CABI, 2021). Embora os sintomas dessa doença variem um pouco entre as espécies infectadas, dentre os principais observados estão inclusos uma clorose nos tecidos foliares, a qual se desenvolve em necrose e leva à morte das plantas infectadas em períodos inferiores a dois meses após a infecção (Makkouk et al., 2012). A sua transmissão ocorre com auxílio de pulgões vetores (Franz et al., 1998), e não se sabe ainda se o FBNYV pode ser transmitido também pela semente ou por meios mecânicos (Makkouk et al., 2012). Quanto à distribuição mundial da doença causada pelo FBNYV, pode se observar que desde 1988, quando sua presença foi relatada pela primeira vez na Síria, se espalhou por grande parte da Ásia, com registros em nove países; da África, com registros em oito países, além da Espanha, que compreende o único país europeu com registro para essa doença até o momento (CABI, 2021). No Brasil ainda não se têm registros dessa doença, contudo dado ao fato de se tratar de um vírus considerado invasivo (CABI, 2021), além de possuir uma ampla gama de plantas de diferentes famílias que podem ser acometidas, torna-se de crucial importância o controle da entrada e uso desse patógeno no nosso país. Principalmente porque ele poderia vir a afetar espécies cultivadas (Embrapa, 2015) ou presentes na nossa flora nativa, já que possuímos diversos representantes nativos das famílias e até mesmo gêneros afetados pelo vírus (Amorim et al., 2016).

Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Nanovirus*, é preciso identificar para confirmar que não se trate da espécie FBNYV. Esse é um vírus de DNA fita simples e tem sido identificado por muitos trabalhos utilizando-se ELISA, além de outros imunoensaio com anticorpos mono e policlonais (Makkouk et al., 2012). Além desses métodos, outros moleculares baseados em PCR também são comumente utilizados, como a IC-PCR (PCR com imunocaptura) e a PCR convencional, a qual tem se mostrado eficiente na identificação do vírus em diferentes trabalhos (Shamloul et al., 1999; Kumari et al., 2010). Sendo assim, dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar a metodologia proposta por Kumari e colaboradores (2010) na qual foram realizadas duas PCR para a identificação da espécie, sendo a primeira delas a partir de *primers*

mais gerais projetados pelos autores para amplificar diferentes espécies do gênero Nanovirus, sendo eles Nano F103 e NanoR10. Em seguida foi realizada a PCR com *primers* projetados por eles especificamente para cada espécie do gênero investigada e no caso do FBNYV foram utilizados os conjuntos FBNYV C5F e FBNYV C5R. Os *primers* mencionados se encontram descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências
Nano F103	5'- ATTGTATTTGCTAATTTTA - 3'
NanoR10	5'- TTCCCTTCTCCACCTTGT - 3'
FBNYV C5F	5'- TACAGCTGTCTTTGCTTCCT - 3'
FBNYV C5R	5' – CGCGGAGTAATTAAATCAAAT - 3'

Referências Bibliográficas

Amorim, L. D. M. D., Sousa, L. D. O. F. D., Oliveira, F. F. M., Camacho, R. G. V., & Melo, J. I. M. D. (2016). Fabaceae na Floresta Nacional (FLONA) de Assú, semiárido potiguar, nordeste do Brasil. *Rodriguésia*, 67(1), 105-124.

CABI (2021). Datasheet: *Faba bean necrotic yellows virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/23945>. Acesso em: 06 de abril de 2021.

Embrapa (2015) Grão-de-bico BRS Aleppo. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2213/grao-de-bico-brs-aleppo>. Acesso em: 06 de abril de 2021.

Franz, A., Makkouk, K. M., & Vetten, H. J. (1998). Acquisition, retention and transmission of *Faba bean necrotic yellows virus* by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Journal of Phytopathology*, 146(7), 347-355.

Kraberger, S., Kumari, S. G., Najar, A., Stainton, D., Martin, D. P., & Varsani, A. (2018). Molecular characterization of *Faba bean necrotic yellows viruses* in Tunisia. *Archives of virology*, 163(3), 687-694.

Kumari, S. G., Rodoni, B., Vetten, H. J., Loh, M. H., Freeman, A., Van Leur, J., ... & Wang, X. (2010). Detection and partial characterization of Milk vetch dwarf virus isolates from faba bean (*Vicia faba* L.) in Yunnan Province, China. *Journal of phytopathology*, 158(1), 35-39.

Makkouk, K., Pappu, H., & Kumari, S. G. (2012). Virus diseases of peas, beans, and faba bean in the Mediterranean region. *Advances in virus research*, 84, 367-402.

Shamloul, A. M., Hadidi, A., Madkour, M. A., & Makkouk, K. M. (1999). Sensitive detection of banana bunchy top and *Faba bean necrotic yellows viruses* from infected leaves, in vitro tissue cultures, and viruliferous aphids using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(4), 326-337.

II.21 *Gill-associated virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Nidovirales*
Família: *Roniviridae*
Gênero: *Okavirus*
Espécie: *Gill-associated virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Gill-associated virus* (GAV) faz parte do complexo de vírus da doença da cabeça amarela (tipo 2) e, portanto, está intimamente relacionado ao vírus da cabeça amarela altamente virulento do tipo 1 (YHV1). Trata-se de um vírus de genoma de RNA (Noble et al., 2017). GAV ocorre em alta prevalência em *Penaeus monodon* selvagem e cultivado, mas é relatado em outras espécies de peneídeos em experimentos laboratoriais (CABI, 2021). A patogênese causada por infecção aguda de GAV pode resultar em perdas significativas. A transmissão vertical de GAV da cria para a progênie parece ser o principal meio pelo qual a infecção é perpetuada em populações selvagens (Munro et al., 2011). Foram identificados relatos de casos apenas na Austrália e na Tailândia, não sendo registrados, portanto, casos no Brasil (CABI, 2021). Todavia, GAV é considerado um vírus invasivo pelo CABI, no Compendium de Espécies Invasivas e o Brasil é o quinto maior produtor mundial de camarões, com destaque para a criação de *Penaeus brasiliensis* no litoral nordestino, uma espécie nativa e de grande importância econômica e ecológica da família dos peneídeos (Nunes, 2001). Devido aos impactos ambientais que poderiam ocorrer à espécie nativa de camarão, associado à sua característica de invasividade e ao alto risco de transmissão vertical, recomenda-se a não utilização deste vírus.

Método de identificação:

Quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Okavirus*, é preciso confirmar que não se trate, especificamente, da espécie GAV. Por ser um vírus de RNA, as principais técnicas moleculares observadas nos trabalhos levantados para sua detecção e identificação consistem nas técnicas de RT-PCR, além de *nested*-RT-PCR (Cowley, et al., 2000; Munro et al., 2011) e, ainda, a real time RT-PCR em alguns deles (Wijegoonawardane et al., 2010). Dentre todas, a técnica de *nested*-RT-PCR demonstra ser mais robusta que o RT-PCR e vem sendo mais utilizada nos trabalhos mais recentes. Dessa maneira e por possuir menor custo operacional em relação ao real time RT-PCR, indica-se utilizá-la para a identificação dessa espécie. Dentre esses trabalhos, sugere-se a utilização do protocolo proposto por Cowley e colaboradores (2000), no qual uma *nested* RT-PCR foi realizada utilizando-se inicialmente os *primers* GAV-5 e GAV-6 para a amplificação de 618 pb de uma ORF desse vírus que contém 781 pb. Na segunda amplificação, foram utilizados os conjuntos de *primers* GAV-1 e GAV-2 com o objetivo de amplificar 317 pb do amplicon obtido por GAV5/GAV6. As sequências dos *primers* descritos estão discriminadas na tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
GAV-5	5'- AACTTTGCCATCCTCGTCAC - 3'
GAV-6	5'- TGG ATGTTGTGTGTTCTCAAC - 3'
GAV-1	5' - ATCCATACTACTCTAAACTTCC - 3'
GAV-2	5' - GAATITCTCGAACAACAGACG - 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Gill-associated virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/81380>. Acesso em: 01 de abril de 2021.

Cowley, J. A., Dimmock, C. M., Spann, K. M., & Walker, P. J. (2000). Detection of Australian *Gill-associated virus* (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39(3), 159-167.

Munro, J., Callinan, R., & Owens, L. (2011). *Gill-associated virus* and its association with decreased production of *Penaeus monodon* in Australian prawn farms. *Journal of fish diseases*, 34(1), 13-20.

Noble, T. H., Coman, G. J., Cowley, J. A., Wade, N., Sellars, M. J., & Jerry, D. R. (2017). Comparison of methods for uniformly challenging Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) with *Gill-associated virus*. *Aquaculture*, 473, 191–196.

Nunes, A.J.P, (2001). Nota técnica Panorama da aquicultura. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/> Acesso em: 29 de março de 2021.

Wijegoonawardane, P. K., Cowley, J. A., & Walker, P. J. (2010). A consensus real-time RT-PCR for detection of all genotypic variants of yellow head virus of penaeid shrimp. *Journal of virological methods*, 167(1), 5-9.

II.22 Groundnut Bud Necrosis Virus

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Negarnaviricota*
Classe: *Ellioviricetes*
Ordem: *Bunyavirales*
Família: *Tospoviridae*
Gênero: *Orthotospovirus*
Espécie: *Groundnut Bud Necrosis Virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Groundnut Bud Necrosis Virus* (GBNV) é o patógeno que causa a necrose do botão do amendoim, na qual os sintomas observados incluem manchas ou manchas cloróticas leves, que se desenvolvem em anéis e estrias necróticas e cloróticas; a necrose do botão terminal, sintomas secundários como o retardo de crescimento, proliferação de ramos axilares e malformação de folhetos. Pode causar ainda o raquitismo, se as plantas forem infectadas precocemente. As sementes dessas plantas são pequenas, enrugadas, manchadas e descoloridas (Reddy et al., 1995). GBNV também é conhecido por infectar várias safras, incluindo representantes das famílias Fabaceae (feijão, feijão-nhemba, feijão-mungo, soja e ervilha), Malvaceae (quiabo), Amaryllidaceae (cebola) e Solanaceae (tomate e batata) (Holkar et al., 2016). A distribuição de GBNV foi relatada apenas na Índia e em regiões próximas às fronteiras do país (Tabassum et al., 2017). Não foram identificados relatos de casos de GBNV no Brasil. Apesar disto, ressalta-se que no país há espécies de amendoim nativos, como o *Arachis pintoi* e *Arachis burkartii*, ambos utilizados para forrageio por espécies de animais nativos, bem como de criação e de grande importância para as regiões de cerrado (EMBRAPA, 2001). E, para além de representantes do hospedeiro principal de GBNV, o país conta com representantes nativos de todas as famílias citadas como possíveis hospedeiros, além de espécies endêmicas, como o *Griffinia* sp., da família Amaryllidaceae (Flora do Brasil, 2020; Alves-Araújo et al., 2007). Tendo em vista os dados apresentados, ainda que não se tenham registro de ocorrência de GBNV no Brasil, destaca-se a gravidade da fitopatologia causada por este fungo e seu potencial de infecção em um número elevado de famílias que abrigam milhares de espécies constantes da flora brasileira, das quais algumas são nativas, e por estes motivos, recomenda-se a não utilização desta espécie de vírus.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas no nível de espécie, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Orthotospovirus*, é preciso confirmar que não se trate, especificamente, da espécie GBNV. Por ser um vírus de RNA, para sua identificação, é necessário realizar a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA e, após levantamento dos trabalhos, observou-se que a técnica mais comumente utilizada é a de RT-PCR a partir de *primers* para regiões específicas desse vírus. Apenas ela tem se mostrado eficaz e capaz de identificar essa espécie e continua sendo a mais utilizada em trabalhos recentes (Ghosh et al., 2019; Rai et al., 2020a). Dentre as abordagens observadas, sugere-se a utilização daquela descrita no trabalho de Rai e colaboradores (2020b), que para confirmar a detecção

e identidade do vírus utilizaram, por meio de RT-PCR, *primers* específicos para a amplificação de fragmentos do gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo (NP) de GBNV, propostos no trabalho de Holkar e colaboradores (2016): Gs1F e GWs1R. Os mesmos estão descritos na Tabela abaixo:

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
Gs1F	5' – ATGGTTGAAAAGAGCAAGAATGATGC - 3'
GWs1R	5' - CTTCTT(A/T)GA(A/G)TGT(AC/T)CACCATA(A/G)TCATCC– 3'

Referências Bibliográficas:

Alves-Araújo, A., Francisco de Assis Ribeiro dos Santos, F. de A. dos.; Alves, M. (2007). Caracterização palinológica de espécies de Amaryllidaceae *sensu stricto* ocorrentes no nordeste brasileiro. *Acta bot. bras.* 21(4): 967-976.

EMBRAPA – Circular Técnica 43. (2001): Amendoim Forrageiro cv. Belmonte: Leguminosa para a diversificação das Pastagens e Conservação do Solo no Acre. ISSN 0100-9915, Rio Branco, AC.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

Ghosh, A., Basavaraj, Y. B., Jangra, S., & Das, A. (2019). Exposure to *Watermelon bud necrosis virus* and *Groundnut bud necrosis virus* alters the life history traits of their vector, *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Archives of virology*, 164(11), 2799-2804.

Holkar, S. K., Kumar, R., Yogita, M., Katiyar, A., Jain, R. K., & Mandal, B. (2016). Diagnostic assays for two closely related *Tospovirus* species, *Watermelon bud necrosis virus* and *Groundnut bud necrosis virus* and identification of new natural hosts. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 26(1), 43-51.

Rai, A. K., Basavaraj, Y. B., Sadashiva, A. T., Reddy, M. K., Ravishankar, K. V., Hussain, Z., ... & Reddy, K. M. (2020)a. Evaluation of tomato genotypes for resistance to bud necrosis disease caused by *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV). *Crop Protection*, 131, 105074.

Rai, A. K., Sadashiva, A. T., Basavaraj, Y. B., Venugopalan, R., Rao, E. S., & Nandeesha, P. (2020)b. Genetic analysis of bud necrosis disease caused by *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Euphytica*, 216(8), 1-10.

