



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Diversidade viral em mandioca com sintomas de couro de sapo nas raízes

Dayla Geovana Pereira Bezerra

**Recife – PE
2024**

DAYLA GEOVANA PEREIRA BEZERRA

**DIVERSIDADE VIRAL EM MANDIOCA COM SINTOMAS DE COURO DE SAPO
NAS RAÍZES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Blawid, Dr. rer. Hort.

Coorientador: Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

**RECIFE-PE
JULHO – 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Auxiliadora Cunha – CRB-4 1134

B574d Bezerra, Dayla Geovana Pereira.
Diversidade viral em mandioca com sintomas de
couro de sapo nas raízes / Dayla Geovana Pereira
Bezerra. – Recife, 2024.
97 f.; il.

Orientador(a): Rosana Blawid.
Co-orientador(a): Saulo Alves Santos de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências e anexo(s).

1. *High-Throughput Sequencing* (HTS). 2.
Ampelovírus. 3. Torradovírus. 4. Rhabdovírus 5.
Manihot esculenta. I. Blawid, Rosana, orient. II.
Oliveira, Saulo Alves Santos de, coorient. III. Título

CDD 632

**ESTUDO DA DIVERSIDADE VIRAL EM RAÍZES DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) COM SINTOMAS DE COURO DE SAPO**

DAYLA GEOVANA PEREIRA BEZERRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 26/07/2024

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Rosana Blawid (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Álvaro Carlos Gonçalves Neto (UFRPE)

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira (EMBRAPA)

Prof^a. Dr^a. Rosana Blawid (UFRPE)

**RECIFE-PE
JULHO – 2024**

**Aos meus pais e minha avó, que sob muito
sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra.**

**Aos meus primos, Samuel Victor e Arthur
Henrique. Pelo exemplo acadêmico que
busco ser para as crianças e jovens ao meu
redor.**

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, minha mãe Cristiane Pereira de Sousa, meu pai Josimar da Silva Bezerra e minha avó Maria de Deus Pereira que foram meu pilar em fé quando eu estava descrente, meu auxílio financeiro em momentos de precisão e minha melhor motivação para continuar em todas as vezes que quis desistir.

À minha namorada Talita Suely, por estar ao meu lado em meio as minhas piores versões, por todo o amor incondicional, por acreditar que a minha pesquisa é incrível e sempre demonstrar interesse em me ouvir falar sobre vírus em mandioca mesmo não entendendo muita coisa a respeito.

A todos os meus amigos, em especial, André Nunes, Carliana Teles e Cristhyanne Macedo que aturaram minhas reclamações diárias. Aos meus vizinhos, Rachel e Sóstenes, por me acolherem nesta nova cidade com um delicioso caldo, sendo os melhores vizinhos que recife poderia ter me dado.

À professora Dr^a Beatriz Meireles Barguil, que instigou meu lado cientista e me fez amar a biologia molecular. Por enxergar potencial em mim quando nem eu mesma via e me incentivar a seguir carreira acadêmica, se hoje escrevo essa dissertação é por causa de inúmeros professores que assim como ela, moldaram a minha vida acreditando que eu poderia ser maior do que minhas origens.

À toda a equipe do “IgG Squad” Carlos, Ailton, Edinalda, Odaiza e Priscila que entre as pausas para o cafezinho, refeições compartilhadas, orações para RT-PCR funcionar, desespero, surtos coletivos, boas playlists e conversas sobre educação financeira, fizeram do laboratório de fitovirologia minha nova casa.

À professora Dr^a Rosana Blawid, cuja orientação, ensinamentos e principalmente princípios transmitidos me fizeram crescer enquanto profissional e fitovirologista. Pois na carreira acadêmica precisa-se de sorte, networking, trabalho árduo e um mentor dando respaldo.

Ao professor Dr. Álvaro Carlos Gonçalves Neto. Ao Dr. Eder Jorge de Oliveira e Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Aos Pesquisadores, Dr. Stephan Winter e Dr. Paolo Margaria do Instituto DSMZ na Alemanha. Por compartilharem conhecimentos importantes para o desenvolvimento deste trabalho e todo apoio dado durante o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta na minha formação, os meus mais sinceros agradecimentos.

Sumário

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	11
1. MANDIOCA	11
1.1. CULTIVO E ASPECTOS GERAIS	11
1.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	13
1.3. EPIDEMIAS VIRAIS NA MANDIOCA NO MUNDO	15
2. VIROSES NA CULTURA DA MANDIOCA NO BRASIL	18
2.1. NUCLEORHABDOVÍRUS	20
2.2. O GÊNERO <i>Ampelovirus</i>	25
2.3. O GÊNERO <i>Cavemovirus</i>	29
2.4. O GÊNERO <i>Polerovirus</i>	30
2.5. O GÊNERO <i>Potexvirus</i>	34
2.6. O GÊNERO <i>Torradovirus</i>	36
3. A DOENÇA COURO DE SAPO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO 2: VIRAL DIVERSITY IN CASSAVA ROOTS SHOWING CASSAVA FROGSKIN SYMPTOMS	50
1. Introduction	50
2. Materials and methods	52
2.1 Collected material	52
2.2 High-Throughput Sequencing (HTS)	53
2.3 Bioinformatics workflow for HTS data analysis	53
2.4 Phylogenetic of newly discovered viruses and sequence analyses	54
2.5 Total RNA extraction from tuberous roots	54
2.6 Detection by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)	55
3. Results	55
3.1 High-Throughput Sequencing analysis	55
3.2 Assembled viral genome sequences related to cassava foliar viral diseases	56
3.2.1 Cassava Common Mosaic Disease (CsCMD)	56
3.2.2 Cassava Vein Mosaic Disease (CsVMD)	57
3.3 Assembled viral genome sequences related to CFSD	59
3.3.1 Torradovirus	59
3.3.2 Ampelovirus	60
3.3.3 Rhabdovirus	63
3.4 Root Symptomatology	66
3.5 RT-PCR detection	68
4. Discussion	69
5. Acknowledgements	73
References	73
CAPÍTULO 3: CONCLUSÕES GERAIS	79
SUPPLEMENTARY MATERIAL	80

RESUMO GERAL

Nativa do Brasil, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma importante fonte para segurança alimentar, principalmente por sua capacidade de armazenar amido nas raízes tuberosas. O plantio dessa cultura é realizado por manivas, para manter a uniformidade genética, porém essa prática também contribui para a persistência de fitopatógenos ao longo das safras. No Brasil, os vírus das famílias *Alphaflexiviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Secoviridae* e *Solemoviridae* já foram relatados infectando a mandioca. Dentre as doenças de impacto econômico na América do Sul, a doença do Couro de Sapo (*cassava frogskin disease*, CFSD) é a que vem apresentando maior potencial destrutivo, causando redução na produção de amido, constrictões e fissuras nas raízes tuberosas, levando a perdas de rendimento de até 100%. Ao longo dos anos, estudos têm associado a doença a diversas espécies virais e/ou fitoplasmas. Notavelmente, os ampelovírus, potexvírus e torradovírus têm sido apontados como causadores da doença, porém a etiologia da doença ainda permanece indefinida. Portanto, este estudo visa entender a diversidade viral em mandioca apresentando sintomas de Couro de Sapo, utilizando materiais foliares e de raízes da região do Nordeste do Brasil. Para isso, o estudo investigou a diversidade viral em acessos de mandioca do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, abrangendo acessos com sintomas de CFSD, cultivares oriundos de sementes, material propagativo e/ou raízes sadias da Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN). O RNA total foi extraído de raízes e folhas utilizando o método CTAB. O HTS foi realizado pela Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas de Células (DSMZ) a partir de material foliar. A análise dos dados de HTS envolveu a verificação da qualidade das leituras com FastQC v.0.11.9, classificação taxonômica preliminar com Kaiju, remoção de RNA ribossomal e duplicatas com BBtools v.39.01, remoção de leituras de baixa qualidade e adaptadores com Trimmomatic v.0.36, montagem dos contigs com MegaHit v.1.2.9, análise por BlastX usando Diamond v.2.0.7, extensão e anotação de sequências virais genômicas no Geneious Prime v.11.0.5, alinhamentos com MAFFT v.7. Árvores filogenéticas foram montadas no PhyML 3.0 visualizadas com iTOL v4 e o cálculo dos escores de identidade das sequências virais foi realizado usando o SDT v.1.2. Foram montadas sequências virais correspondentes a cinco espécies já descritas infectando a mandioca, sendo elas: o cassava torrado-like virus 1 (CsTLV 1) e 2 (CsTLV 2), cassava ampelovirus 1 (CsAV 1), cassava vein mosaic virus (CsVMV) e cassava common mosaic virus (CsCMV), além de duas sequências genômicas de espécies virais novas, um ampelovírus e um rhabdovírus. Os vírus montados foram detectados em material radicular por RT-PCR usando primers específicos. As amostras assintomáticas mostraram os mesmos resultados por RT-PCR em campos da PB e RN, revelando a presença do CsTLV 1, e dos novos ampelovírus e rhabdovírus, confirmando a presença de vírus em variedades que não apresentavam sintomas visíveis da doença. A principal diferença dos resultados de RT-PCR utilizando amostras sintomáticas e assintomáticas foi a presença do CsAV 1 em amostras sintomáticas e sua ausência em assintomáticas, destacando a importância dos ampelovírus na sintomatologia da doença. A amostra sintomática BGM-1124 (PL 38) testou positiva por RT-PCR para todos os cinco vírus testados: CsTLV 1 CsTLV 2, CsAV 1, novos ampelovírus e rhabdovírus. Esse padrão de detecção também foi observado em outros pools de amostras de raízes sintomáticas, o que possivelmente indica a importância da infecção mista do CsAV 1 com demais vírus. Esses resultados proporcionaram novos conhecimentos sobre a diversidade viral em acessos de mandioca, contribuindo para a compreensão das interações entre vírus e hospedeiros.