Reddy, D.V.R., Buiel, A.A.M., Satyanarayana, T., Dwi vedi, S.L., Reddy, A.S., Ratna, A.S., Vijaya Lakshmi, K., Ranga Rao, G.V., Naidu, R.A., and Wightman, J.A. (1995). Peanut bud necrosis disease: an overview. Pages 3-7 in Recent studies on peanut bud necrosis disease: proceedings of a Meeting, 20 Mar.

Tabassum, A., Bhat, B. N., Sudini, H. (2017). Reaction of Groundnut Advanced Breeding Lines to Groundnut Bud Necrosis Disease. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(10): 1790-1802.

II.23 *Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Monodnaviria*

Reino: *Shotokuvirae*

Filo: *Cossaviricota*

Classe: *Quintoviricetes*

Ordem: *Piccovirales*

Família: *Parvoviridae*

Gênero: *Penstyldensovirus*

Espécie: *Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* (IHHNV) causa a necrose infecciosa hipodérmica e hematopoiética em camarões peneídeos, que resulta em crescimento irregular prejudicado e deformidades cuticulares. Afeta principalmente as espécies *Farfantepenaeus californiensis* (camarão de perna amarela), *Farfantepenaeus duorarum* (camarão rosa do Norte), *Penaeus monodon* (camarão tigre gigante) e *Penaeus semisulcatus* (camarão tigre verde). Na aquicultura comercial, o crustáceo pode ser infectado simultaneamente pelo Vírus da síndrome da mancha branca (White spot syndrome virus - WSSV) e por IHHNV, o que agrava o quadro do hospedeiro (Park et al., 2020). Sua distribuição é mundial em populações de camarões peneídeos selvagens e de criação (CABI, 2020). Não foram encontrados relatos de infecção por IHHNV no Brasil e segundo a OIE (2009), o país é livre da infecção por IHHNV em seus criadouros. Como destacado em fichas do mesmo produto, as quais os hospedeiros eram camarões peneídeos, o Brasil ocupa a quinta posição mundial no ranking de produtores de camarões, principalmente da espécie *Penaeus brasiliensis* no litoral nordestino, se destacando como uma espécie nativa e de grande importância econômica e ecológica (Nunes, 2001). Tendo estes dados apresentados, recomenda-se a não utilização de IHHNV, devido aos possíveis impactos ambientais e econômicos que sua introdução poderia causar a diferentes espécies de camarões peneídeos, incluindo a espécie nativa brasileira.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas para a espécie IHHNV, quando houver pedidos de registro de vírus do gênero *Penstyldensovirus* (antigo *Brevidensovirus*), é preciso realizar a sua precisa identificação para garantir que não se trata dessa espécie em questão. Foram encontrados muitos trabalhos que utilizam técnicas de qPCR para a detecção e identificação do vírus (Tang et al., 2001). Entretanto, de acordo com a literatura, apenas a PCR é altamente sensível e robusta para detecção de IHHNV, sendo a escolha dos *primers* importante porque existem múltiplas variantes do vírus e nem sempre eles são capazes de permitir a identificação de todas (Rai et al., 2012). Há uma grande diversidade de trabalhos propondo o uso de diferentes *primers* para esse fim e sugere-se a utilização conjunta de dois pares de *primers* propostos no manual de testes diagnósticos para animais aquáticos da OIE (OIE, 2003) por terem sido capazes de detectar com sucesso todas as variantes genéticas conhecidas de IHHNV. O conjunto 77012F / 77353R amplifica uma região gênica que codifica proteínas

estruturais do vírus (proteína de revestimento) e o conjunto 389F / R é projetado para amplificar regiões que codificam proteínas não estruturais do vírus (ORF 1). Os *primers* descritos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
389F	5'- CGGAACACAACCCGACTTTA - 3'
389R	5'- GGCCAAGACCAAAATACGAA - 3'
77012F	5'- ATCGGTGCACTACTCGGA - 3
77353R	5'- TCGTACTGGCTGTTCATC - 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/59940>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

Nunes, A.J.P, (2001). Nota técnica Panorama da aquicultura. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/> Acesso em: 29 de março de 2021.

OIE (2003). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Paris: Office International des Epizooties; Fourth Edition.

OIE. (2009). World Animal Health Information Database - Version: 1.4., Paris, France: World Organization for Animal Health. Disponível em: <https://www.oie.int/>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

Park, S. C., Choi, S.-K., Han, S.-H., Park, S., Jeon, H. J., Lee, S. C., ... Han, J. E. (2020). Detection of *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* and white spot syndrome virus in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) imported from Vietnam to South Korea. *Journal of Veterinary Science*, 21(2).

Rai, P., Safeena, M. P., Krabsetsve, K., La Fauce, K., Owens, L., & Karunasagar, I. (2012). Genomics, molecular epidemiology and diagnostics of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 203-214.

Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Diseases of aquatic organisms*, 44(2), 79-85.

II.24 *Kashmir bee virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Dicistroviridae*
Gênero: *Aparavirus*
Espécie: *Kashmir bee virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Kashmir bee virus* (KBV) é um vírus que infecta abelhas principalmente do gênero *Apis* em diferentes estágios de desenvolvimento, mas os sintomas da doença não são claramente definidos. Ele se multiplica rapidamente assim que algumas partículas virais são introduzidas na hemolinfa da abelha e pode causar a mortalidade em 3 dias (Chen e Siede, 2007). Semelhante ao que ocorre com outros vírus do gênero, KBV pode representar uma ameaça mais letal para as colônias de abelhas em combinação com o ácaro parasita *Varroa destructor* (Siede et al., 2005). Apesar de ser relatado mundialmente, não foram encontrados trabalhos atestando sua presença em apiários comerciais, bem como em abelhas nativas do Brasil. Entretanto, apesar de espécies do gênero *Apis* não serem nativas brasileiras, Modro e colaboradores (2011) destacam seu papel fundamental na polinização de espécies vegetais de mais de 40 famílias botânicas localizadas em Minas Gerais, sendo as principais Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae e Bignoniaceae, e dão destaque que no estudo realizado, cerca de 62% das plantas visitadas eram nativas brasileiras. Nas regiões de Caatinga, Muniz e colaboradores (2020) destacam que *A. mellifera* é considerada como agente polinizador da maioria das espécies estudadas no bioma. Nas regiões de Cerrado, Mendonça e colaboradores (2008) demonstraram que a espécie *A. mellifera* foi responsável pela polinização de 30 famílias botânicas, principalmente Melastomataceae, Bignoniaceae, Malpighiaceae, Myrtaceae, Fabaceae e Asteraceae. Foi destacado também que em cerrados de São Paulo, Mato Grosso e Minas Gerais, cerca de 75% das espécies de plantas são polinizadas de forma exclusiva, primária ou secundária por abelhas, nativas ou não, tendo estas papel crucial para a manutenção das comunidades. Desta maneira, dada a importância ecológica e econômica das abelhas *Apis* sp., considerando os impactos ambientais que poderiam ocorrer aos vegetais que dependem deste polinizador para a reprodução, e visando prevenir sua disseminação em território nacional, recomenda-se a não utilização do KBV.

Método de identificação:

Quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Aparavirus* é preciso confirmar que não se trate especificamente da espécie KBV. Seu material genético é composto por RNA e as técnicas moleculares descritas nos trabalhos levantados para sua detecção e identificação são principalmente RT-PCR e *real time* RT-PCR (Ward et al., 2007; Siede et al., 2005; Teixeira et al., 2008; de Miranda et al., 2010). Considerando-se todos os trabalhos levantados, devido à robustez e menor custo sugere-se a utilização do protocolo proposto por Miranda e colaboradores (2010), no qual uma RT-PCR foi realizada utilizando-se os *primers* KBV-F e KBV-R, descritos anteriormente por Antunez e colaboradores (2006). Esses *primers* são responsáveis por amplificar uma parte do gene RdRp do vírus, gerando um produto de 414 bp. As sequências dos *primers* descritos estão discriminadas na tabela abaixo

<i>Primers</i>	Sequências	Referência
KBV-F	5'- GATGAACGTCGACCTATTGA - 3'	Antunez et al., 2006
KBV-R	5'- TGTGGGTTGGCTATGAGTCA - 3'	

Referências Bibliográficas:

Antunez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P. (2006). Honey bee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 93 (1), 67–70.

Chen, Y.P. e Siede, R. (2007). Chapter 2: Honey Bee Viruses. *Adv Virus Res.*; 70:33-80.

De Miranda, J. R., Cordoni, G., & Budge, G. (2010). The *Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus* complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S30–S47.

Mendonça, K., Marchini, L.C., Souza, B. de A., Almeida-Anacleto, D. de., e Moreti, A. C. de C. C. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. *Neotropical Entomology* 37(5):513-521.

Modro, A.F.H., Message, D., da Luz, C.F.P., Alves, J.A., e Neto, M. (2011). Flora de Importância Polínifera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG1. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.35, n.5, p.1145-1153.

Muniz, V.I.M de S., Nascimento, J.E.M., Félix, J.A., Alves, J.E. (2020). Nicho polínico de *Apis mellifera* L. na Caatinga durante a floração de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*; 18:e18006.

Siede, R., Derakhshifar, I., Otten, C., Berényi, O., Bakonyi, T., Köglberger, H. & Büchler, R. (2005) Prevalence of *Kashmir bee virus* in central Europe, *Journal of Apicultural Research*, 44:3, 129-129.

Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., & Evans, J. D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1), 117–119.

Ward, L., Waite, R., Boonham, N., Fisher, T., Pescod, K., Thompson, H., ... Brown, M. (2007). First detection of *Kashmir bee virus* in the UK using real-time PCR. *Apidologie*, 38(2), 181–190.

II.25 *Little cherry virus 1*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Alsuviricetes*
Ordem: *Martellivirales*
Família: *Closteroviridae*
Gênero: *Velarivirus*
Espécie: *Little cherry virus 1*

Motivo da inclusão na lista:

Little cherry virus 1 (LCV1) é um dos agentes causadores da doença da cereja pequena (LChD), que se espalhou pelo mundo afetando árvores de cerejas doces e azedas (Komorowska et al., 2020). Contudo, alguns estudos demonstram que a faixa de hospedeiro de LCV1 tem se ampliado e atualmente já se conhecem relatos desta doença em ameixas, pêssegos, amêndoas e damascos, o que faz com que ele atinja um grande número de espécies do gênero *Prunus*, da família Rosaceae (Matic et al., 2007; Safarova et al., 2017). Essa doença pode causar descoloração dos frutos com redução do teor de açúcar, além de resultar em frutos pequenos, angulares e pontiaguados. Adicionalmente, causa também o avermelhamento precoce das folhas, manchas necróticas angulares, marrons, áreas cloróticas enferrujadas, atrofiamento severo e morte das árvores ou pode ainda, em alguns casos, ser assintomática (Reeves & Cheney, 1963; Matic et al., 2007; Komorowska et al., 2020). A respeito da sua transmissão, observa-se que ocorre principalmente por meio do plantio de árvores infectadas, assim como da brotação e enxertia com a utilização de tecido infectado. Entretanto, não são conhecidos vetores de LCV1 (Karasev, 2000). Acredita-se que essa doença teve origem no Japão e se espalhou pela China e por grande parte da Europa, sendo reportada em pelo menos 7 países europeus. Também tem sido reportada na América do Norte, principalmente no Canadá e nos Estados Unidos, e na Oceânia tem sido reportada apenas na Nova Zelândia (CABI, 2021). No Brasil não se tem registros dessa doença, contudo visto que no nosso território possui uma grande diversidade de plantas nativas da família Rosaceae e, inclusive, do gênero *Prunus*, que consiste no gênero afetado por esse vírus, tais como a espécie pessegueiro-do-mato (*Prunus myrtifolia*) (Marcuzzo et al., 2019), reforça-se o alerta para a necessidade de uma rígida vigilância para controlar a sua entrada e utilização no país.

Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Velarivirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie LCV1. De acordo com os trabalhos levantados, a técnica de RT-PCR a partir de *primers* projetados para amplificar regiões específicas desse vírus é a mais utilizada para sua identificação. Dessa maneira, sugere-se a utilização da metodologia descrita no trabalho de Safarova e colaboradores (2020), que foi voltada para a detecção desse vírus por RT-PCR convencional, seguido de sequenciamento Sanger e análise filogenética das sequências obtidas. Neste trabalho, foram utilizados dois conjuntos de *primers* projetados em trabalhos anteriores para

amplificar diferentes regiões do genoma de LCV1 com o objetivo de realizar sua identificação em plantas de damasco contaminadas, o que foi realizado com sucesso. O primeiro conjunto usado foi LCV_1U_16390/LCV_1L_16809, visando amplificar uma sequência de 419 pb da ORF8 e o segundo conjunto usado foi 1LC_12776F/1LC_13223R, que amplificou um fragmento de 449 pb do gene da proteína de revestimento desse vírus. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Referência</i>
LCV_1U_16390	5'-TCCGCCTGAAGCACCTAATCCA -3'	Rott & Jelkmann (2001)
LCV_1L_16809	5'-GGTAAGCGGTATAAAAACCCTCCTCT -3'	Rott & Jelkmann (2001)
1LC_12776F	5'- TCAAGAAAAGTTCTGGTGTGC3-3'	Glasa et al. (2015)
1LC_13223R	5' -CGAGCTAGACGTATCAGTATC3-3'	Glasa et al. (2015)

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Little cherry virus*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16072>. Acesso em: 09 de abril 2021.

Glasa, M., Benediková, D., & Predajňa, L. (2015). First report of *Little cherry virus-1* in Slovakia. *Journal of Plant Pathology*, 97(3).

Karasev, A. V. (2000). Genetic Diversity and Evolution of Closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 38(1), 293–324.

Komorowska, B., Hasiów-Jaroszewska, B., & Czajka, A. (2020). Occurrence and detection of *Little cherry virus 1*, *Little cherry virus 2*, *Cherry green ring mottle virus*, *Cherry necrotic rusty mottle virus*, and *Cherry virus A* in stone fruit trees in Poland. *Acta virologica*, 64(1), 100-103.

Marcuzzo, S. B., Araújo, M. M., & Gasparin, E. (2014). Plantio de espécies nativas para restauração de áreas em unidades de conservação: um estudo de caso no sul do Brasil. *Floresta*, 45(1), 129-140.