Palavras-chave: *High-Throughput Sequencing* (HTS), ampelovírus, torradovírus, rhabdovírus, *Manihot esculenta*.

GENERAL ABSTRACT

Native to Brazil, cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a crucial resource for food security, primarily due to its ability to store starch in its tuberous roots. Cassava cultivation is carried out through vegetative propagation to maintain genetic uniformity; however, this practice also contributes to the persistence of phytopathogens across growing seasons. In Brazil, viruses from the families *Alphaflexiviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Secoviridae*, and *Solemoviridae* have been reported infecting cassava. Among the economically impactful diseases in South America, cassava frogskin disease (CFSD) is emerging as the most destructive, causing reductions in starch production, constrictions, and fissures in tuberous roots, leading to yield losses of up to 100%. Over the years, studies have linked the disease to various viral species and/or phytoplasmas. Notably, ampeloviruses, potexviruses, and torradoviruses have been identified as potential causes of the disease, yet its exact etiology remains unresolved. This study aims to explore the viral diversity in cassava showing CFSD symptoms, using leaf and root materials from the northeastern region of Brazil. The research focused on cassava accessions from the Cassava Germplasm Bank at Embrapa Mandioca e Fruticultura, including accessions with CFSD symptoms, cultivars derived from seeds, propagative material, and/or healthy roots from Paraíba (PB) and Rio Grande do Norte (RN). Total RNA was extracted from roots and leaves using the CTAB method. HTS was performed by the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) using leaf material. HTS data analysis involved quality checks with FastQC v.0.11.9, preliminary taxonomic classification with Kaiju, removal of ribosomal RNA and duplicates with BBtools v.39.01, trimming of low-quality reads and adapters with Trimmomatic v.0.36, contig assembly with MegaHit v.1.2.9, BlastX analysis using Diamond v.2.0.7, and extension and annotation of viral genomic sequences in Geneious Prime v.11.0.5. Alignments were performed with MAFFT v.7, and phylogenetic trees were constructed using PhyML 3.0 and visualized with iTOL v4. Sequence identity scores were calculated using SDT v.1.2. Genomic sequences corresponding to five previously described viral species infecting cassava were assembled, namely cassava torrado-like virus 1 (CsTLV 1) and 2 (CsTLV 2), cassava ampelovirus 1 (CsAV 1), cassava vein mosaic virus (CsVMV), and cassava common mosaic virus (CsCMV), along with two novel viral genomic sequences, an ampelovirus and a rhabdovirus. These viruses were detected in root material by RT-PCR using specific primers. Asymptomatic samples showed similar RT-PCR results in fields from PB and RN, revealing the presence of CsTLV 1, as well as the new ampelovirus and rhabdovirus, confirming the presence of viruses in varieties without visible disease symptoms. The main difference between RT-PCR results from symptomatic and asymptomatic samples was the presence of CsAV 1 in symptomatic samples and its absence in asymptomatic ones, highlighting the importance of ampeloviruses in the disease's symptomatology. The symptomatic sample BGM-1124 (PL 38) tested positive by RT-PCR for all five viruses: CsTLV 1, CsTLV 2, CsAV 1, new ampeloviruses, and rhabdovirus. This detection pattern was also observed in other pools of symptomatic root samples, possibly indicating the importance of mixed infections involving CsAV 1 and other viruses. These results provide new insights into the viral diversity in cassava accessions, contributing to the understanding of virus-host interactions.

Keywords: High-Throughput Sequencing (HTS), ampeloviruses, torradoviruses, rhabdoviruses, *Manihot esculenta*.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1. MANDIOCA

1.1. CULTIVO E ASPECTOS GERAIS

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um arbusto perene nativo do Brasil, pertencente à família Euphorbiaceae, que engloba cerca de 7.200 espécies conhecidas por sua característica comum de produção de látex (WCVP, 2024). Originária da borda sudoeste da bacia amazônica, conforme indicado por estudos filogeográficos baseados na filogenia da região G3pdh, a mandioca foi posteriormente introduzida na África e Ásia. Apresenta como parente selvagem mais próximo a subespécie *M. esculenta* ssp. *flabellifolia* (Léotard *et al.*, 2009). O gênero *Manihot* consiste em 98 espécies conhecidas, sendo que a grande maioria das espécies selvagens são naturalmente encontradas no Brasil (Reddy, 2015).

Considerada rústica, a mandioca é reconhecida por sua capacidade de adaptação às mais diversas condições de clima e solo. O cultivo ocorre principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, onde a precipitação pluvial é um fator crucial, já que o cultivo ocorre majoritariamente sem irrigação. O regime de chuvas ideal varia entre 1.000 mm e 1.500 mm anuais, com boa distribuição ao longo de 6 a 8 meses do ciclo vegetativo da cultura, embora a planta também prospere em áreas de regiões semiáridas com precipitações mais baixas entre 500 mm e 700 mm, desde que as chuvas sejam bem distribuídas (De Mattos, Farias and Ferreira Filho, 2006; Maluf, Matzenauer and Maluf, 2011). A temperatura ideal para o desenvolvimento da planta é em torno de 25°C, e temperaturas abaixo de 15°C prejudicam seu crescimento, o que limita o cultivo em períodos mais frios (Homma *et al.*, 2016). A cultura se adapta bem a solos variados, desde que haja boa disponibilidade de nutrientes, e recomenda-se o plantio em solos profundos, com boa drenagem e textura média. Sua capacidade de armazenar amido nas raízes tuberosas torna o cultivo uma opção viável para áreas onde outras culturas podem enfrentar dificuldades. Essa característica contribui para a importância da mandioca como fonte de alimento e matéria-prima em várias regiões do mundo (Legg *et al.*, 2015).

No Brasil, a mandioca é descrita em patrimônios bibliográficos sendo citada desde o século XVI, por autores que relatam sobre a vida no Brasil colônia, ressaltando a importância da cultura no país. A literatura aborda pontos sobre a domesticação da mandioca pelos indígenas, a produção de farinha e beijus, conforme enaltecido em uma passagem de Diálogos das Grandezas do Brasil:

“Os mantimentos, de que se sustentam os moradores do Brasil, brancos, índios e escravos de Guiné, são diversos, uns sumamente bons, e outros não tanto dos quais os principais e melhores são três, e destes ocupa o primeiro lugar a mandioca, que é a raiz de um pau que se planta de estaca, o qual, em tempo de um ano, está em perfeição de se poder comer” (Brandão, 2010).

Esses registros abortam descrições detalhadas sobre as características botânicas e formas de plantio da cultura como citado em Tratado Descritivo do Brasil em 1587 “Planta-se a mandioca em todo o ano, não sendo no inverno, e quer mais tempo seco que invernososo, se o inverno é grande apodrece a raiz da mandioca nos lugares baixos.” (Sousa, 2000). Antes mesmo da colonização do Brasil, na Amazônia, tribos indígenas adotavam o plantio de manivas após queima da vegetação local visando limpeza e obtenção de nutrientes a partir das cinzas geradas da queima (Piperno, 2011).

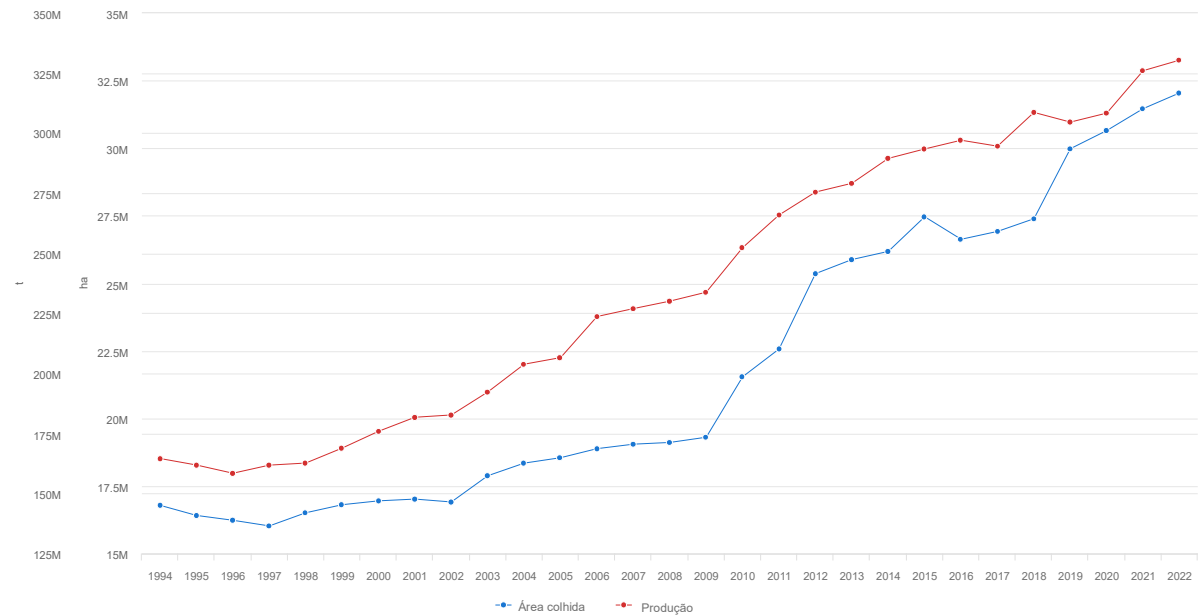
Uma característica importante da mandioca é a presença de glicosídeo cianogênico, que está distribuído de forma errática em toda a planta. Dentre os glicosídeos cianogênicos conhecidos, a linamarina e lotaustralina estão presentes na cultura. A linamarina é o composto mais abundante, principalmente em folhas, caule e córtex da raiz tuberosa (Bradbury and Denton, 2010). A β -glicosidase (linamarase) é uma enzima presente no tecido vegetal da planta sendo fisicamente separada da linamarina, uma vez que haja rompimento do tecido a interação desses compostos levam à hidrólise e produção de ácido cianídrico (HCN), sendo este um composto químico tóxico devido a presença de ciano. Em outros casos, o contato da linamarina com ácidos (como o do suco gástrico) também levam a produção do HCN. Dependendo dos níveis de glicosídeo cianogênico e do risco que a ingestão de altas quantidades de HCN representa para a saúde humana, a mandioca é classificada como “macaxeira”, “aipim” ou “mandioca mansa” para aqueles cultivares com baixo potencial cianogênico e “mandioca brava” para as que apresentam alto potencial cianogênico (Ceballos and Cruz, 2012).