Matic, S., Myrta, A., & Minafra, A. (2007). First report of *Little cherry virus 1* in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89(Suppl. 3). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083005708>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

Reeves, E. L., & Cheney, P. W. (1963). Flowering cherries as symptomless hosts of *Little cherry virus*. *Phytopathologia Mediterranea*, 184-190.

Rott, M. E., & Jelkmann, W. (2001). Detection and Partial Characterization of a Second Closterovirus Associated with Little Cherry Disease, *Little cherry virus-2*. *Phytopathology*, 91(3), 261–267.

Šafářová, D., Ševčíková, V., Neumanová, K., Suchá, J., Nečas, T., & Navrátil, M. (2020). Molecular characterisation of *Little cherry virus 1* infecting apricots in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 158(1), 83-97.

II.26 *Nepovirus* sp.

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Pisuviricota*

Classe: *Pisoniviricetes*

Ordem: *Picornavirales*

Família: *Secoviridae*

Gênero: *Nepovirus*

Espécies: *Cherry leaf roll virus*, *Raspberry ringspot vírus* e *Potato black ringspot virus*.

Motivo da inclusão na lista:

Os *Nepovirus* são vírus icosaédricos e têm um genoma de RNA. Representam o maior gênero de vírus dentro da ordem Picornavirales com 38 espécies reconhecidas (base na publicação de 2015 do ICTV), das quais três têm destaque como patógenos de uma ampla gama de hospedeiros, sendo elas *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Raspberry ringspot vírus* (RpRSV) e *Potato black ringspot virus* (PBRSV) (CABI, 2021; EPPO, 2021; Fuchs et al., 2017). Os *Nepovirus* são descritos infectando uma ampla gama de hospedeiros que inclui espécies selvagens e cultivadas de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Fuchs et al., 2017), compreendendo representantes das famílias Rosaceae, Solanaceae, Vitaceae, Adoxaceae, Betulaceae, Fabaceae, Amaranthaceae e Cucurbitaceae (CABI, 2021; EPPO 2021). Os sintomas observados podem variar de acordo com a espécie do vírus e do hospedeiro em questão, mas os danos gerais observados incluem mancha anelar clorótica, mancha negra, geralmente em tubérculos, e manchas com centro necrótico (EPPO, 2021). Os Nepovírus têm distribuição mundial, porém são mais prevalentes em países de clima temperado e subtropical (CABI, 2021). Não foram encontrados registros de infecção pelas três espécies citadas no Brasil. Todavia, devido à ampla gama de hospedeiros, a introdução deste fitopatógeno tem potencial de causar desequilíbrio ambiental, pois representantes das famílias citadas possuem importância não apenas econômica, mas como alimento e forrageio para diversas espécies em diferentes nichos, além de agruparem espécies nativas, com representantes endêmicas do país (Flora do Brasil, 2021). Portanto, dado o alto risco para representantes da flora brasileira, recomenda-se o impedimento da introdução e utilização destes fitopatógenos no país.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso se estender ao gênero, quando houver pedidos de utilização de vírus da família *Secoviridae*, é preciso realizar a identificação para confirmar também que não se trata de um *Nepovirus*. Por ser um gênero de vírus de RNA, para a identificação, é necessário realizar, primeiramente, a transcrição reversa dos RNAs em cDNA. Dentre as principais técnicas moleculares utilizadas para essa identificação, além da RT-PCR, observou-se também o uso de *nested*-RT-PCR (Lee et al., 2013), IC-RT-PCR (Werner et al., 1997) e *real time* RT-PCR (Osman et al., 2014). Após pesquisa bibliográfica, observou-se que a maioria dos trabalhos propôs a utilização de *primers* para identificar apenas uma única ou poucas espécies do gênero em ensaios *multiplex* (Digiario et al., 2007) e não foi encontrado um trabalho que propusesse um único conjunto de *primers* capazes de detectar

todas essas espécies. Assim, após análises dos trabalhos e como forma de otimizar a identificação das espécies do gênero, sugere-se utilizar os protocolos descritos nos trabalhos de Wei & Clover (2008) e Kumari (2009). Wei & Clover (2008) desenvolveram e otimizaram dois protocolos genéricos de RT-PCR convencional para detectar nepovírus usando dois conjuntos de *primers* degenerados projetados para amplificar parte do gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) desses vírus. Esses *primers* foram capazes de detectar praticamente todas as espécies do gênero, com exceção das espécies que afetam plantas do gênero *Prunus*, tais como CLRV. Kumari (2009) projetou um *primer* espécie-específico para identificação da espécie CLRV por RT-PCR, a partir de regiões conservadas da espécie. Os diferentes *primers* sugeridos estão descritos na Tabela abaixo:

Espécie (s)	Sequências dos <i>primers</i> (<i>foward/reverse</i>)	Referências
ArMV/GFLV/PBRVSV/ TRSV/ RpRSV/CoNV	NepoA-F: 5' – ACDTCWGARGGITAYCC – 3' NepoA-R: 5' – RATDCCYACYTGRCWIGGCA – 3'	Wei & Clover (2008)
CNSV/TBRV	NepoB-F: 5' – TCTGGITTTGCYTTRACRGT – 3' NepoB-R: 5' – CTTRTCACTVCCATCRGTAA – 3'	Wei & Clover (2008)
CLRV	CLRV 1: 5' – CATTTCATGCGACCGGTCTT – 3' CLRV 2: 5' – AGTCCGACACTCATACAATAAGC - 3'	Kumari (2009)

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Cherry leaf roll virus* (walnut ringspot). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16077>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

Digiario, M., Elbeaino, T., & Martelli, G. P. (2007). Development of degenerate and species-specific *primers* for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 34-40.

EPPO. (2021). *Cherry leaf roll virus*. Disponível em: https://gd.eppo.int/taxon/CLRV00/distribution/US_wa. Acesso em: 09 de abril de 2021.

_____. (2021). *Potato black ringspot virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/PBRVSV0>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

_____. (2021). *Raspberry ringspot virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/RPRSV0>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

Fuchs, M., Schmitt-Keichinger, C., & Sanfaçon, H. (2017). A Renaissance in Nepovirus Research Provides New Insights Into Their Molecular Interface With Hosts and Vectors. *Advances in Virus Research*, 61–105.

Kumari, S. (2009). Detection of *Cherry leaf roll virus* and *Strawberry latent ring spot virus* by one-step RT-PCR. *Plant Protection Science*, 45(4), 140-143.

Lee, S., Kang, E. H., Shin, Y. G., & Lee, S. H. (2013). Development of RT-PCR and *nested* PCR for detecting four quarantine plant viruses belonging to Nepovirus. *Research in Plant Disease*, 19(3), 220-225.

Osman, F., Al Rwahnih, M., & Rowhani, A. (2014). Improved detection of ilarviruses and nepoviruses affecting fruit trees using quantitative RT-QPCR. *Journal of Plant Pathology*, 96(3), 577-583.

Wei, T., & Clover, G. (2008). Use of *primers* with 5' non-complementary sequences in RT-PCR for the detection of *Nepovirus* subgroups A and B. *Journal of virological methods*, 153(1), 16-21.

Werner, R., Mühlbach, H. P., & Büttner, C. (1997). Detection of Cherry leaf roll Nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *European Journal of Forest Pathology*, 27(5), 309-318.

II.27 *Newcastle disease virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Negarnaviricota*

Classe: *Monjiviricetes*

Ordem: *Mononegavirales*

Família: *Paramyxoviridae*

Gênero: *Metaavulavirus*

Espécie: *Newcastle disease virus* (Avian avulavirus 1)

Motivo da inclusão na lista:

Newcastle disease virus (NDV) é o agente etiológico da doença de Newcastle (ND) que é uma doença altamente contagiosa que afeta uma ampla gama de espécies de aves domésticas e selvagens por todo o mundo e que pode ser transmissível aos humanos. A doença tem enorme impacto ambiental e econômico e é classificada como doença de notificação obrigatória pela OIE (Abdisa e Tagesu, 2017). Os sintomas são observados no trato respiratório (dispnéia e respiração ofegante), no sistema circulatório (cianose), no trato gastrointestinal (dilatação, catarro e muco espumoso na faringe) e no sistema nervoso (ataxia, paralisia e torcicolo). O vírus é altamente letal, chegando a uma taxa de mortalidade de quase 100% em bandos de aves não vacinados (Brown e Bevins, 2017). São registrados casos de epidemia em diversos países da África, Ásia, Europa, América do Norte, e na Bolívia, Colômbia e Venezuela. O NDV é considerado uma espécie invasiva pelo CABI, no Compendium de Espécies Invasivas e é destacado que as aves domésticas/criação e de vida livre de muitas espécies, que geralmente são capturadas na natureza em países onde o NDV é endêmico, podem introduzir o patógeno em um país livre da doença (CABI, 2021). No Brasil, Souza e colaboradores (2018) relatam um surto isolado em pombos (*Columba livia*), que podem ter migrado de países vizinhos e que foram diagnosticados com o patógeno, em Porto Alegre, no Sul do país. Considerando que a abrangência da infecção se dá em nível de classe, incluindo todas as aves como possíveis hospedeiros conforme dados levantados no texto, dados a conhecida característica de invasividade e os prejuízos ambientais e econômicos que seriam desencadeados caso o vírus NDV fosse introduzido, recomenda-se sua não utilização, visando a proteção da biodiversidade brasileira de aves.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas no nível de espécie, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Metaavulavirus*, é preciso confirmar que não se trate, especificamente, da espécie NDV. Este é um vírus de RNA e, portanto, as técnicas moleculares para sua identificação passam pela transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. Dentre as metodologias levantadas, além da utilização da técnica de RT-PCR, existem trabalhos que se baseiam na técnica de *real time* RT-PCR para a identificação do NDV (Rahman et al., 2016; Alsahami et al., 2018). Após análise das metodologias, observa-se que para fins apenas de identificação do vírus, a técnica de RT-PCR pode ser utilizada devido à sua capacidade de identificá-lo com sucesso e também ao seu baixo custo.

operacional. A maioria dos trabalhos que realizam a identificação do vírus pela RT-PCR convencional propõe utilizar como alvo para a projeção de *primers*, o gene que codifica a proteína de Fusão (F), que é uma proteína de membrana mediadora da fusão do envelope viral com as membranas da célula (Ashraf et al., 2016; Alsahami et al., 2018). Dentre eles, sugere-se utilizar a metodologia descrita no trabalho de Ashraf e colaboradores (2016) que utilizaram os *primers* NDV-F e NDV-R, propostos anteriormente no trabalho de Creelan e colaboradores (2002), para amplificar um fragmento de 202 pb do gene da proteína F e obter a identificação do vírus. Os *primers* descritos estão listados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências
NDV-F	5'- GGTGAGTCTATCCGGARGATACAAG - 3'
NDV-R	5'- TCATTGGTTGCRGCAATGCTCT - 3'

Referências Bibliográficas:

Abdisa, T., Tagesu, T. (2017) Review on Newcastle Disease of Poultry and its Public Health Importance. *Journal Vet. Sci. Technol.*; 8: 441.

Alsahami, A. A., Ideris, A., Omar, A., Ramanoon, S. Z., & Sadiq, M. B. (2018). Isolation, identification and molecular characterization of Newcastle disease viruses in vaccinated chickens from commercial farms in the Sultanate of Oman. *International journal of veterinary science and medicine*, 6(2), 248-252.

Ashraf, A., Shah, M. S. U. D., Habib, M., Hussain, M., Mahboob, S., & Al-Ghanim, K. (2016). Isolation, identification and molecular characterization of highly pathogenic *Newcastle disease virus* from field outbreaks. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.

Brown, V.R., Bevins, S.N. (2017). A review of virulent *Newcastle disease viruses* in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. *Vet. Res.*; 48, 68.

CABI (2021). *Newcastle disease virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/73357>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

Creelan, J. L., Graham, D. A., & McCullough, S. J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of Avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 31(5), 493-499.

Souza, Suyene O., Fredo, Gabriela, Dupont, Priscilla M., Leite-Filho, Ronaldo V., Teifke, Jens P., Pavarini, Saulo P., Canal, Cláudio W., & Driemeier, David. (2018). Pathological and molecular

findings of Avian avulavirus type 1 outbreak in pigeons (*Columba livia*) of southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(12), 2254-2261.

II.28 *Orthotospovirus* sp.

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Negarnaviricota*

Classe: *Ellioviricetes*

Ordem: *Bunyavirales*

Família: *Tospoviridae*

Gênero: *Orthotospovirus*

Espécies: *Tomato spotted wilt virus*, *Watermelon silver mottle virus*, *Groundnut bud necrosis orthotospovirus*, *Groundnut ringspot orthotospovirus*, *Groundnut yellow spot orthotospovirus*, *Impatiens necrotic spot orthotospovirus*, *Iris yellow spot orthotospovirus*, *Polygonum ringspot orthotospovirus*, *Tomato chlorotic spot orthotospovirus*, *Watermelon bud necrosis orthotospovirus*, *Watermelon silver mottle orthotospovirus*, *Zucchini lethal chlorosis orthotospovirus* e *Tospovirus Bean necrotic mosaic virus*.