Apesar da capacidade de plantas monoicas, como a mandioca, de produzir sementes férteis, a propagação vegetativa é preferida para o plantio devido à capacidade de manter a uniformidade genética de uma variedade cultivada de uma estação para outra. Esse método de plantio oferece a vantagem da praticidade no estabelecimento de novas safras, porém, também contribui para a persistência dos patógenos de uma safra para outra. Este é um fato muito importante na epidemiologia dos vírus que infectam a cultura (Legg *et al.*, 2015).

1.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Sendo uma das principais fontes de alimento em países da África e América do Sul, a produção mundial de mandioca vem crescendo ao longo dos anos (Figura 1). No ano de 2022, a produção mundial de mandioca fresca gerou um total estimado de 330.408.753,77 toneladas (t). Neste ano, o Brasil atuou como sexto maior produtor mundial de mandioca, responsável por 17.648.564 t, com rendimento médio de 14.938 Kg por hectare (ha), tendo o Estado do Pará como maior produtor do país (FAO, 2024; IBGE, 2024).

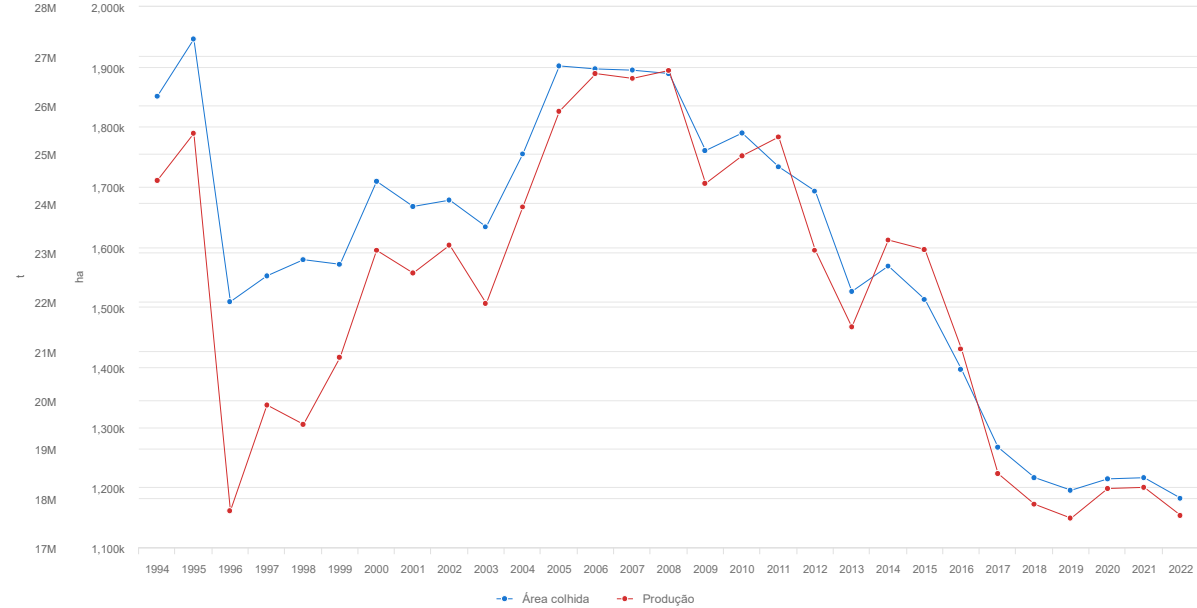
Figura 1. Produção e área colhida de mandioca fresca no mundo entre 1994 e 2022.



Fonte: FAO, 2024.

Ao analisar a produção individual do Brasil, observa-se um decaimento na produção ao longo dos anos, sendo que nos últimos cinco anos a quantidade de toneladas produzida permaneceu abaixo do número de área colhida (Figura 2). Em 1977, a região Nordeste do Brasil chegou a produzir sozinha 13.708.165 t, o que representou 52.87% da produção brasileira daquele ano. No entanto, no ano de 2022, a produção da região Nordeste foi de 3.768.336 t, representando apenas 21,4% da produção total do país. Essa queda é muito significativa para a região (FAO, 2024; IBGE, 2024).

Figura 2. Produção e área colhida de mandioca fresca no Brasil entre 1994 e 2022.



Fonte: FAO, 2024.

Essa diminuição na produção e na área colhida nacional pode ser explicada ao examinarmos as estatísticas de cada região do Brasil separadamente (Tabela 1). As regiões Norte e Nordeste juntas representam 57% da produção nacional de mandioca (t) em 68% das áreas cultivadas (ha), sendo responsáveis pelas maiores produções no país. Contudo, essas regiões apresentam baixa eficiência produtiva (t/ha), ou seja, têm os menores índices de rendimento em kg/ha de mandioca produzida. Santiago *et al.* (2023) correlacionam essa baixa produtividade a instabilidade nos preços da farinha, limitação em tecnologias de produção, além dos longos períodos de estiagem da região Nordeste. Em contrapartida, a Região Sul, com apenas 22% das áreas plantadas, é responsável por mais de 22% da produção nacional, liderando em produtividade com um rendimento de 21.891,85 kg/ha, resultado dos investimentos em técnicas de produção mais avançadas ao longo dos anos.

Tabela 1 – Produção brasileira de mandioca em 2022.

Região	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (t)	Rendimento médio (t/ha)	Participação na produção (%)
Norte	425.727	6.280.008	14,75	35,6
Nordeste	377.890	3.768.336	9,97	21,4
Sudeste	119.638	2.291.462	19,15	13,0
Sul	183.996	3.876.576	21,07	22,0
Centro-Oeste	74.231	1.432.182	19,29	8,1
Brasil	1.181.482	17.648.564	14,94	100,0

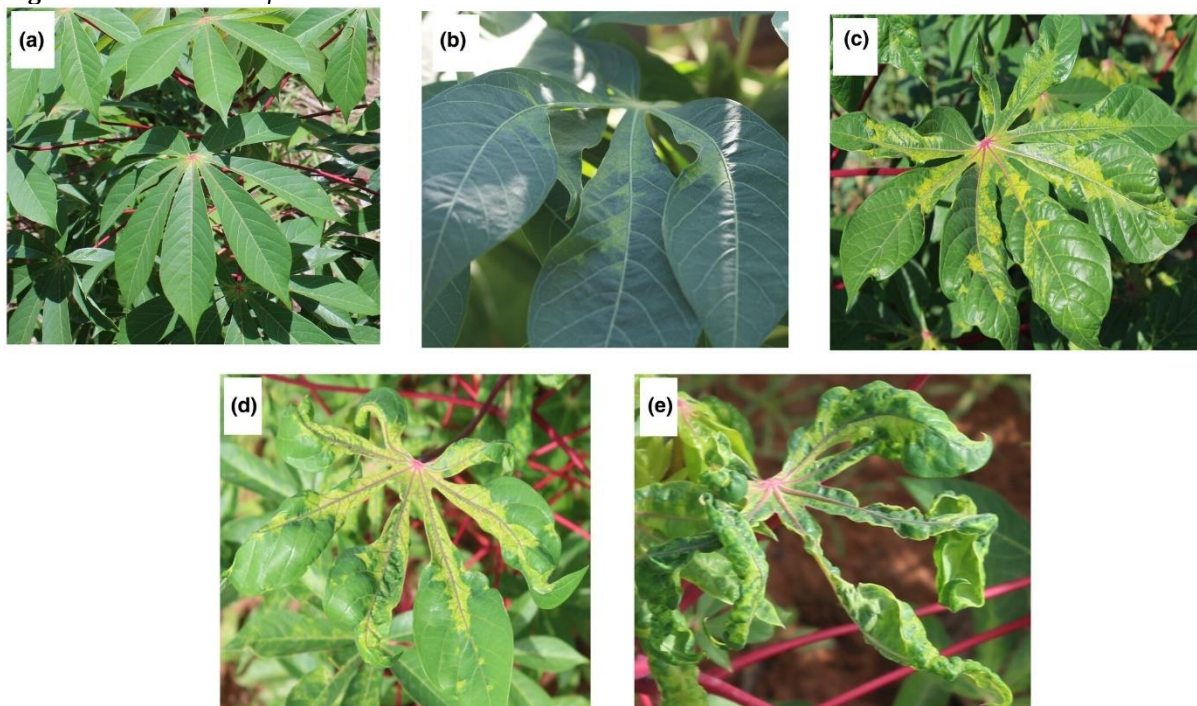
Fonte: IBGE, 2022.