Motivo da inclusão na lista:

Orthotospovirus são vírus com genoma de RNA que causam, de modo geral, retardo de crescimento severo, resultando em reduções no rendimento e na qualidade de mais de 1.090 espécies de plantas, pertencentes a 90 famílias (Nigam e Garcia-Ruiz, 2020). São descritas 39 espécies de *Orthotospovirus*, das quais o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) é considerada a espécie tipo para o gênero (ICTV, 2021) e uma espécie de grande importância ambiental e econômica, juntamente com *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), devido à ampla gama de hospedeiros que as duas espécies infectam (CABI, 2021, EPPO, 2021). Outras espécies como *Groundnut bud necrosis orthotospovirus* (GBNV), *Groundnut ringspot orthotospovirus* (GRSV), *Groundnut yellow spot orthotospovirus* (GYSV), *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* (INSV), *Iris yellow spot orthotospovirus* (IYSV), *Polygonum ringspot orthotospovirus* (PolRSV), *Tomato chlorotic spot orthotospovirus* (TCSV), *Watermelon bud necrosis orthotospovirus* (WBNV), *Watermelon silver mottle orthotospovirus* (WSMV) e *Zucchini lethal chlorosis orthotospovirus* (ZLCV) e *Tospovirus Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV) também são relatadas como espécies de grande importância, mas com infecção observada em hospedeiros mais específicos e geralmente de interesse agrícola (Sumida, 2020). A distribuição dos *Orthotospovirus* é considerada mundial, variando apenas a espécie por localidade de acordo com o clima e hospedeiros em questão e, no Brasil, foi relatada a presença de fitopatógenos do gênero em Goiás, Minas Gerais, Paraná, Bahia, Pernambuco e São Paulo (CABI, 2021). Nos casos dos vírus BeNMV e GRSV, há relatos de infecção em *Physalis pubescens* (presente nas áreas de Mata Atlântica) para o primeiro vírus e *Acanthospermum hispidum* e *Boerhavia diffusa* (nos estados de CE e RN), *Solanum ambrosiacum* (nas regiões do Nordeste e do Cerrado), *Solanum sessiliflorum*

(no estado do Amazonas), demonstrando que o controle destes vírus é de grande importância para a fitossanidade das espécies vegetais citadas, dada a sua importância para os biomas e regiões onde ocorrem e serem espécies nativas brasileiras (INFOPRAGA, 2021). Adicionalmente, dentre os hospedeiros afetados por representantes do gênero, estão famílias de grande importância populacional e ecossistêmica para a flora e fauna brasileiras, como membros das famílias Asteraceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae (Flora do Brasil, 2020), o que demonstra um alto risco para outras espécies nativas, podendo causar desequilíbrio para diferentes nichos. E, por tais motivos, recomenda-se a não utilização das espécies citadas do gênero *Orthotospovirus*.

Método de identificação:

Considerando que a restrição de uso se estende ao gênero, quando houver pedidos de utilização de vírus da família *Tospoviridae*, é preciso realizar a identificação para confirmar que não se trata de um *Orthotospovirus*. Por ser um gênero de vírus de RNA, para a identificação, é necessário realizar, primeiramente, a transcrição reversa dos RNAs em cDNAs. Dentre as principais técnicas moleculares utilizadas para essa identificação, além da RT-PCR em ensaios únicos ou *multiplex* (Zarzyńska-Nowak et AL., 2018), observou-se também o uso de RT-LAMP (Sui et al., 2018), RT-qPCR (Gallo et al., 2019) e ensaio de amplificação de polimerase de recombinase de transcrição reversa (RT-RPA) (Martinez1 & Rosa, 2020). Após pesquisa bibliográfica, observou-se uma grande diversidade de trabalhos voltados para a identificação de apenas uma única ou poucas espécies do gênero. Entretanto, após análises das regiões conservadas dos genomas das espécies disponíveis, Huang e colaboradores (2018) propuseram um par de *primers* degenerados, dTospo-F2 e dTospo-R2, projetados a partir de regiões consenso das sequências tospovirais de L RNA, os quais foram utilizados para detectar diversos tospovírus por meio de RT-qPCR de etapa única. Os *primers* foram capazes de amplificar todas as espécies testadas, dentre as quais WSMoV, TSWV, GBNV, INSV, IYSV, PolRSV, TCSV e WBNV, abordadas neste trabalho. Para identificar a espécie GYSV, Zheng e colaboradores (2020) propõem a utilização do mesmo par de *primer* abordado anteriormente (dTospo-F2 e dTospo-R2), e afirmam a sua eficácia também para a referida espécie e, por tal motivo, sugere-se sua utilização. Para a espécie BeNMV, sugere-se a metodologia proposta por de Oliveira e colaboradores (2012) com a utilização dos *primers* BeNMV-IRM-F1 e BeNMV-IRM-R1, responsáveis por amplificar o gene que codifica a extremidade do precursor da glicoproteína Gn/Gc e a região intergênica entre duas ORF's correspondentes ao precursor desta glicoproteína. Para a espécie GRSV, sugere-se considerar o trabalho de Webster e colaboradores (2011), onde os *primers* GRSV-N-v e GRSV-N-vc foram desenhados e utilizados com alta eficiência. Estes *primers* amplificam o gene N que codifica proteínas ligadas ao nucleocapsídeo do vírus. Para a espécie

ZLCV, sugere-se considerar a abordagem presente no trabalho de Aguiar e colaboradores (2018), que utilizaram os *primers* ZLCV-For e ZLCV-Rev, que amplificam genes responsáveis por codificar Nucleoproteínas do vírus. Todos os *primers* sugeridos estão descritos na Tabela abaixo:

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
dTospo-F2	5' - GATC AATCNAARTGGTCDGCWTC - 3'
dTospo-R2	5' - CATDGCACAAGARTGRTAVACWGA - 3'
BeNMV-IRM-F1	5' - GGCTGCAATAGATGAAGAGAATGAA - 3'
BeNMV-IRM-R1	5' - GCCCTTTTGATTCTGTTATGACTTG - 3'
GRSV-N-v	5' - AGAGCTTCCTTAGTGTTGTACTTAG - 3'
GRSV-N-vc	5' - GAAAGGTCTAGATCTAAACTGCCAC - 3'
ZLCV-For	5' - GAGTTTCACTGTAATGTTCCATAGC - 3'
ZLCV-Rev	5' - AGYTTTGAGATGATCAGTGTGT - 3'

Referências Bibliográficas:

Aguiar, R. W. S., Alves, G. B., Queiroz, A. P., Nascimento, I. R., & Lima, M. F. (2018). Evaluation of Weeds as Virus Reservoirs in Watermelon Crops. *Planta Daninha*, 36(0). doi:10.1590/s0100-83582018360100032.

CABI (2021). *Tomato spotted wilt virus* (Tomato spotted wilt). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/54086>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

de Oliveira, A.S., Melo, F.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., Kitajima, E.W., Resende, R.O. (2012) Characterization of *Bean Necrotic Mosaic Virus*: A Member of a Novel Evolutionary Lineage within the Genus *Tospovirus*. *PLoS ONE* 7(6): e38634.

EPPO. (2021). *Tomato spotted wilt virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/TSWV00>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

_____. *Watermelon silver mottle virus* (Tomato spotted wilt). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/54086>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 09 de abril de 2021.

Gallo, Y., Sierra, A., Muñoz, L., Marín, M., & Gutiérrez, P. A. (2019). Genome characterization of three *Alstroemeria necrotic streak orthotospovirus* (ANSV) isolates naturally infecting bell pepper (*Capsicum annuum*) in Antioquia (Colombia). *Tropical Plant Pathology*, 44(4), 326-334.

Huang, K. S., Li, S. L., Sun, J. H., Wang, Y. C., Jan, F. J., & Chen, T. C. (2018). Development of a generic method for inspection of tospoviruses. *European journal of plant pathology*, 150(2), 457-469.

INFOPRAGA. (2021). Praga: *Tospovirus Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV). Disponível: http://infopraga.cenargen.embrapa.br/ficha_praga.htm?idp=128532. Acesso em: 25 de junho de 2021.

INFOPRAGA. (2021). Praga: *Tospovirus Groundnut ringspot virus* (GRSV). Disponível: http://infopraga.cenargen.embrapa.br/ficha_praga.htm?idp=128536. Acesso em: 25 de junho de 2021.

Martinez, J. F. I., & Rosa, C. (2020). In-situ detection of *Tomato spotted wilt orthotospovirus* from crude plant extracts using Reverse Transcriptase-Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) in endpoint and real-time. *bioRxiv*, 720623.

Nigam, D., e Garcia-Ruiz, H. (2020). Variation Profile of the *Orthotospovirus* Genome. *Pathogens*, 9(7), 521.

Sui, X., Zhang, S., Wu, Z., & Ling, K. S. (2018). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for species-specific detection of *Tomato chlorotic spot orthotospovirus*. *Journal of virological methods*, 253, 56-60.

Sumida, C. H. (2020). Viral diseases of crops: a critical review. *Applied Plant Virology*, 471–474. doi:10.1016/b978-0-12-818654-1.00033-5.

Zarzyńska-Nowak, A., Hasiów-Jaroszewska, B., Korbecka-Glinka, G., Przybyś, M., & Borodynko-Filas, N. (2018). A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of *Tomato spotted wilt virus* and *Tomato yellow ring virus* in tomato plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(4), 580-586.

Zheng, K., Chen, T.C., Wu, K., Kang, Y.C., Yeh, S.D., Zhang, Z., Dong, J. (2020) Characterization of a New *Orthotospovirus* from Chilli Pepper in Yunnan Province, China. *Plant Dis.*, 104:1175-1182.

Webster, C. G., Reitz, S. R., Perry, K. L., & Adkins, S. (2011). A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology*, 413(2), 216–225.

II.29 *Peach mosaic virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Alsuviricetes*
Ordem: *Tymovirales*
Família: *Betaflexviridae*
Gênero: *Trichovirus*
Espécie: *Peach mosaic virus*

Motivo da inclusão na lista:

Peach mosaic virus (PMV) é uma espécie de vírus de genoma de RNA, que infecta naturalmente espécies do gênero *Prunus*. Apesar de ser mais associado ao pêssego (*Prunus pérsica*), o vírus foi descrito infectando diversas outras espécies do gênero como cereja-doce (*P. avium*), flor-de-cereja-ornamental (*P. serrulata*), damasco (*P. armeniaca*) e cereja-amarga-selvagem (*P. emarginata*) (Gispert et al., 1998). Os hospedeiros infectados apresentam sintomas de mosaico, manchas e deformidade nas folhas e frutos, retardo no desenvolvimento da folhagem e crescimento anormal dos ramos e sua distribuição é restrita ao México e aos EUA (CABI, 2021; EPPO, 2021). Não foram encontrados registros de casos no Brasil. Todavia, ressalta-se que há um representante nativo pertencente ao gênero *Prunus*, o pessegueiro-bravo, também denominado pessegueiro-do-mato, coração-de-negro e marcela-do-mato (*Prunus myrtifolia*) na flora brasileira, o qual tem ampla distribuição geográfica no país, sendo recomendado para arborização de represas, reposição de matas ciliares e reflorestamento de áreas degradadas (de Eston et al., 2007). Desta maneira, tendo em vista que espécies do gênero *Prunus* são hospedeiras do PMV, e que a introdução e disseminação deste fitopatógeno poderia representar risco à biodiversidade de plantas nativas brasileiras, recomenda-se sua não utilização.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Trichovirus*, é preciso confirmar, por meio de identificação molecular, que não se trata da espécie PcMV. Por ser um vírus de RNA, para sua identificação, é necessário realizar a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. Após pesquisa bibliográfica observou-se que para a identificação geral dessa espécie, a técnica mais comumente utilizada é a de RT-PCR a partir de *primers* para regiões específicas desse vírus e apenas ela tem se mostrado capaz e eficaz de identificar essa espécie. Durante muitos anos o principal par de *primers* utilizado para essa identificação foi o proposto no trabalho de James & Upton, 1999 (PM16AFF e PM16AFR), mas eles apresentavam reações cruzadas com outras espécies do gênero. Dessa maneira, recomenda-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de James e colaboradores (2006), que após analisarem a sequência completa do genoma de PcMV, desenharam e propuseram um outro conjunto de *primers* para amplificar uma região conservada do gene que codifica a replicase. Esse par de *primer*, PM-AF1 e PM-AFR, se mostrou específico, capaz de detectar todos os isolados disponíveis de PcMV e não apresentou reações cruzadas com outros vírus do mesmo gênero e família. Os *primers* desenvolvidos se encontram listados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
PM-AF1	5' - TCACCTTCTGCAGATACGAAGTA - 3 '
PM-AFR	5' - GCTGTTCTTCACAAAGAATCTA - 3 '

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). *Peach mosaic virus* (American mosaic of peach). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/54086>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

de Eston, M. R., Vallilo, M. I., Garbeltonni, M. L., Starzynski, R., & dos Santos, A. S. R. (2007). Aspectos químicos dos frutos de *Prunus myrtifolia* (L.) Urban,(Rosaceae) – Alimento de algumas aves silvestres 1. *Rev. Inst. Flor*, 19(1), 13-18.

EPPO. (2021). *Peach mosaic virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/PCMV00>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

Gispert, C., Perring, T. M., e Creamer, R. (1998). Purification and characterization of *Peach mosaic virus*. *Plant Dis.* 82:905-908.

James, D., & Upton, C. (1999). Single primer pair designs that facilitate simultaneous detection and differentiation of *Peach mosaic virus* and *Cherry mottle leaf virus*. *Journal of virological methods*, 83(1-2), 103-111.

James, D., Varga, A., Croft, H., Rast, H., Thompson, D., & Hayes, S. (2006). Molecular characterization, phylogenetic relationships, and specific detection of *Peach mosaic virus*. *Phytopathology*, 96(2), 137-144.

II.30 *Penaeus monodon nudivirus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Varidnaviria*
Reino: *Helvetiavirae*
Filo: *Dividoviricota*
Classe: *Naldaviricetes*
Ordem: *Lefavirales*
Família: *Nudiviridae*
Gênero: *Gammanudivirus*
Espécie: *Penaeus monodon nudivirus*

Motivo da inclusão na lista:

Penaeus monodon nudivirus (PmNV), anteriormente também denominado de *Penaeus monodon nucleopolyhedrovirus* (PemoNPV) ou *Penaeus monodon baculovirus* é um poliedrovírus de DNA de fita dupla. PmNV causa redução da taxa de crescimento de camarões peneídeos, e, em casos de infecções graves, pode causar mau funcionamento do túbulo hepatopancreático e epitélio do intestino médio seguido por infecção bacteriana secundária, resultando na morte do camarão (Nimitphak et al., 2010). A transmissão do PmNV é horizontal pela ingestão de tecido infectado (canibalismo), fezes, corpos de oclusão ou detritos e também água contaminados por vírus, o que o torna de fácil disseminação em água do mar, quando os tanques de criação têm contato com o ambiente natural. Sua ocorrência é relatada na Ásia, África, na Austrália e Nova Caledônia em ambientes naturais. No Taiti e Havaí, bem como em vários locais na América do Norte e do Sul e no Caribe, há relatos apenas nos estoques introduzidos do camarão *P. monodon* (OIE, 2019). Não foram encontrados registros de sua ocorrência no Brasil. Todavia, dada a possibilidade de interferência na fauna de peneídeos nativos brasileiros, somada à sua característica de fácil disseminação em ambientes naturais, e ainda se destacando a espécie *Penaeus brasiliensis*, como uma espécie nativa de grande importância econômica e ecológica (Nunes, 2001), recomenda-se a não utilização de PmNV, evitando a impactos ambientais e econômicos que sua introdução poderia causar à biodiversidade brasileira.

Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Gammanudivirus*, é preciso confirmar sua identificação para garantir que não se trata da espécie PmNV. Para a identificação desse vírus, foram encontradas diferentes metodologias na literatura: principalmente PCR convencional (Khawsak et al., 2008) *nested* PCR (Gangnonngiw et al., 2010) e mais recentemente a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) (Nimitphak et al., 2010).

Entretanto, apesar de haver a possibilidade de realizar a PCR convencional, para esse vírus a utilização da técnica de *nested* PCR demonstra ser mais robusta e a mais comumente utilizada com sucesso na maioria dos trabalhos. Independente da técnica, praticamente todos os trabalhos levantados propõem utilizar como alvo para a projeção de *primers*, o gene que codifica as poliedrinas (polH). Dentre eles, sugere-se a utilização da abordagem descrita no trabalho de Chaivisuthangkura e colaboradores (2009), que utiliza primeiramente o conjunto de *primers* MBV1.4F and MBV1.4, obtendo um amplicon de 533 pb e, em seguida a partir desse produto, os *primers* MBV1.4NF e MBV1.4NR, gerando um *nested amplicon* de 361 pb. Os *primers* descritos foram propostos anteriormente no trabalho de Belcher e colaboradores (1998) e se encontram descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências
MBV1.4F	5'- CGATTCCATATCGGCCGAATA – 3'
MBV1.4R	5'- TTGGCATGCACTCCCTGAGAT- 3'
MBV1.4NF	5'- TCCAATCGCGTCTGCGATACT - 3'
MBV1.4NR	5' – CGCTAATGGGGCACAAGTCTC – 3'

Referências Bibliográficas:

Belcher, C. R., & Young, P. R. (1998). Colourimetric PCR-based detection of *Monodon baculovirus* in whole *Penaeus monodon* postlarvae. *Journal of virological methods*, 74(1), 21-29.

Chaivisuthangkura, P., Srisuk, C., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sridulyakul, P., & Sithigorngul, P. (2009). Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of virological methods*, 162(1-2), 188-193.

Gangnonngiw, W., Laisutisan, K., Sriurairatana, S., Senapin, S., Chuchird, N., Limsuwan, C., ... & Flegel, T. W. (2010). *Monodon baculovirus* (MBV) infects the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* cultivated in Thailand. *Virus research*, 148(1-2), 24-30.

Khawsak, P., Deesukon, W., Chaivisuthangkura, P., & Sukhumsirichart, W. (2008). Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp. *Molecular and cellular probes*, 22(3), 177-183.

Nimitphak, T., Meemetta, W., Arunrut, N., Senapin, S., & Kiatpathomchai, W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. *Molecular and cellular probes*, 24(1), 1-5.

Nunes, A.J.P, (2001). Nota técnica Panorama da aquicultura. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/> Acesso em: 29 de março de 2021.

OIE (2019). Chapter 2.2.10.: Spherical baculovirosis (*Penaeus monodon* - type *Baculovirus*). In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.

II.31 *Potato latent virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Kitrinoviricota*
Classe: *Alsuviricetes*
Ordem: *Tymovirales*
Família: *Betaflexiviridae*
Gênero: *Carlavirus*
Espécie: *Potato latent virus*

Motivo da inclusão na lista:

Potato latent virus (PotLV) é o agente causador de doença que acomete plantas da família Solanaceae, especialmente a batata (*Solanum tuberosum*), além de várias espécies de tabaco (*Nicotiana bigelovii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. Tabacum*) e de fisalis (*Physalis floridana*) (Bratney et al., 2002; EPPO 2021). Esse vírus tem sido transmitido por vetores como o pulgão da espécie *Myzus persicae* (Loebenstein et al., 2001) e no estudo de Bratney e colaboradores (2002), 36 de 41 cultivares de batata foram infectadas pelo PotLV quando inoculadas, demonstrando assim a possibilidade de transmissão mecânica desse vírus. Contudo, as infecções causadas por esse vírus parecem ser assintomáticas pelo menos na maioria das plantas, mas ainda é necessário um maior conhecimento acerca desse processo infeccioso (Bratney et al., 2002), o que reforça a necessidade de se investigar esse vírus em plantas que serão transplantadas, especialmente nos estoques de batatas e sementes. Esse vírus foi descoberto e caracterizado na década de 90, sendo detectado na América do Norte (Estados Unidos e Canadá), além de um banco de germoplasma importado da Escócia (Goth et al., 1999; Loebenstein et al., 2001). No Brasil não se tem registro desse vírus, contudo para proteção das plantas que já são hospedeiras conhecidas dele e estão presentes no território nacional e principalmente espécies nativas da família Solanaceae e que poderiam ser afetadas pelo vírus, torna-se importante a vigilância visando o controle da introdução e utilização desse patógeno no país. Dentre as plantas nativas em riscos destacam-se, inclusive, nossas espécies nativas do gênero *Nicotiana*, tais como *N. alata*, *N. bonariensis*, *N. forgetiana*, *N. longiflora* e *N. mutabilis* (Vignoli-Silva & Mentz, 2005).

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas para a espécie PotLV, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Carlavirus* é preciso confirmar que não se trate dessa espécie em questão. De acordo com os trabalhos levantados, a técnica de RT-PCR a partir de *primers* projetados para amplificar regiões específicas desse vírus tem sido utilizada na sua identificação. Após análise das metodologias, sugere-se a utilização da abordagem realizada no trabalho de Nie (2010), que realizou a detecção desse vírus em diferentes hospedeiros inoculados por RT-PCR convencional. Neste trabalho foram desenhados e investigados oito pares diferentes de *primers* que cobriam várias partes distintas do genoma de PotLV. Considerando os resultados obtidos e a eficiência de amplificação, os autores propuseram a utilização de um desses conjuntos, sendo eles 1000F e 1000R, responsáveis por

amplificar um fragmento específico de PotLV de 353 pb, correspondente aos nucleotídeos de 1407 a 1759 e que permitiu uma melhor identificação deste vírus em amostras de folhas e tubérculos de batata. Os *primers* mencionados se encontram descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
1000F	5'- AGGTACGAGCAGGGTGAGAA -3'
1000R	5'-GCAATTGCCTTAACCCTTGA-3'

Referências Bibliográficas:

Bratney, C., Badge, J. L., Burns, R., Foster, G. D., George, E., Goodfellow, H. A., ... & Jeffries, C. J. (2002). Potato latent virus: a proposed new species in the genus *Carlavirus*. *Plant pathology*, 51(4), 495-505.

EPPO (2021). Datasheet: *Potato latent virus*. Disponível em <https://gd.eppo.int/taxon/POTLV0> Acesso em 10 de abril 2021.

Goth, R .. W., Ellis,P.J., Villiers,G., Goins,E.W. and Wright,N.S. (1999) Characteristics and distribution of *Potato latent carlavirus* (*Red LaSoda virus*) in North America. *Plant Dis.*83: 751-753

Loebenstein, G., Berger, P. H., & Brunt, A. A. (Eds.). (2001). Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Springer Science & Business Media.

Nie, X. (2010). Preliminary assessment of resistance of potato varieties to *Potato latent virus*. *American journal of potato research*, 87(1), 78-82.

Vignoli-Silva, M., & Mentz, L. A. (2005). O gênero *Nicotiana* L.(Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Botânica.*, 60(2), 151-173.

II.32 *Ranavirus* sp.

Classificação taxonômica:

Realm: *Varidnaviria*

Reino: *Bamfordvirae*

Filo: *Nucleocytoviricota*

Classe: *Megaviricetes*

Ordem: *Pimascovirales*

Família: *Iridoviridae*

Gênero: *Ranavirus*

Espécies: *Bohle Iridovirus*, *Epizootic hematopoietic necrosis virus*, *European catfish virus*, *European sheatfish virus* e *Saint-Cooper ranavirus*.

Motivo da inclusão na lista:

Os *Ranavirus* são grandes vírus icosaédricos com genomas de DNA de fita dupla que infectam vertebrados de sangue frio, incluindo peixes, anfíbios e répteis de um modo geral (Lesbarrères et al., 2012). A espécie tipo é o Frog virus 3 (FV3), porém outras espécies são descritas no gênero, incluindo o vírus Bohle (*Bohle Iridovirus* - BIV), o vírus da necrose hematopoiética epizootica (*Epizootic hematopoietic necrosis virus* - EHNV), o vírus do peixe-gato europeu (*European catfish virus* - ECV), o vírus do peixe-boi europeu (*European sheatfish virus* - ESV) e o *Ranavirus* Santee-Cooper (*Saint-Cooper ranavirus* - SCR). Existem muitas outras espécies provisórias neste gênero. A infecção por *Ranavirus* é uma das duas únicas doenças notificáveis de anfíbios listadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2019). Embora muitos órgãos possam ser afetados durante a evolução da doença, o fígado, baço e os rins são os órgãos onde as alterações histopatológicas são mais comumente relatadas em casos fatais, com necrose endotelial e hemorragia associada. Outras partes afetadas incluem o cérebro (meninges), guelras, tecido nasal, tecido adiposo, traqueia, músculo, osso e perióstio (Miller et al., 2011). As infecções são descritas mundialmente e estão mais estreitamente associadas aos anfíbios anuros e caudatas, ainda que outros hospedeiros tenham sido observados (CABI, 2021), conforme descrição anterior. As ordens Caudata ou Urodela (salamandras), Anura (sapos, rãs e pererecas) e Gymnophiona (cobras-cegas e cecílias) possuem cerca de 1080 espécies ocorrendo no Brasil. Destaca-se que muitas destas são endêmicas e de ocorrência extremamente restrita no quesito geográfico, bem como parte também é considerada em risco de extinção no país (ICMBio, 2018). No Brasil, há registros de casos da doença, que em sua maioria, são da espécie FV3 e relatadas em ranários (viveiros comerciais de São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (Oliveira et al., 2019). Porém, em pesquisa realizada por Ruggeri e colaboradores (2019), foi evidenciada infecção em representantes das famílias Bufonidae, Hylidae e Ranidae, as quais possuem espécies nativas, presentes em lagoas naturais e artificiais da região Sul do país. No mesmo trabalho, é relatado que os estudos sobre *Ranavírus* no Brasil são incipientes e, portanto, não se tem conhecimento de sua distribuição, quais variantes estão presentes na natureza, e as consequências da infecção para hospedeiros nativos. Com as informações levantadas, devido ao risco para as espécies brasileiras de anfíbios e demais hospedeiros possíveis, somado ao fato dos *Ranavírus* serem considerados invasivos pelo CABI, recomenda-se a não utilização de quaisquer espécies do gênero.

Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de registro de vírus da família *Iridoviridae*, é preciso confirmar que não se tratam das espécies do gênero *Ranavirus*. Para a identificação das espécies do gênero, todos os trabalhos levantados utilizam *primers* desenhados a partir de regiões altamente conservadas do gene da proteína do capsídeo principal (MCP) de *Ranavirus* (FV3). Vários *primers* para essa região foram propostos em diferentes trabalhos nas últimas décadas. Após análise criteriosa, indica-se a utilização especificamente do conjunto de primers MCP4 e MCP5 propostos por Mao e colaboradores (1997), por serem os pares de *primers* capazes de amplificar todos os principais membros conhecidos do gênero, além de ser o conjunto mais utilizado na maioria dos trabalhos, inclusive nos mais recentemente publicados (Leung et al., 2017; Park et al., 2021). Sugere-se utilizar as condições de amplificação com o uso dos referidos *primers* e demais condições de análises dos dados gerados descritas no trabalho de Geng e colaboradores (2011).

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
MCP4	5'- ACTTGGCCACTTATGAC- 3'
MCP5	5'- GTCTCTGGAGAAGAAGAA - 3'

Referências Bibliográficas:

CABI (2020). *Ranavirus* infection in amphibians. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/121709>. Acesso em: 24 de março de 2021.

Geng, Y., Wang, K. Y., Zhou, Z. Y., Li, C. W., Wang, J., He, M., ... & Lai, W. M. (2011). First report of a *Ranavirus* associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*). *Journal of comparative pathology*, 145(1), 95-102.

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume V - Anfíbios. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: ICMBio. 128p.

Lesbarrères, D., Balseiro, A., Brunner, J., Chinchar, V. G., Duffus, A., Kerby, J., ... Gray, M. J. (2011). *Ranavirus*: past, present and future. *Biology Letters*, 8(4), 481–483

Leung, W. T., Thomas-Walters, L., Garner, T. W., Balloux, F., Durrant, C., & Price, S. J. (2017). A quantitative-PCR based method to estimate *Ranavirus* viral load following normalisation by reference to an ultraconserved vertebrate target. *Journal of Virological Methods*, 249, 147-155.

Mao, J., Hedrick, R. P., & Chinchar, V. G. (1997). Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, 229(1), 212-220

Miller, D., Gray, M., e Storfer, A. (2011). Ecopathology of Ranaviruses Infecting Amphibians. *Viruses*, 3(11), 2351–2373.

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal. (2019). CHAPTER 2.1.2.: Infection with *Ranavirus*. In Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_ranavirus.pdf. Acesso em: 24 de março de 2021.

Oliveira, C. R., Alfaia, S. R., Ikari, F. L., Tavares, L. S., Sousa, R. L. M. de, Harakava, R., e Ferreira, C. M. (2019). Detection and molecular characterization of Frog virus 3 in bullfrogs from frog farms in Brazil. *Aquaculture*, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734575>.

Park, J., Grajal-Puche, A., Roh, N. H., Park, I. K., Ra, N. Y., & Park, D. (2021). First detection of *Ranavirus* in a wild population of Dybowski's brown frog (*Rana dybowskii*) in South Korea. *Journal of Ecology and Environment*, 45(1), 1-7.