No Nordeste, a maior parte dos cultivos por pequenos e médios produtores ocorre em condições de sequeiro devido a distribuição irregular de chuvas e por períodos prolongados de seca (Silva *et al.*, 2011), impactando negativamente na produtividade da mandioca ao comprometer a fisiologia da planta (El-Sharkawy, 2007). Além disso, a falta de controle de plantas daninhas por parte desses produtores também interfere no desenvolvimento da cultura (Albuquerque *et al.*, 2008).

1.3. EPIDEMIAS VIRAIS NA MANDIOCA NO MUNDO

No século XVI, quando a mandioca foi introduzida no continente africano por navegadores portugueses, por motivos que permanecem desconhecidos, nenhum dos vírus que acometem a cultura na região Neotropical foi cointroduzido no continente (Jones, 1959). No entanto, em 1894 na antiga África Oriental Alemã, atual no nordeste da Tanzânia, foi observado o que parecia ser um sintoma de mosaico na mandioca (Figura 3). Na época o sintoma foi descrito originalmente pelo termo "kräuselkrankheit" (doença do enrolamento das folhas) (Warburg, 1894). Apesar dos indícios, houve pouca preocupação sobre o impacto que essa nova doença geraria. Entre os anos de 1929 e 1937 a doença até então conhecida como doença do mosaico da mandioca (*Cassava Mosaic Disease*, CMD) se disseminou da costa sudeste do continente africano até a África ocidental. Somente em 1983, quase 90 anos depois do primeiro relato da doença, a etiologia do CMD africano foi ligada a virions geminados de genoma bipartido de DNA circular de fita simples pertencente ao gênero *Begomovirus* (Bock and Woods, 1983).

Figura 3. Sintomas do *african cassava mosaic virus* em diferentes níveis de severidade.



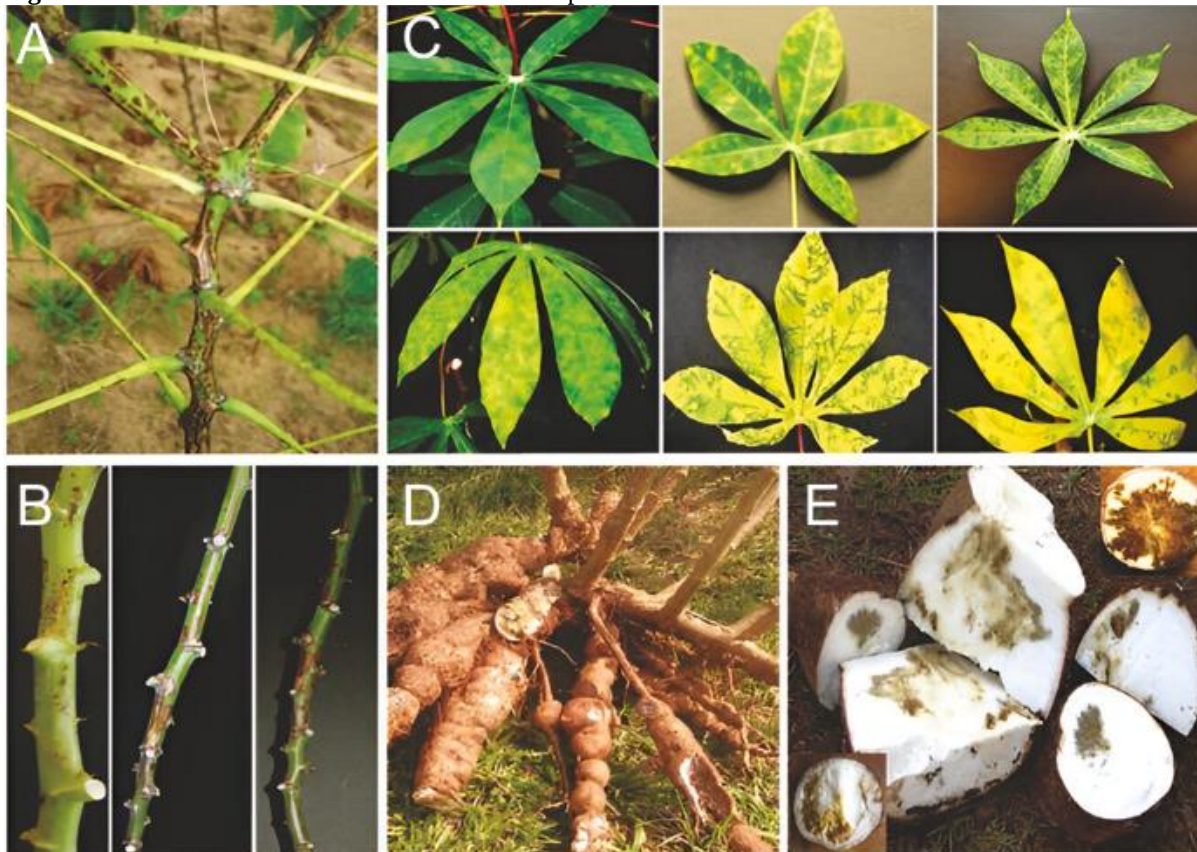
Doença representada em escala de 1 (sem sintomas) a 5 (sintomas muito graves). (a) = 1, (b) = 2, (c) = 3, (d) = 4, (e) = 5. **Fonte:** Soro *et al.*, 2021.

Dentre as doenças virais que geram perdas significativas na cultura, duas espécies dentro do gênero *Begomovirus* se destacam no continente Africano, o *Begomovirus manihotis* (african cassava mosaic virus, ACMV) e o *Begomovirus manihotisafricaense* (east african cassava mosaic virus, EACMV). Ambos ocasionam epidemias graves devido ao papel preponderante da mandioca como fonte primária de carboidratos para a maioria da população africana (Dunstan and Chuma, 2017). Entre os anos de 1992 e 1997 a doença devastou produções na Uganda, Sudão, Quênia, Tanzânia e leste da República Democrática do Congo, causando perdas superiores a US\$ 60 milhões por ano e resultando em mortes relacionadas à fome (Otim-Nape *et al.*, 1997; Thresh, Otim-Nape and Fargette, 1998; Legg and Fauquet, 2004).

Em 1936, também no nordeste da Tanzânia, uma segunda doença começou a ser observada na cultura, apresentando sintomas foliares distintos do CMD e podridão nas raízes tuberosas (Storey, 1936). Em 1950, estudos mais avançados declaram que os sintomas dessa nova doença, que passou a ser conhecida como doença das estrias marrons da mandioca (*Cassava Brown Streak Disease*, CBSD), poderiam incluir necrose da raiz tuberosa, constrições radiais, clorose foliar e estrias marrons nos caules (Figura 4). Essa é uma doença que atinge todas as partes da planta. A gravidade da doença varia a depender das condições ambientais, cultivar de mandioca utilizado no plantio, cepa viral e idade da planta (Nichols, 1950). Sintomas leves na parte aérea da planta no início da doença dificultam o diagnóstico

do pequeno produtor que grande parte das vezes só descobrem que a planta estava infectada no momento da colheita (Legg, Kumar and Kanju, 2015).

Figura 4. Sintomas de CBSD visíveis em diferentes partes da mandioca.



Listras marrons no caule jovem (A, B). Diferentes níveis de clorose plumosa nas folhas (C). Condições na superfície da raiz (D). Necrose da raiz (E). **Fonte:** Kanju *et al.*, 2015.

A doença ocasionada pelo vírus da estria marrom da mandioca (cassava brown streak virus, CBSV), representada pela espécie *Ipomovirus brunusmanihotis*, da família *Potyviriidae*, representa grande ameaça para milhões de produtores de mandioca no continente Africano. A dificuldade no diagnóstico do CBSD contribuiu significativamente para a distribuição da doença. Em cultivares mais suscetíveis, o CBSD provoca perda de rendimento de até 70% na produção devido a necrose que se desenvolve seis meses após o plantio (Alicai *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2012).

Ainda não existem relatos de geminivíroses ou potyvíroses associados a doenças em mandioca nas Américas, portanto, até o presente momento esses vírus são restritos a epidemias do continente Africano e Sudeste Asiático (Calvert, Cuervo and Lozano, 2012, Jiménez *et al.* 2019). Estudos que realizam a detecção de sequências de espécies virais presentes na cultura permitem identificar surtos e epidemias precocemente, possibilitando a implementação de medidas de controle e prevenção adequadas. Seleção de material de plantio

sadio, uso de variedades resistentes e *roguing* são fundamentais para resguardar os agricultores, minimizando perdas financeiras e preservando a sustentabilidade econômica da produção de mandioca.

2. VIROSES NA CULTURA DA MANDIOCA NO BRASIL

O epicentro de origem da mandioca encontra-se na região Neotropical. Várias doenças virais neotropicais exibem caráter assintomático, não acarretando danos substanciais às plantações, podendo sugerir uma coevolução prolongada entre hospedeiros e patógenos (Calvert, Cuervo and Lozano, 2012). Dos vírus que infectam a cultura da mandioca no Brasil, podemos destacar os de genoma de RNA pertencentes às seguintes famílias virais: *Alphaflexiviridae*, *Closteroviridae*, *Solemoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Secoviridae*. Além disso, também são relatados os vírus de genoma de DNA da família *Caulimoviridae* (Tabela 2). Diferentemente do que ocorre no continente Africano, não foram registradas sequências de geminivírus ou potyvírus associadas a doenças na mandioca nas Américas até o presente momento (Calvert, Cuervo and Lozano, 2012).