Ruggeri, J.; Ribeiro, L. P.; Pontes, M. R.; Toffolo, C.; Candido, M.; Carriero, M.M.; Zanella, N.; Sousa, R. L. M. e Toledo, L.F. (2019). Discovery of Wild Amphibians Infected with *Ranavirus* in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 55(4), pp. 897–902.

II.33 *Rice yellow mottle virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Sobelivirales*
Família: *Solemoviridae*
Gênero: *Sobemovirus*
Espécie: *Rice yellow mottle virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Rice yellow mottle virus* (RYMV) é o agente causador de uma doença que acomete plantas da família Poaceae, especialmente os gêneros *Oryza* e *Eragrostis*, além de *Cynodon*, *Echinochloa*, *Eleusine*, *Imperata*, *Paspalum* e *Megathyrsus* (Hébrard et al., 2008; CABI, 2021). Acomete também algumas espécies da família Cyperaceae (CABI, 2021). Os sintomas dessa doença são caracterizados pelo aparecimento de manchas e amarelamento das folhas, geralmente evoluindo para necrose, crescimento atrofiado, espigas vazias e esterilidade, o que causa a morte da planta e perdas significativas na produção dos grãos (Hébrard et al., 2008; CABI, 2021). Essa doença tem sido transmitida por insetos vetores como besouros e gafanhotos (Uke et al., 2014), assim como através de resíduos vegetais, água de irrigação, contato direto entre as plantas e contaminação por ferramentas agrícolas infectadas (Hébrard et al., 2008). De acordo com os registros de detecção do RYMV, esse vírus tem sido reportado apenas no continente africano, contudo está amplamente disseminado nesse continente, sendo registrado em mais de 28 países (CABI, 2021). Esse vírus foi relatado pela primeira vez em 1966 no Quênia e a partir da década de 90 se espalhou por todos os locais da África Subsaariana e em Madagascar, onde se tem cultivo de arroz, comprometendo todos os tipos de cultivo dessa planta, como arroz de várzea, planalto, de sequeiro, flutuante e de mangue (Hébrard et al., 2008). No Brasil ainda não se tem registros desse patógeno, mas ele se torna uma grande ameaça por apresentar características de invasividade e devido às plantas hospedeiras que cultivamos, como no caso do arroz, e principalmente devido a presença de inúmeras outras espécies da nossa flora nativa que pertencem à família Poaceae, inclusive espécies de arroz silvestres, tais como *O. latifolia* e *O. glumaepatula* (Bertazzoni & Damasceno-Júnior, 2011; Kawakita et al., 2016).

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas para a espécie RYMV, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Sobemovirus*, é preciso confirmar que não se trate dessa espécie em questão. Esse vírus tem sido identificado/detectado por meio de DAS-ELISA e microscopia eletrônica, além de técnicas moleculares (Uke et al., 2015). Por ser um vírus de RNA, as técnicas moleculares para sua identificação passam pela transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA e a principal técnica utilizada consiste na RT-PCR, seja no modo convencional ou utilizando

imunocaptura (Hubert et al., 2017; Salimatou et al., 2018), mas apenas a RT-PCR convencional, além de ter menor custo operacional tem demonstrado eficiência na identificação de RYMV. Dessa maneira, para a identificação desse vírus, sugere-se a utilização da RT-PCR convencional proposta no trabalho de Salimatou e colaboradores (2018). Neste trabalho, para identificar e avaliar a diversidade genética de RYMV a partir de amostras de folhas de arroz infectadas coletadas de áreas de cultivo na África, os autores utilizaram dois conjuntos de *primers* específicos para RYMV, sendo eles Prymv1F/Prymv1R e Prymv2F/ Prymv2R, por meio de RT-PCR, seguido de sequenciamento e análise filogenética. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências
Prymv1F	5'- TGCCAATACCTATCTCCACCA-3'
Prymv1R	5'- TCACCTCTAGCGTTTGGTACG -3'
PRymv2F	5'-CCCGCAGGACCATACTAACGA-3'
PRymv2R	5' -GGGCTTCGTCACCTCTAGC-3'

Referências Bibliográficas

Bertazzoni, E. C., & Damasceno-Júnior, G. A. (2011). Aspectos da biologia e fenologia de *Oryza latifolia* Desv. (Poaceae) no Pantanal Sul-mato-grossense. *Acta Botanica Brasilica*, 25(2), 476-786.

CABI (2021). Datasheet: *Rice yellow mottle virus*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/47658>. Acesso em 06 de abril de 2021.

Hébrard, E., Fargette, D., & Konaté, G. (2008). *Rice Yellow Mottle Virus*. *Encyclopedia of Virology*, 485–490. doi:10.1016/b978-012374410-4.00715-9

Hubert, J., Lyimo, H. J. F., Luzi-Kihupi, A., & Mbega, E. R. (2017). Immunocapture and simple-direct-tube-reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of *Rice yellow mottle virus*. *African Journal of Biotechnology*, 16(24), 1331-1337.

Kawakita, K., Rodrigues, R. S., & Filgueiras, T. S. (2016). Poaceae em uma planície de inundação no Brasil: listagem florística e novas ocorrências. *Hoehnea*, 43(2), 203-216.

Salimatou, S. E., Diakaridia, T. E., Oumarou, G., Soungalo, S., Sognan, D., Bakaye, D., & Babana, A. H. (2018). Genetic diversity of *rice yellow mottle virus* from Niger Office and Selingue Development Rural Office in Mali. *Journal of General and Molecular Virology*, 8(1), 1-7.

Uke, A., Tibanyendela, N., Ikeda, R., Fujiie, A., & Natsuaki, K. T. (2014). Modes of transmission and stability of *Rice yellow mottle virus*. *Journal of plant protection research*, 54(4).

Uke, A., Tibanyendela, N., Natsuaki, K., Sekiya, N., & Oizumi, N. (2015). Characterization of *Rice yellow mottle virus* in north-eastern Tanzania. *J Agric Sci*, 60, 116-126.

II.34 *Sacbrood virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Iflaviridae*
Gênero: *Iflavirus*
Espécie: *Sacbrood virus*

Motivo da inclusão na lista:

O *Sacbrood virus* (SBV) é um vírus que infecta abelhas do gênero *Apis*, tanto os estágios de cria como os adultos, mas as larvas com cerca de 2 dias de idade são mais susceptíveis. Os sinais são pouco perceptíveis inicialmente e, em geral, as abelhas adultas infectadas podem ter uma expectativa de vida diminuída (Chen e Siede, 2007). Mas, à medida que a doença progride, a larva passa a apresentar uma textura coriácea e não consegue pupar, pois fica incapaz de digerir a cutícula velha. Um fluido contendo milhões de partículas do vírus se acumula entre o corpo e a pele de uma larva doente na forma de um saco, possuindo, assim, o aspecto de um saco cheio de água quando é removido da célula. Por esse motivo o vírus recebe o nome de Sacbrood (Grabensteiner et al., 2007). Apesar de ser relatado mundialmente, no Brasil foi encontrado apenas um relato de infecção por SBV, causando perdas de colmeias de *A. mellifera* em São Paulo (Freiberg et al., 2012). Não foram encontrados trabalhos que apontassem a presença do vírus em outras espécies de abelhas, nativas ou não no território brasileiro. Apesar de *A. mellifera* não ser uma espécie nativa brasileira, Modro e colaboradores (2011) destacam seu papel fundamental na polinização de espécies vegetais de mais de 40 famílias botânicas localizadas em Minas Gerais, sendo as principais Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae e Bignoniaceae, e dão destaque que no estudo realizado, cerca de 62% das plantas visitadas eram nativas brasileiras. Nas regiões de Caatinga, Muniz e colaboradores (2020) destacam que *A. mellifera* é considerada como agente polinizador da maioria das espécies estudadas no bioma. Nas regiões de Cerrado, Mendonça e colaboradores (2008) demonstraram que a espécie *A. mellifera* foi responsável pela polinização de 30 famílias botânicas, principalmente Melastomataceae, Bignoniaceae, Malpighiaceae, Myrtaceae, Fabaceae e Asteraceae. Foi destacado também que em cerrados de São Paulo, Mato Grosso e Minas Gerais, cerca de 75% das espécies de plantas são polinizadas de forma exclusiva, primária ou secundária por abelhas, nativas ou não, tendo estas papel crucial para a manutenção das comunidades. Desta maneira, dada a importância ecológica e

econômica da espécie *A. mellifera* e considerando os impactos ambientais que poderiam ocorrer aos vegetais que dependem deste polinizador para a reprodução, recomenda-se a não utilização do SBV.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Iflavirus* é preciso confirmar que não se trate da espécie SBV. Seu material genético é composto por RNA e a principal técnica molecular descrita nos trabalhos levantados para sua detecção e identificação é a técnica de RT-PCR (Grabensteiner et al., 2007; Freiberg et al., 2012; Roberts e Anderson, 2014). Dentre os trabalhos levantados para a identificação desse vírus, sugere-se a utilização do protocolo proposto por Freiberg e colaboradores (2012), no qual uma RT-PCR foi realizada utilizando-se os *primers* SBV-F e SBV-R. Esses *primers* foram descritos anteriormente por Shen e colaboradores (2005) e são responsáveis por amplificar um fragmento do gene que codifica a produção de proteínas do capsídeo, gerando um produto de 210 bp. As sequências dos *primers* descritos estão discriminadas na tabela abaixo:

<i>Primers</i>	Sequências	Referência
SBV-F	5'- CACTCAACTTACACAAAAAC - 3'	Shen et al. (2005)
SBV-R	5'- CATTAAGTACTCTCACTTTC - 3'	

Referências Bibliográficas:

- Chen, Y.P. e Siede, R. (2007). Chapter 2: Honey Bee Viruses. *Adv Virus Res.*; 70:33-80.
- Freiberg, M., Jong, D. De., Message, D., e Cox-Foster, D. (2012). First report of *Sacbrood virus* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genetics and Molecular Research*; 11 (3): 3310-3314.
- Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., & Nowotny, N. (2007). Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): *Acute bee paralysis virus*, *Black queen cell virus* and *Sacbrood virus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 222–225.
- Mendonça, K., Marchini, L.C., Souza, B. de A., Almeida-Anacleto, D. de., e Moreti, A. C. de C. C. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. *Neotropical Entomology* 37(5):513-521.
- Modro, A.F.H., Message, D., da Luz, C.F.P., Alves, J.A., e Neto, M. (2011). Flora de Importância Polínifera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG1. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.35, n.5, p.1145-1153.

Muniz, V.I.M de S., Nascimento, J.E.M., Félix, J.A., Alves, J.E. (2020). Nicho polínico de *Apis mellifera* L. na Caatinga durante a floração de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*; 18:e18006.

Roberts, J. M. K., & Anderson, D. L. (2014). A novel strain of *Sacbrood virus* of interest to world apiculture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 118, 71–74.

Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. and Cox-Foster, D. (2005). Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (*Kashmir bee virus* and *Sacbrood virus*) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.*; 86: 2281-2289.

II.35 *Satsuma dwarf virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Secoviridae*
Gênero: *Sadwavirus*
Espécie: *Satsuma dwarf virus*

Motivo da inclusão na lista:

Satsuma dwarf virus (SDV) são vírus icosaédricos que contêm RNA como material genômico. Infecta quase todos os tipos de cítricos, sendo a tangerina a variedade cítrica mais sensível, mas também afeta laranjas, limão, pomelo e outros híbridos em um grau menor, mas ainda da família Rutaceae. O SDV é facilmente transmitido às plantas herbáceas por inoculação mecânica e propagação vegetal, sendo o gergelim muito sensível à infecção, mas também representantes da família Fabaceae, como a soja. (Iwanami, 2010; EPPO, 2021). Presumivelmente também é transmitido através do solo, mas o (s) mecanismo (s) preciso (s) ainda são desconhecidos. Os sintomas são observados nas folhas, que se dobram em forma de barco ou colher, ocorrendo áreas necróticas e podendo ocorrer nanismo em algumas plantas. Sua distribuição conhecida é restrita ao Japão, China, Coreia do Norte, Irã e Turquia (EPPO, 2021). Não foram encontrados relatos de sua presença no Brasil. Todavia, no país, ocorrem mais de 34 gêneros nativos da família Rutaceae, abrangendo cerca de 194 espécies e cuja ocorrência é principalmente nas regiões de Mata Atlântica e da Amazônia (Ribeiro, 2015). Por isso, levando em consideração que a possibilidade de introdução no país possa levar risco a diversas espécies da família das Rutáceas, bem como das outras famílias que são possíveis hospedeiras, como Fabaceae, recomenda-se a não utilização de SDV.

Método de identificação:

Como a restrição de uso é apenas no nível de espécie, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Sadwavirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie SDV. Por ser um vírus de RNA, para sua identificação é preciso, inicialmente, realizar a transcrição reversa do RNA em cDNA. De acordo com os trabalhos levantados, a técnica mais comumente utilizada para a identificação molecular do vírus é a de RT-PCR, não sendo observados trabalhos que demonstrem a necessidade de utilização de técnicas mais complexas. Diversos autores propuseram diferentes *primers* direcionados para a identificação específica dessa espécie, mas os mesmos não detectavam todas as suas variantes (Ito et al., 2007; Iwanami et al., 2010). Em 2011, Shimizu e colaboradores propuseram *primers* universais projetados para amplificar sequências de nucleotídeos presentes em regiões gênicas não codificadoras e conservadas dos RNAs virais (RNAs 1 e 2) para identificar, por meio de RT-PCR de etapa única, todas as variantes do SDV, além de adaptações nos *primers* previamente projetados por Iwanami (2010). Os dois conjuntos de *primers* demonstraram resultados superiores e mais amplos em comparação àqueles obtidos com outros disponíveis, detectando a maioria das cepas

de SDV, incluindo possíveis variantes desconhecidas. Dessa maneira, sugere-se a utilização dessa abordagem e de um dos conjuntos de *primers* descritos no referido trabalho (FW146/RV488n ou uSDVup/uSDVdo), os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências
FW146	5' – ACTAGGGATAGCGCCCTAG – 3'
RV488n	5' - GGACCGRTATTGGGCCAT- 3'
uSDVup	5' – RRG TGHTGCC CACCGGACYT – 3'
uSDVdo	5' – RYRSAAATCAAGWAAAACAC – 3'

Referências Bibliográficas:

EPPO. (2021). *Satsuma dwarf virus*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/SDV000/distribution>. Acesso em: 06 de abril de 2021.

Ito, T., Ito, T., Shiotani, H., Iwanami, T., Ozaki, K., & Muramoto, K. (2007). Genetic diversity and a heterogeneous population of *Citrus mosaic virus* within a single citrus tree. *Journal of General Plant Pathology*, 73(2), 147-151.

Iwanami, T. (2010). Properties and control of *Satsuma dwarf virus*. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 44(1), 1-6.

Ribeiro, C. C. (2015). *As Galipeinae (Galipeae, Rutaceae) no estado da Bahia, Brasil* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Shimizu, S. I., Ito, T., Miyoshi, T., Tachibana, Y., & Ito, T. (2011). A broad spectrum, one-step RT-PCR to detect *Satsuma dwarf virus* variants using universal *primers* targeting both segmented RNAs 1 and 2. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6), 326-330.

II.36 *Taura syndrome virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Pisoniviricetes*
Ordem: *Picornavirales*
Família: *Dicistroviridae*
Gênero: *Aparavirus*
Espécie: *Taura syndrome virus*

Motivo da inclusão na lista:

Taura syndrome virus (TSV) é um vírus de genoma linear de RNA que é conhecido por causar perdas catastróficas em camarões peneídeos, com mortalidade variando de 60 a 90% nos criadouros. TSV espalhou-se rapidamente para regiões de cultivo de camarão da Ásia, América do Norte, Peru e México e foi relatado causando doença em uma ampla gama de espécies de camarão do gênero *Penaeus*, dentre elas *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *Penaeus schmitti*, *Penaeus setiferus*, *Penaeus aztecus*, *P. monodon*, *Penaeus japonicus* e *P. chinensis* (CABI, 2021; Arulmoorthy et al., 2020). Os sintomas são caracterizados por letargia, anorexia, musculatura opaca e descoloração avermelhada no leque da cauda e pleópodos e foram observados em todos os três estágios (pós-larvas, juvenis e adultos) dos camarões (Lightner et al., 1995). Não foram encontrados registros de sua ocorrência no Brasil. Todavia, ressalta-se que no Brasil são encontrados peneídeos nativos, como a espécie *Penaeus brasiliensis* que se destaca por ser uma espécie nativa de grande importância econômica e ecológica (Nunes, 2001). Portanto, considerando a gravidade da doença causada por TSV e o risco à biodiversidade de peneídeos nativos brasileiros, somada à sua característica invasividade, relatada pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas, recomenda-se que o patógeno TSV não seja considerado para introdução e utilização, evitando possíveis impactos ambientais e econômicos que poderiam ocorrer.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso ser apenas no nível de espécie, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Aparavirus*, é preciso confirmar que não se trate, especificamente, da espécie TSV. Por ser um vírus de RNA, para sua identificação, é necessário realizar a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. Após levantamento dos trabalhos, observou-se que muitos utilizam técnicas de RT-qPCR para a detecção e identificação do vírus (Dhar et al., 2002; Tang et al., 2017) e, em menor proporção RT-LAMP (Kiatpathomcha et al., 2008). Entretanto, de acordo com a literatura, para fins de identificação de TSV, apenas a RT-PCR tem se mostrado uma técnica eficiente e também é amplamente utilizada. Dessa maneira, para a identificação sugere-se a utilização da abordagem descrita no trabalho de Tan e colaboradores (2009), que detectaram e identificaram TSV em camarões contaminados utilizando a técnica de RT-PCR de duas etapas a partir dos *primers* 9195F e 9992R. Esses *primers* espécie-específicos haviam sido previamente projetados no trabalho de Nunan e colaboradores (1998) para amplificar um fragmento de 231 pb de regiões conservadas presentes na espécie e estão descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
9195F	5' – TCAATGAGAGCTTGGTCC – 3'
9992R	5' – AAGTAGACAGCCGCGCTT – 3'

Referências Bibliográficas:

Arulmoorthy, M. P., Anandajothi, E., Vasudevan, S., & Suresh, E. (2020). Major viral diseases in culturable penaeid shrimps: a review. *Aquaculture International*. Doi: 10.1007/s10499-020-00568-3.

CABI (2021). *Taura syndrome virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/61800>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

Dhar, A. K., Roux, M. M., & Klimpel, K. R. (2002). Quantitative assay for measuring the *Taura syndrome virus* and *Yellow head virus* load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *Journal of virological methods*, 104(1), 69-82.

Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Jitrapakdee, S., & Flegel, T. W. (2008). Shrimp *Taura syndrome virus* detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*, 153(2), 214-217.

Lightner, D., Redman, R., Hasson, K., & Pantoja, C. (1995). *Taura syndrome* in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 53–59.

Nunan, L. M., Poulos, B. T., & Lightner, D. V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of *Taura syndrome virus* (TSV) in experimentally infected shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34(2), 87-91.

Nunes, A.J.P, (2001). Nota técnica Panorama da aquicultura. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/> Acesso em: 29 de março de 2021.

Tan, Y., Xing, Y., Zhang, H., Feng, Y., Zhou, Y., & Shi, Z. L. (2009). Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of *White spot syndrome virus* in Hainan Province, China, in 2007. *Journal of fish diseases*, 32(9), 777-784.

Tang, K. F., Aranguren, L. F., Piamsomboon, P., Han, J. E., Maskaykina, I. Y., & Schmidt, M. M. (2017). Detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and *Taura syndrome virus* in *Penaeus vannamei* cultured in Venezuela. *Aquaculture*, 480, 17-21.

II.37 *Tomato apical stunt viroid*

Classificação taxonômica:

Realm: *Varidnaviria*
Reino: *Helvetiavirae*
Filo: *Dividoviricota*
Classe: *Laserviricetes*
Ordem: *Ligamenvirales*
Família: *Pospiviroidae*
Gênero: *Pospiviroid*
Espécie: *Tomato apical stunt viroid*

Motivo da inclusão na lista:

Tomato apical stunt viroid (TASVd) é o agente causador da atrofia apical do tomateiro (*Solanum lycopersicum*), podendo afetar outras plantas de diferentes gêneros da família Solanaceae como *Brugmansia*, *Cestrum*, *Lycianthes*, *Capsicum*, além de inúmeras plantas ornamentais (Matsushita & Tsuda, 2016; Verhoeven et al., 2017). Quanto à sua transmissão, alguns trabalhos relatam que ela ocorre principalmente por meio de sementes contaminadas (Verhoeven et al., 2017). Entretanto, o TASVd também pode ser disseminado pela poda e propagação de materiais vegetais contendo seiva contaminada e, adicionalmente, algumas evidências experimentais em plantas de estufa demonstram que ele também pode ser transmitido por alguns insetos (CABI, 2021). Os sintomas observados nas plantas acometidas por essa doença são a presença de entrenós apicais encurtados e de folhas cloróticas e minúsculas, deformadas e quebradiças. Adicionalmente, os frutos maduros também apresentam tamanho reduzido e coloração pálida (Parrella & Numitone, 2014), porém as infecções de plantas ornamentais tendem a ser assintomáticas (Verhoeven et al., 2017). Esse vírus é bem distribuído mundialmente, afetando três continentes, sendo eles o Europeu com pelo menos 8 países atingidos, o Africano com 4 países e o Asiático com 2 países (CABI, 2021). No Brasil não se tem registro desse patógeno, contudo dado o fato de possuímos cultivos das plantas hospedeiras desse vírus no país e plantas nativas da família Solanaceae e gênero *Solanum*, reforça-se o alerta para o controle da introdução e utilização desse patógeno no território nacional. Inclusive, em uma de nossas espécies nativas, *Solanum jasminoides*, já foi relatada infecção assintomática por este vírus em plantas cultivadas na América do Norte (NAPPO, 2021), o que evidencia ainda mais essa preocupação.

Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Pospiviroid*, é preciso confirmar que não se trate da espécie TASVd. A partir dos trabalhos levantados, observou-se que a técnica de RT-PCR, com o uso de *primers* projetados para amplificar regiões específicas desse vírus tem sido utilizada na sua identificação. Dentre as abordagens disponíveis, sugere-se a metodologia utilizada no trabalho de Verhoeven e colaboradores (2017). Neste trabalho foram realizados ensaios de RT-PCR convencionais visando a confirmação da identificação desse vírus em sementes de pimentão (*Capsicum annuum*), a partir de *primers* projetados em trabalhos anteriores. Inicialmente foi realizada RT-PCR usando um conjunto de *primers* para detecção genérica de vírus

do gênero *Pospiviroid*, Posp1-FW/Posp1-RE. Em seguida, foi realizada uma outra RT-PCR convencional, utilizando os *primers* CEVd-FW e CEVd-RE, que foi capaz de amplificar praticamente todo o genoma de TASVd. Vale ressaltar que esses viroides têm genomas bem pequenos, com aproximadamente 400 pb, o que permite que a amplificação do genoma seja realizada de forma muito simples. Os dois conjuntos de *primers* estão listados na Tabela abaixo, contudo, vale ressaltar que não necessariamente é essencial fazer as duas RT-PCRs, pois trabalhos anteriores já foram capazes de identificar este vírus usando apenas um dos dois iniciadores (Verhoeven et al., 2006; Parrella & Numitone, 2014).

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
Posp1-FW	5'-GGGATCCCCGGGGAAAC -3'	Verhoeven et al. (2004)
Posp1-RE	5'-AGCTTCAGTTGT(T/A)TCCACCGGGT-3'	Verhoeven et al. (2004)
CEVd-FW	5' -CCGGGGATCCCTGAAGGAC-3'	Önelge (1997)
CEVd-RE	5'- GGAAACCTGGAGGAAGTCG-3'	Önelge (1997)

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Tomato apical stunt viroid*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/52804#f3771c85-1b54-416b-8040-6d1a107b8584>. Acesso em: 10 de abril de 2021

Matsushita Y, Tsuda S (2016) Seed transmission of *potato spindle tuber viroid*, *tomato chlorotic dwarf viroid*, *tomato apical stunt viroid*, and *Columnea latent viroid* in horticultural plants. *Eur J Plant Pathol.*, 145:1007–1011.

NAPPO (2021). *Tomato apical stunt viroid* found on *Solanum jasminoides* and *Cestrum* sp. Disponível em: <https://www.pestalerts.org/pest-alert/tomato-apical-stunt-viroid>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

Önelge, N. (1997). Direct nucleotide sequencing of *Citrus exocortis viroid* (CEV). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 21(4), 419-422. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/abstract.htm?id=1571>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

Parrella, G., & Numitone, G. (2014). First report of *Tomato apical stunt viroid* in tomato in Italy. *Plant disease*, 98(8), 1164-1164. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0206-PDN> Acesso: em 10 de abril de 2021.

Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A., Roenhorst, J.W. (2004). Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur J Plant Pathol.*, 110:823–831.

Verhoeven, J. T. J., Koenraadt, H. M. S., Westenberg, M., & Roenhorst, J. W. (2017). Characterization of *Tomato apical stunt viroid* isolated from a 24-year old seed lot of *Capsicum annuum*. *Archives of virology*, 162(6), 1741-1744.

II.38 *Vesicular stomatitis virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Negarnaviricota*
Classe: *Monjiviricetes*
Ordem: *Mononegavirales*
Família: *Rhabdoviridae*
Gênero: *Vesiculovirus*
Espécie: *Vesicular stomatitis virus*

Motivo da inclusão na lista:

Vesicular stomatitis virus (VSAV/VSIV) é um vírus animal de RNA como material genômico e que é patogênico para uma ampla gama de hospedeiros, incluindo bovinos, felinos, caprinos, equinos, ovinos, roedores e humanos (CABI, 2021). A doença é caracterizada por sintomas de vesiculação e ulceração da cavidade oral, pés e tetas. Embora a doença possa ocorrer em humanos, as infecções humanas de ocorrência natural com VSV são raras, e em casos relatados, os indivíduos eram expostos a animais infectados e/ou pesquisadores expostos em ambientes de laboratório (Lichty et al., 2004). É um vírus considerado invasivo pelo Compendium de Espécies Invasivas do CABI e é relatado nas Américas (Norte, Central e Sul), incluindo o Brasil, sendo mais comum nas áreas tropicais e causando epidemias esporádicas em climas mais frios durante os meses de verão (Letchworth et al., 1999). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apresentados por Bezerra e colaboradores (2018), 169 surtos de estomatites causados principalmente por VSIV-3 e esporadicamente por VSIV-2 foram registrados em vários estados (Bahia, Ceará, Goiás, Pernambuco, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins) entre 2005 e 2013. Tendo em vista os dados apresentados, a ampla gama de hospedeiros afetados, a importância epidemiológica e as características de invasividade de VSAV, o qual pode causar desequilíbrio ao ambiente e comprometer a saúde de diversos grupos de animais, recomenda-se sua não utilização, minimizando, assim, sua disseminação em território brasileiro entre espécies de vida livre. A importância desse controle é reforçada pelo fato de possuímos espécies nativas de roedores e pequenos mamíferos, principalmente, que estão entre as espécies que poderiam vir a ser afetadas.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Vesiculovirus*, é preciso confirmar que não se trate, especificamente, da espécie VSAV. Por se tratar de um vírus de RNA, para sua identificação, é necessário realizar, primeiramente, a transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. Considerando os trabalhos levantados pôde-se observar que as técnicas comumente utilizadas para a identificação desse vírus são a RT-PCR convencional ou multiplex (Lung et al., 2011), *nested* PCR (Hoffner et al., 1994) e RT-qPCR (Hole et al., 2010). Devido ao menor custo operacional, simplicidade e pelo fato de demonstrar eficiência suficiente para fins apenas de identificação do vírus, indica-se a utilização da técnica de RT-PCR. Dentre as abordagens disponíveis, sugere-se a utilização descrita no trabalho de Fernandez e colaboradores (2008), que,

diferente de trabalhos anteriores, projetaram e propuseram um único par de *primers* a partir de regiões altamente conservadas do gene L, VSV-1 e VSV-2, capaz de amplificar e identificar os diferentes sorotipos do vírus existentes e que ainda vêm sendo utilizados em trabalhos mais recentes voltados para a detecção desse vírus (Liu et al., 2019). Esses *primers* estão descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
VSV-1	5' – AATGACGATGAGACYATGCAATC – 3'
VSV-2	5' – CAAGTCACYCGTGACCATCT – 3'

Referências Bibliográficas:

Bezerra, C.S., Cargnelutti, J.F., Sauthier, J.T., Weiblen, R., Flores, E.F., Alves, C.J., Clementino, I.J., Santos, C.S.A.B., Azevedo, S.S. (2018). Epidemiological situation of *Vesicular stomatitis virus* infection in cattle in the state of Paraíba, semiarid region of Brazil, *Preventive Veterinary Medicine*, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.027>.