Tabela 2 – Vírus relatados na cultura da mandioca no Brasil.

Nome do vírus	Família/Gênero	Referência	Sequência	Diagnóstico
cassava common mosaic virus (CsCMV)	<i>Alphaflexiviridae</i> / <i>Potexvirus</i>	Calvert <i>et al.</i> (1996)	U23414	Clonagem de c-DNA - Sanger
cassava virus X (CsVX)	<i>Alphaflexiviridae</i> / <i>Potexvirus</i>	Albuquerque <i>et al.</i> (2023a)	OP852337	HTS
cassava vein mosaic virus (CsVMV)	<i>Caulimoviridae</i> / <i>Cavemovirus</i>	Kochko <i>et al.</i> (1998)	NC_001648	PCR
cassava ampelovirus 1	<i>Closteroviridae</i> / <i>Ampelovirus</i>	Winter <i>et al.</i> (2021)	MW929100	HTS
cassava polerovirus (CsPV)	<i>Solemoviridae</i> / <i>Polerovirus</i>	Oliveira <i>et al.</i> (2020)	MN172358	RT-PCR
SN	<i>Rhabdoviridae</i> / nucleorhabdovirus*	Kitajima and Costa (1979)	NS	Leaf dip
cassava torrado-like virus 1 (CsTLV 1)	<i>Secoviridae</i> / <i>Torradovirus</i>	Oliveira <i>et al.</i> (2020)	MN194209	RT-PCR
cassava torrado-like virus 2 (CsTLV 2)	<i>Secoviridae</i> / <i>Torradovirus</i>	Albuquerque <i>et al.</i> (2023b)	ON887638 ON887639	HTS

*Os nucleorhabdovírus estão classificados nos gêneros: *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, *Gammanucleorhabdovirus*. HTS: *High-Throughput Sequencing*; PCR: *polymerase chain reaction*; RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*; SN: sem nome; NS: não sequenciado.

Assim que os primeiros grupos de fitovirologia começaram a se estabelecer no Brasil na década de 30 (Costa, 1986), os estudos sobre doenças virais na mandioca começaram a ganhar importância no país. A doença do mosaico comum da mandioca foi

descrita pela primeira vez em 1938 pelo Dr. Karl Silberschmidt, um alemão que na época comandava o Instituto biológico em São Paulo (Silberschmidt, 1938). Sabendo da importância econômica do mosaico da mandioca no continente africano, a doença passou a ser estudada por demais pesquisadores nos anos seguintes (Costa, 1940). As plantas infectadas incluíam sintomas na região adaxial das folhas incluindo mosaico, bolhosidade (Figura 5) e sintomas cloróticos de manchas e estrias branco-amareladas, com 2 a 3 mm de largura com sintomas mais severos durante o inverno. A América do Sul é principalmente afetada pela doença devido às condições subtropicais presentes nas áreas de cultivo. O porte das plantas afetadas é reduzido, gerando perda de produção de até 60% (Costa and Kitajima, 1972). No Brasil as perdas na cultura podem chegar a 30% (Venturini *et al.*, 2016).

Figura 5. Sintomas do mosaico comum.

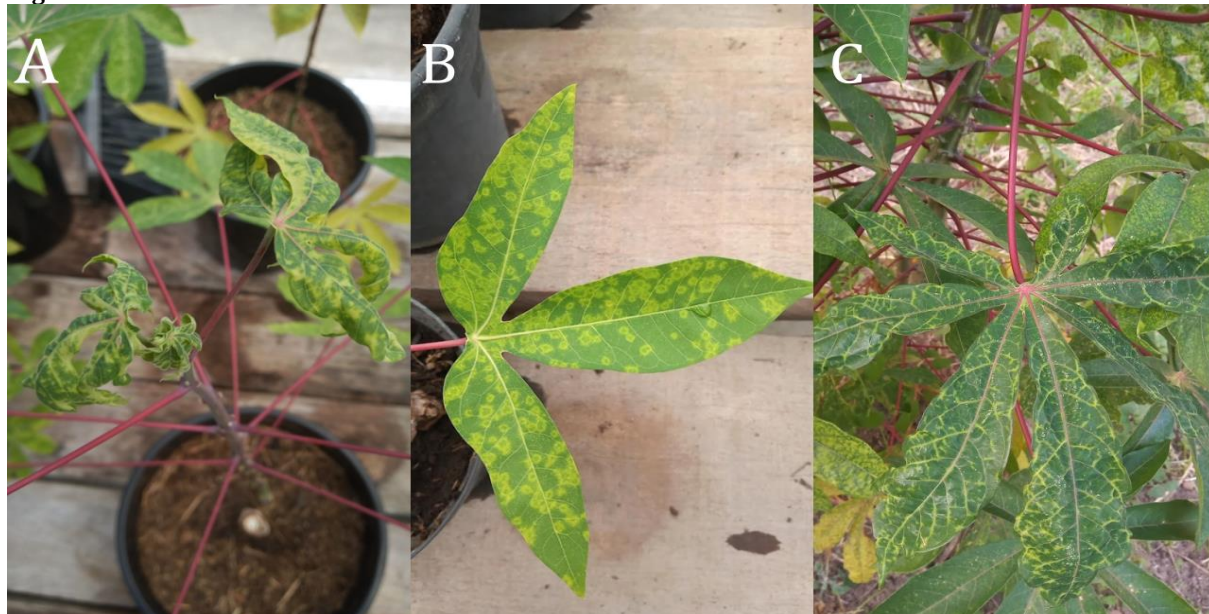


Mosaico e bolhosidade (A e B). **Fonte:** Autoria própria.

Na década de 40, a doença do mosaico das nervuras foi observada pela primeira vez (Costa, 1940). Distribuída principalmente pela região do semiárido nordestino do Brasil, a doença reduz a qualidade da raiz de mandioca produzida (Venturini *et al.*, 2016). Os sintomas da doença afetam principalmente as folhas da cultura, sendo caracterizados pela presença de cloroses intensas entre as nervuras primárias e secundárias, podendo coalescer e formar mosaicos (Figura 6). Manivas infectadas originam plantas com distorção foliar e epinastia em folhas jovens em casos severos da doença. Esses sintomas são transitórios e as folhas seguintes podem não apresentar sintomas (Calvert, Ospina and Shepherd, 1995). O impacto econômico da doença ainda não está claramente definido, devido a sua baixa incidência nos campos de mandioca. Alguns estudos sugerem que um ataque severo do vírus pode reduzir a produtividade das variedades BRS Kiriris e BRS Jari em até 30%, além de comprometer a

qualidade do produto final ao alterar o teor de amido nas raízes (Otsubo and Lorenzi, 2004, Venturini *et al.*, 2016).

Figura 6. Sintomas do mosaico das nervuras.



Epinastia e distorção foliar (A); anel clorótico entre nervuras (B); cloroses intensas entre as nervuras (C). **Fonte:** Autoria própria.

Pesquisas de campo realizadas na década de 70 por Pineda, Jayasinghe e Lozano (1983) na Colômbia identificaram a doença do couro de sapo (*Cassava Frog Skin Disease* - CFSD). Essa é a doença economicamente mais relevante da mandioca na América Latina, causando perdas que variam de 50% a 100% da produtividade das raízes (Reddy, 2015). O CFSD vem sendo descrito nas lavouras da região Centro-Sul do Brasil. A ocorrência de um complexo viral ainda não bem compreendido na mandioca tem sido associado à doença nos últimos anos (Carvajal-Yepes *et al.*, 2014; Silva, Picoli and Romano, 2021).

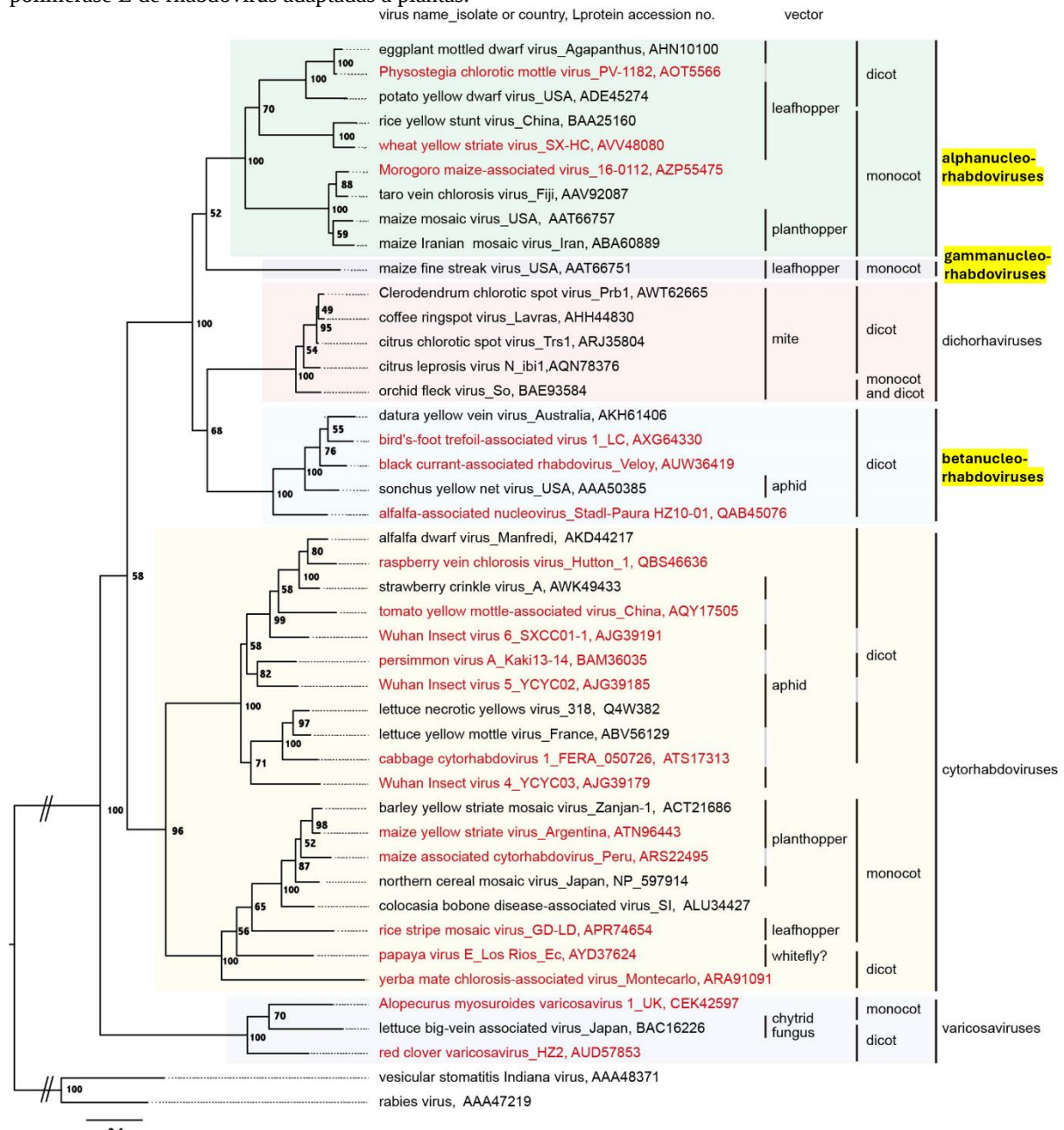
2.1. NUCLEORHABDOVÍRUS

A família *Rhabdoviridae* compreende membros com vírions baciliformes (em forma de bala ou bastonete) de genoma de RNA de fita simples (ss) senso negativo (-) que variam de 10–16 kb (Kilobases), sendo a partícula da maioria das espécies dessa família envelopada (Walker *et al.*, 2022). Esses vírus podem infectar uma ampla gama de espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas, animais invertebrados, vertebrados e humanos. São responsáveis por doenças como a raiva, que representa risco à saúde pública. Na agricultura, os vírus dessa família infectam diversas culturas como o tomate, milho, berinjela, pêssago, trigo, batata, groselha, pimenta, cereais entre outros. Na rizicultura os rhabdovírus provocam

perdas econômicas significativas no continente asiático levando a perdas de 70 a 90% da produção de arroz (Chen, 1984; Zhen, 2005).

Os rhabdovírus que infectam plantas e artrópodes vetores estão classificados segundo a filogenia do gene L na subfamília *Betarhabdovirinae*. Essa subfamília atualmente agrupa seis gêneros (Kuhn *et al.*, 2023). Historicamente membros do antigo gênero *Nucleorhabdovirus* tinham como característica principal apenas o sítio de replicação viral, se replicando e amadurecendo nos núcleos das células infectadas. À medida que novos genomas da subfamília *Betarhabdovirinae* se tornaram disponíveis para análises filogenéticas, uma reclassificação tornou-se necessária, visto que os nucleorhabdovírus não formavam um único clado monofilético (Figura 7). Portanto, então esse gênero foi separado em três novos gêneros: *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus* e *Gammanucleorhabdovirus* (Kuhn *et al.*, 2020).

Figura 7. Árvore filogenética de máxima verossimilhança utilizando sequências de aminoácidos da proteína polimerase L de rhabdovírus adaptadas a plantas.



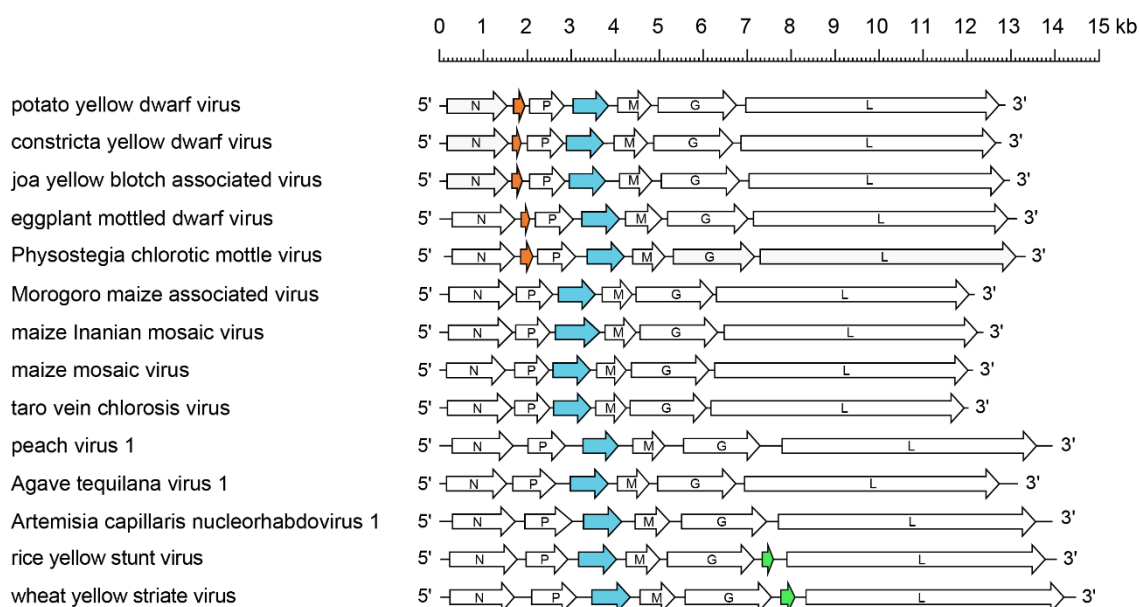
Os novos gêneros classificados no antigo gênero *Nucleorhabdovirus* estão destacados em amarelo. Espécies virais propostas, mas ainda não aceitas nos respectivos gêneros são indicadas pela cor vermelha. A árvore está enraizada utilizando sequências de dois rhabdovírus animais como grupo externo. Os números nos nós indicam suporte de bootstrap (100 repetições). **Fonte:** Freitas-Astúa *et al.*, 2019.

Partículas de nucleorhabdovírus já foram encontradas por meio da técnica de microscopia eletrônica por *leaf dip* em tecidos de folhas mandioca (cultivar guaxupe) assintomáticas. Essas plantas eram mantidas por propagação vegetativa em casa de vegetação e utilizadas como plantas de teste para vírus em mandioca e micoplasmas. As partículas foram encontradas com extrema dificuldade e foram detectadas apenas no parênquima lacunoso da folha. O fato da partícula ter sido observada em plantas assintomáticas sugere que o vírus

poderia causar infecção latente (Kitajima and Costa, 1979). Até os dias de hoje, ainda permanece desconhecida a função biológica desses vírus na cultura da mandioca.

Membros do gênero *Alphanucleorhabdovirus* contém em seus genomas cinco *Open Reading Frame* (Fases de Leitura Aberta, ORFs) na ordem 3'-N-P-M-G-L-5', que codificam para as proteínas estruturais canônicas da família *Rhabdoviridae*, sendo elas respectivamente a proteína do nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (cofator da polimerase) (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e RdRp (L). Além disso, membros desse gênero apresentam em suas sequências virais duas ORFs putativas em seu genoma. Uma ORF codifica proteínas de movimento célula-a-célula e a outra proteínas acessórias de função desconhecida (Figura 8) (Jackson *et al.*, 2005).

Figura 8. Representação esquemática de genomas de espécies do gênero *Alphanucleorhabdovirus* apresentadas em polaridade reversa (sentido positivo).