CABI (2021). *Vesicular stomatitis virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/60393>. Acesso em: 11 de abril de 2021.

Fernández, J., Agüero, M., Romero, L., Sánchez, C., Belák, S., Arias, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). Rapid and differential diagnosis of foot-and-mouth disease, Swine vesicular disease, and Vesicular stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. *Journal of virological methods*, 147(2), 301-311.

Höfner, M. C., Carpenter, W. C., Ferris, N. P., Kitching, R. P., & Botero, F. A. (1994). A hemi-nested PCR assay for the detection and identification of *Vesicular stomatitis virus* nucleic acid. *Journal of virological methods*, 50(1-3), 11-20.

Hole, K., Velazques-Salinas, L., & Clavijo, A. (2010). Improvement and optimization of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the detection and typing of *Vesicular stomatitis virus*. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22(3), 428-433.

Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., & Del Cbarrera, J. (1999). Vesicular Stomatitis. *The Veterinary Journal*, 157(3), 239–260.

Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F., & Bell, J. C. (2004). *Vesicular stomatitis virus*: re-inventing the bullet. *Trends in Molecular Medicine*, 10(5), 210–216.

Liu, C., Li, X., Liang, L., Li, J., & Cui, S. (2019). Isolation and phylogenetic analysis of an emerging *Senecavirus A* in China, 2017. *Infection, Genetics and Evolution*, 68, 77-83.

Lung, O., Fisher, M., Beeston, A., Hughes, K. B., Clavijo, A., Goolia, M., ... & Deregt, D. (2011). Multiplex RT-PCR detection and microarray typing of vesicular disease viruses. *Journal of virological methods*, 175(2), 236-245.

II.39 *Wheat streak mosaic virus*

Classificação taxonômica:

Realm: *Riboviria*
Reino: *Orthornavirae*
Filo: *Pisuviricota*
Classe: *Stelpaviricetes*
Ordem: *Patatavirales*
Família: *Potyviridae*
Gênero: *Tritimovirus*
Espécie: *Wheat streak mosaic virus*

Motivo da inclusão na lista:

Wheat streak mosaic virus (WSMV) é o agente causador de doença que acomete plantas de diversos gêneros da família Poaceae, tais como *Avena*, *Bromos*, *Echinochloa*, *Eleusine*, *Eriochloa*, *Hordeum*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Triticum* e outros (Hadi et al., 2011; CABI, 2021). O vírus do mosaico da estria do trigo causa mosaico severo, nanismo e necrose nas plantas infectadas (Hadi et al., 2011). Esse vírus é transmitido por um vetor ácaro (*Aceria tosichella* Keifer (Acari: Eriophyidae)) (Navia et al., 2013), havendo também baixas taxas de transmissão a partir das sementes (Dwyer et al., 2007). Dentre as plantas infectadas, o trigo é o hospedeiro principal, contudo outras culturas têm sido acometidas como milho (*Zea mays* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), centeio (*Secale cereale* L.), aveia (*Avena sativa* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* [L.] e sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench), bem como plantas selvagens como Capim-rabo-de-raposa (*Setaria P. Beauv. spp.*), Capim-colchão (*Digitaria Haller. spp.*), Azevém (*Lolium L. spp.*), dentre outras (Christian & Willis, 1993; Hadi et al., 2011). Os registros mais antigos dessa doença datam da década de 70 na Turquia, seguido dos Estados Unidos na década 80. Em seguida, esse vírus se espalhou por todos os cinco continentes, sendo amplamente distribuído no continente europeu onde afeta 15 países, no continente asiático onde afeta sete países, no Canadá, Estados Unidos e México na América do Norte, além de alguns países africanos (Nigéria e Zâmbia), Nova Zelândia e Austrália na Oceania e Argentina e Brasil na América do Sul (CABI, 2021). Sendo assim, por ser um vírus que já possui registro de ocorrência em alguns locais do país, o controle da doença depende de um grande rigor tanto no controle da entrada desse vírus quanto na sua utilização, independente dos fins, para evitar o seu espalhamento. A importância desse controle se deve ao fato de, além de ser um vírus considerado invasivo, o WSMV afetar gêneros para os quais possuímos representantes nativos em nosso território, tais como *Eriochloa* (*Eriochloa punctata* – capim de várzea), espécies de *Panicum* como o *Panicum dichotomiflorum* (capim do banhado), *Setaria* (*Setaria parviflora* – capim rabo de raposa), dentre outros (Kawakita et al., 2016).

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Tritimovirus*, é preciso confirmar que não se trate da espécie WSMV. Este é um vírus de RNA e, portanto, as técnicas moleculares para sua identificação passam pela transcrição reversa do RNA do vírus em cDNA. De acordo com os trabalhos levantados, esse vírus tem sido identificado/detectado principalmente por

meio de ensaios que utilizam RT-PCR (Mar et al., 2013) e RT-PCR quantitativa (Tatineni et al., 2010). Entretanto, para fins apenas de identificação não há necessidade de quantificar o título viral, sendo assim, apenas a RT-PCR convencional como realizada por Mar e colaboradores (2013) pode ser utilizada e é a abordagem sugerida. Neste referido trabalho, dois conjuntos de *primers* que amplificaram diferentes regiões do genoma de WSMV foram usados. O primeiro conjunto consistiu nos *primers* WSMVF e WSMVR, que amplificaram 948 pb do gene que codifica a proteína de revestimento (CP) do vírus e o segundo conjunto foram os *primers* WSMVL2 e WSMVR2, responsáveis por gerar um amplicon de 198 bp do gene Vpg-Nia (genome-linked *protein-viral* proteinase). Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
WSMVF	5'-TCGAGTAGTGGAAG-CACTCA -3'	Mar et al. (2013)
WSMVR	5'- CCTCACATCATCTGCAT-CAT -3'	Mar et al. (2013)
WSMVL2	5'-CGACAATCAGCAAGAGACCA-3'	Deb & Anderson (2008)
WSMVR2	5' -TGAGGATCGCTGTGTTTCAG-3'	Deb & Anderson (2008)

Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Wheat streak mosaic virus* (wheat streak). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56858#REF-DDB-5053> Acesso em 08 de abril de 2021.

Christian M. L & Willis W. G. (1993) Survival of *Wheat streak mosaic virus* in grass hosts in Kansas from wheat harvest to fall wheat emergence. *Plant Disease* 77:239–242. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19932331607>. Acesso em: 08 de abril de 2021.

Deb M, Anderson JM. (2008) Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and Cereal yellow dwarf viruses, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*. *Journal of virological methods*. Mar 1;148(1-2):17-24.

Dwyer, G. I., Gibbs, M. J., Gibbs, A. J., & Jones, R. A. (2007). *Wheat streak mosaic virus* in Australia: relationship to isolates from the Pacific Northwest of the USA and its dispersion via seed transmission. *Plant Disease*, 91(2), 164-170.

Hadi, B. A. R., Langham, M. A. C., Osborne, L., & Tilmon, K. J. (2011). *Wheat streak mosaic virus* on wheat: biology and management. *Journal of Integrated Pest Management*, 2(1), J1-J5.

Kawakita, K., Rodrigues, R. S., & Filgueiras, T. S. (2016). Poaceae em uma planície de inundação no Brasil: listagem florística e novas ocorrências. *Hoehnea*, 43(2), 203-216.

Mar, T. B., Lau, D., Schons, J., Pereira, P. R. V. D. S., & Carminatti, A. J. (2013). Identification and characterization of *Wheat Streak Mosaic Virus* isolates in wheat-growing areas in Brazil. *International Journal of Agronomy*, 2013.

Navia D., de Mendonca R. S., Skoracka A. et al., (2013) Wheat curlmite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops, *Experimental and Applied Acarology*, vol.59,no.1-2,pp.95–143.

Tatineni, S., Graybosch, R. A., Hein, G. L., Wegulo, S. N., & French, R. (2010). Wheat cultivar-specific disease synergism and alteration of virus accumulation during co-infection with *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus*. *Phytopathology*, 100(3), 230-238.

II.40 *White spot syndrome virus*

Classificação taxonômica:

Família: Nimaviridae

Gênero: *Whispovirus*

Espécie: *White spot syndrome virus*

Motivo da inclusão na lista:

White spot syndrome virus (WSSV) é um patógeno de genoma de DNA circular que pode infectar uma ampla gama de crustáceos aquáticos, incluindo camarões peneídeos de água salgada, salobra e doce, caranguejos, lagostins e caranguejos eremitas (Wang et al., 2019). Os sintomas visíveis causados por WSSV em camarões podem ser facilmente reconhecidos por suas manchas brancas características na carapaça, porém quando isto ocorre o sinal clínico, a infecção está em um ponto em que o animal está à beira da morte, por complicações internas não visíveis (Dey et al, 2019). O vírus é relatado ocorrendo em países da Ásia e das Américas do Norte, Central e do Sul, mas constitui uma preocupação mundial devido à importância econômica e ambiental dos camarões peneídeos em todos os continentes (CABI, 2021). No Brasil, o vírus foi relatado em camarões peneídeos em sistemas de criação no Rio Grande do Norte e na Paraíba, onde contenções e ações de segurança foram tomadas para conter a disseminação para outros ambientes (Peixoto et al., 2020; Bandeira et al., 2018). O Brasil está no ranking mundial de produtores de camarões, e ocupa a quinta posição, principalmente com a criação da espécie *Penaeus brasiliensis*, se destacando como uma espécie nativa de grande importância econômica e ecológica (Nunes, 2001). Com isto, devido à gravidade da doença causada por WSSV, dada a possibilidade de interferência na fauna de peneídeos nativos brasileiros, bem como de moluscos nativos, e, somada à sua característica de invasividade, relatada pelo CABI, no Compendium de Espécies Invasivas, recomenda-se a não utilização de WSSV, diminuindo assim, a probabilidade de impactos ambientais e econômicos que sua introdução poderia causar à diversidade brasileira.

Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de utilização de vírus do gênero *Whispovirus*, é preciso garantir que não se trata da espécie WSSV. Para a identificação desse vírus, foi encontrado o uso de diferentes metodologias: principalmente PCR convencional (Wu et al., 2005) *nested* PCR (Nunan et al., 1998) e, em menor proporção, qPCR (Durand & Lightner, 2002) e a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) (Kono et al., 2004). Entretanto, trabalhos relatam que apenas o uso de PCR convencional, a partir de pares de *primers* únicos e específicos para a espécie, vem sendo usado com sucesso e os mesmos são base, inclusive, de alguns kits comerciais para a detecção do vírus. Dessa maneira, sugere-se a utilização da abordagem descrita no trabalho de Caipang e colaboradores (2010), que utilizaram, para a detecção e identificação de WSSV por meio de reações de PCR convencional, um par de *primers* (P2 e P3) baseado em iniciadores propostos anteriormente por Takahashi e colaboradores (1996), capazes de amplificar um fragmento de 330 pb específico do vírus. Os *primers* mencionados se encontram na Tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
P2	5' – ACCTCTTTACTCCCTCGACT – 3'
P3	5 - TTGTAGAGGGCATGAGGGAT- 3'

Referências Bibliográficas:

Bandeira, J. de T., Moraes, R. S. M. M. de, Silva, R. P. P. e, Mendes, E. S., Silva, S. M. B. C. da, & Santos, F. L. dos. (2018). First report of *White spot syndrome virus* in wild crustaceans and mollusks in the Paraíba River, Brazil. *Aquaculture Research*, 50(2), 680–684.

CABI (2021). White spot disease. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/59574>. Acesso em: 05 de abril de 2021.

_____. *White spot syndrome virus*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/66287>. Acesso em: 05 de abril de 2021.

Caipang, C. M. A., & Aguana, M. P. N. (2010). Rapid diagnosis of vibriosis and *White spot syndrome* (WSS) in the culture of shrimp, *Penaeus monodon* in Philippines. *Veterinary research communications*, 34(7), 597-605.

Dey, B. K., Dugassa, G. H., Hinzano, S. M., & Bossier, P. (2019). Causative agent, diagnosis and management of white spot disease in shrimp: A review. *Reviews in Aquaculture*. 1-44. doi:10.1111/raq.12352.

Durand, S. V., & Lightner, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of *White spot syndrome virus* in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25(7), 381-389.

Kono, T., Savan, R., Sakai, M., & Itami, T. (2004). Detection of *White spot syndrome virus* in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of virological methods*, 115(1), 59-65.

Nunan, L. M., Poulos, B. T., & Lightner, D. V. (1998). The detection of *White spot syndrome virus* (WSSV) and *Yellow head virus* (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, 160(1-2), 19-30.

Nunes, A.J.P, (2001). Nota técnica Panorama da aquicultura. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/> Acesso em: 29 de março de 2021.

Peixoto, E. C. R.; Câmara, R. J. F.; Rebouças, G. G.; Araújo, B. V. S. de; Sakamoto, S.M. (2020). Identification and genotyping of *White spot syndrome virus* (WSSV) isolated from *Litopenaeus vannamei* in the state Rio Grande do Norte. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v. 6, n. 7, p.45379-45385.

Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., ... & Aoki, T. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish Diseases*, 19(5), 399-403.

Wang, H.C.; Hirono, I.; Maningas, M.B.B.; Somboonwiwat, K.; Stentiford, G.; Ictv, R.C. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Nimaviridae. *J. Gen. Virol.*, 100, 1053–1054.

Wu, W., Wang, L., & Zhang, X. (2005). Identification of *White spot syndrome virus* (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 332(2), 578-583.