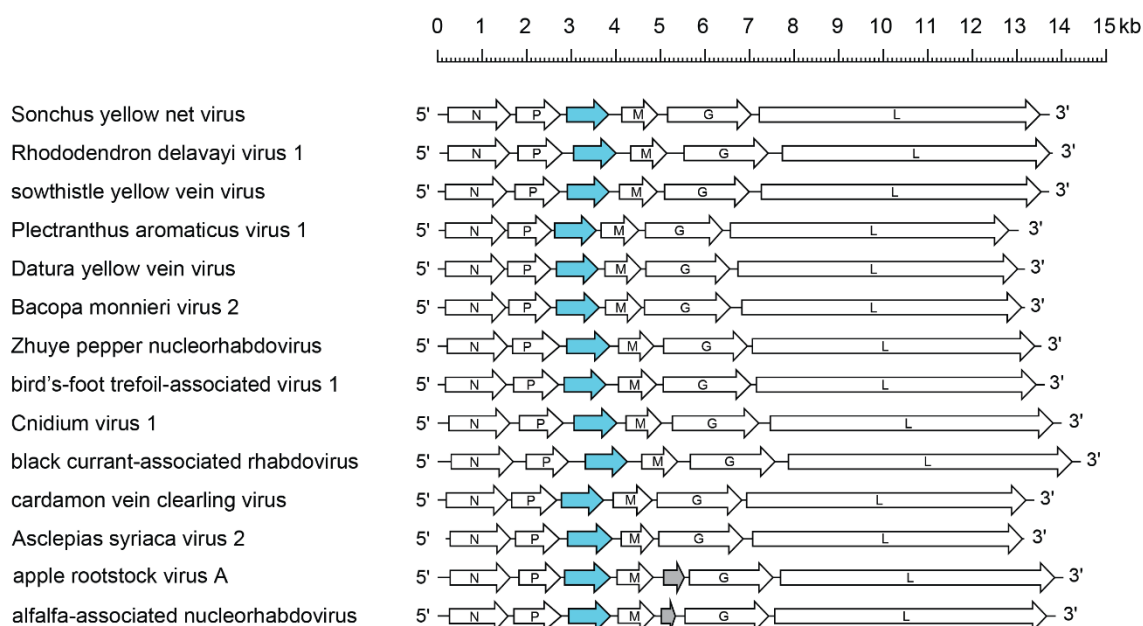
N, P, M, G e L representam ORFs que codificam as proteínas estruturais. ORFs que codificam proteínas putativas de movimento célula-a-célula são destacadas em azul. Outras ORFs codificam proteínas acessórias putativas de função desconhecida, incluindo conjuntos de pequenas proteínas homólogas localizadas entre o gene N e o gene P, e entre o gene G e o gene L (em laranja e verde, respectivamente). **Fonte:** ICTV, 2024a.

O envelope viral lipoproteico tem composição lipídica desconhecida e deriva da planta hospedeira ou inseto vetor (Dietzgen *et al.*, 2020). A transmissão ocorre de modo persistente circulativo propagativo por insetos hemípteros (cigarrinhas) (Walker *et al.*, 2018). Alguns vírus desse gênero também são transmitidos durante a propagação vegetativa e outros podem ser transmitidos mecanicamente a partir da seiva infectada (Jackson *et al.*, 2005). Com o passar dos anos, os rhabdovírus evoluíram para aprimorar sua capacidade de se replicar tanto no vetor quanto no hospedeiro, exigindo interações complexas entre plantas

hospedeiras, vírus e vetores artrópodes (Dietzgen *et al.*, 2020).

O gênero *Betanucleorhabdovirus* constitui-se de vírus cujo as sequências virais apresentam regiões intergênicas altamente conservadas, duas ORFs putativas, além das cinco ORFs 3'-N-P-M-G-L-5' comuns ao vírus da família *Rhabdoviridae* (Figura 9). As proteínas virais são produzidas a partir de RNA mensageiro (mRNA) poliadenilados com tamanhos distintos. Conforme demonstrado por análises de genes repórteres, essas proteínas se acumulam em foci subnucleares (Wagner and Jackson, 1997; Martins *et al.*, 1998).

Figura 9. Representação esquemática de genomas de espécies do gênero *Betanucleorhabdovirus* apresentadas em polaridade reversa (sentido positivo).



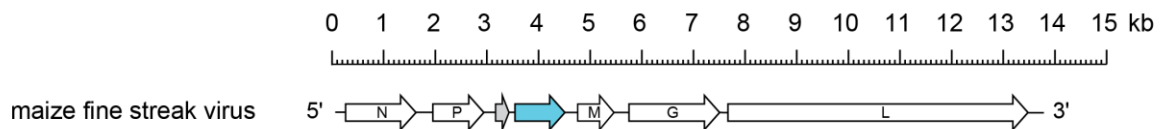
N, P, M, G e L representam ORFs que codificam as proteínas estruturais. ORFs que codificam proteínas putativas de movimento célula-a-célula são destacadas (azul). Proteína de função desconhecida entre o gene M e o gene G (cinza). **Fonte:** ICTV, 2024b.

Até o momento, somente os vírus sonchus yellow net virus, SYN, (*Betanucleorhabdovirus retesonchi*) e sowthistle yellow vein virus, SYVV, (*Betanucleorhabdovirus venasonchi*) tem vetor conhecido, sendo ambos transmitidos por pulgões. O SYN também pode ser transmitido mecanicamente para *Nicotiana benthamiana* (Jackson *et al.*, 2005).

O gênero *Gammanucleorhabdovirus* possui duas espécies aceitas: *Gammanucleorhabdovirus cerealis* (cereal chlorotic mottle virus, CCMoV) e *Gammanucleorhabdovirus maydis* (maize fine streak virus, MFSV). Sabe-se que o MFSV é transmitido de forma persistente pela cigarrinha *Graminella nigrifrons*. O genoma do MFSV é o mais estudado para o gênero (Figura 10), possuindo 13-8 kb de tamanho, com ORFs na ordem gênica 3'-N-P-P3-P4-M-G-L-5', mais uma ORF adicional de função desconhecida

entre o gene P e o gene M. As proteínas codificadas pelas ORFs P3 e P4 não apresentam similaridade com proteínas de outros rhabdovírus, incluindo as proteínas de movimento P3 de outros rhabdovírus vegetais.

Figura 10. Representação esquemática do genoma do MFSV em polaridade reversa (sentido positivo) pertencente ao gênero *Gammanucleorhabdovirus*.

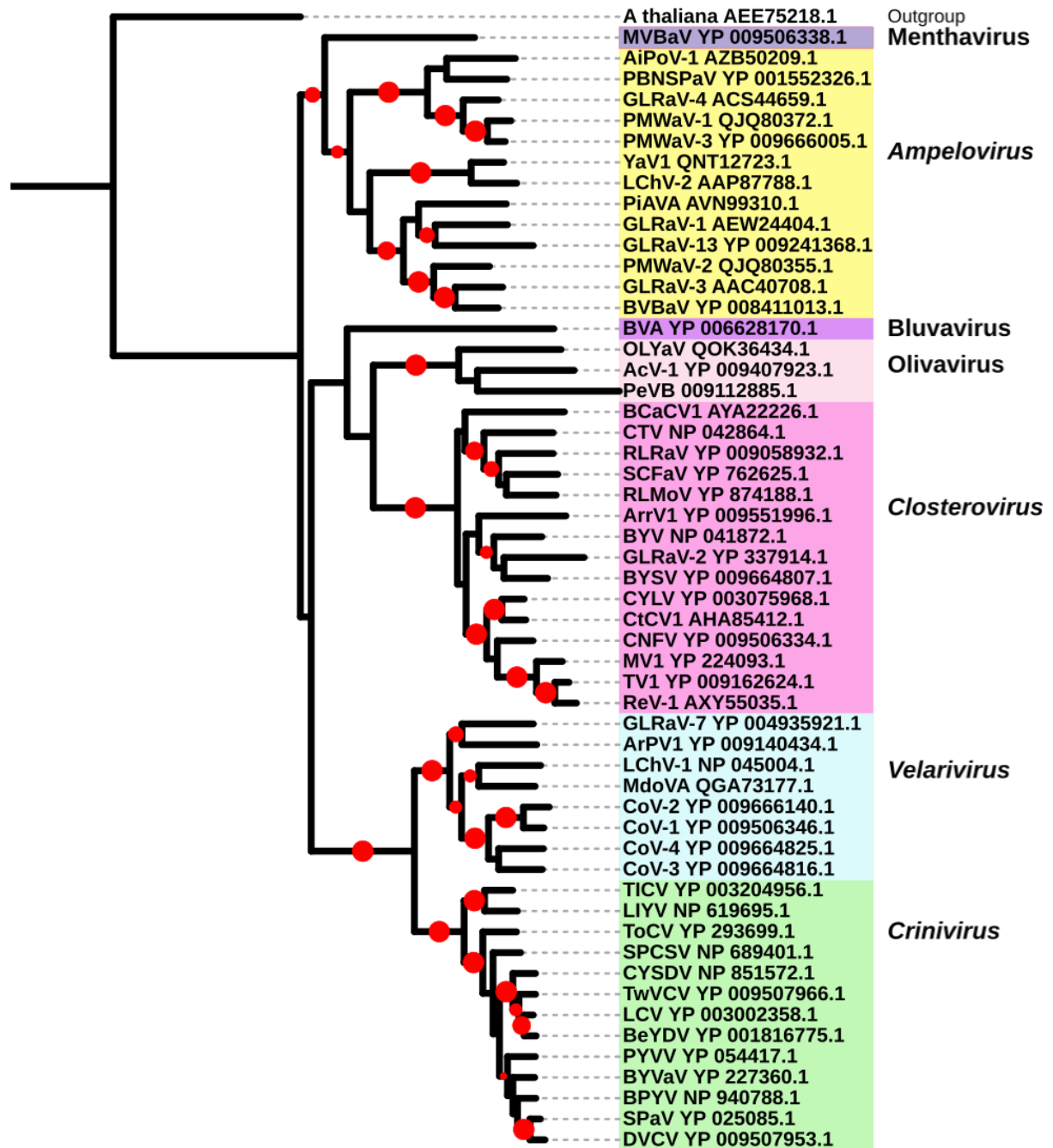


N, P, M, G e L representam ORFs que codificam as proteínas estruturais. As ORFs P3 e P4 codificam respectivamente uma proteína acessória de função desconhecida (cinza) e uma proteína de movimento putativa (azul) **Fonte:** ICTV, 2024c.

2.2. O GÊNERO *Ampelovirus*

A família *Closteroviridae* abriga membros com partículas filamentosas longas e helicoidais não envelopadas que infectam plantas (principalmente dicotiledôneas). O genoma é constituído de RNA de fita simples senso positivo (+) podendo ser mono, bi ou tripartido, com tamanhos que variam de 13.000 a quase 19.000 nucleotídeos. Os membros dessa família estão classificados em sete gêneros: *Ampelovirus*, *Bluvavirus*, *Closterovirus*, *Crinivirus*, *Menthavirus*, *Olivavirus* e *Velarivirus*, conforme filogenia do gene HSP70h (Figura 11) (Fuchs *et al.*, 2020).

Figura 11. Árvore filogenética mostrando as relações entre as espécies e gêneros da família *Closteroviridae* com base na sequência de aminoácidos do gene HSP70h.



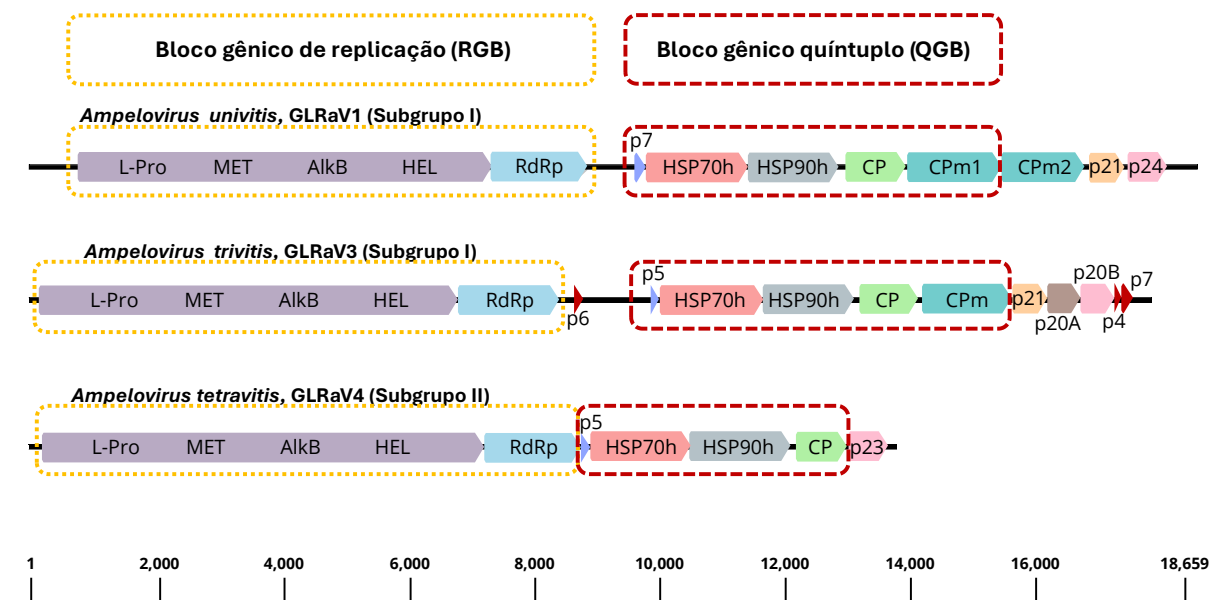
A árvore filogenética de máxima verossimilhança com o bootstrap ultrarrápido de 1.000 réplicas. Os números de acesso do GenBank das proteínas HSP70h usadas para análises são indicados nas pontas dos ramos. O ponto vermelho no ponto de ramificação indica suporte bootstrap de >95%. Fonte: Fuchs et al., 2024.

O genoma viral de membros classificados no gênero *Ampelovirus* possui dois blocos gênicos principais: o bloco gênico de replicação (*replication gene block*, RGB), e o bloco gênico quártuplo (*quintuple gene block*, QGB). O RGB é composto pelas ORFs1a e 1b que são traduzidas diretamente do RNA genômico viral (gRNA). A ORF1a codifica uma poliproteína com os domínios de proteases líderes (L-Pro), RNA metiltransferase (MET), RNA desmetilases (AlkB) e RNA helicase (HEL), enquanto a ORF1b codifica a RdRp.

Adiante do RGB se encontra o QGB que codifica uma pequena proteína hidrofóbica (5-7 kDa), a HSP70h (proteína homóloga de choque térmico de 70 kDa), a HSP90h (proteína homóloga de choque térmico de 90 kDa), a proteína capsidial (CP), e, uma proteína capsidial menor (CPm) (Figura 12). Todas as espécies desse gênero são monopartidas (Maree *et al.*, 2013).

Os membros pertencentes ao gênero *Ampelovirus* podem ser classificados em dois subgrupos levando em consideração a similaridade das sequências, organização gênica das espécies e o tamanho do genoma (Figura 12). O subgrupo I apresenta uma região intergênica entre os blocos gênicos RGB e QGB rica em GC com mais de 600 nucleotídeos (nt) de distância. A extremidade 3' do genoma viral pode ser variável, composto de ORFs que codificam proteínas estruturais e acessórias (Rezaian and Fazeli, 2000; Melzer *et al.*, 2001; Rott and Jelkmann, 2001; Ling, Zhu and Gonsalves, 2004). O subgrupo II difere do subgrupo I por ter o genoma mais reduzido, tanto em tamanho quanto em complexidade, e não apresenta ORF variável. A região intergênica entre os blocos gênicos chega em média a 150 nt de comprimento (Rwahnih, Al *et al.*, 2007; Gambley *et al.*, 2008; Ghanem-Sabanadzovic N *et al.*, 2012; Dey *et al.*, 2019).

Figura 12. Organização genômica de membros do gênero *Ampelovirus*.

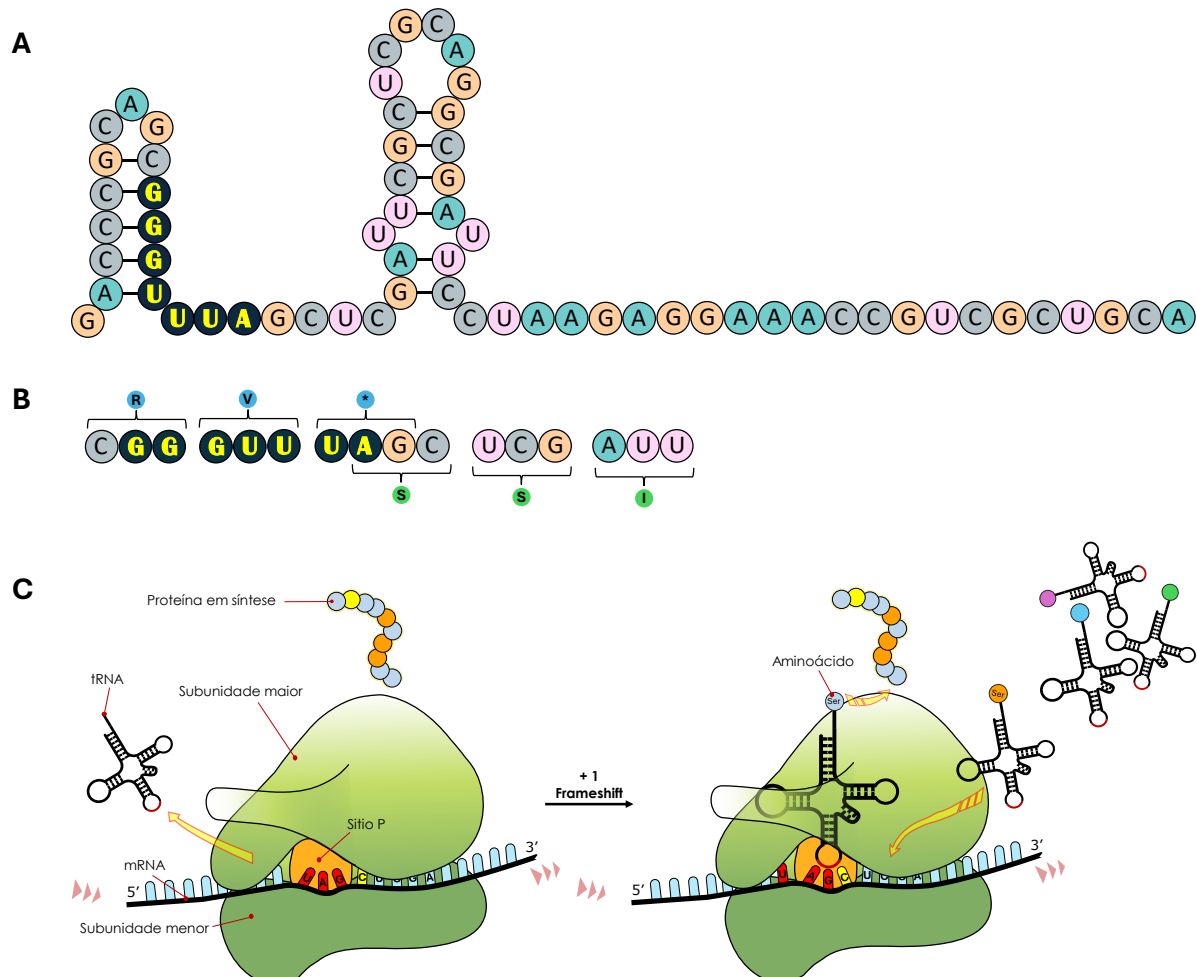


As caixas coloridas representam as ORFs. As proteínas homólogas, que desempenham a mesma função em cada espécie, são representadas por cores iguais entre os três genomas. As ORFs em vermelho p6, p4 e p7 do GLRaV3 tem função desconhecida. L-Pro: protease; MET: metil-transferase; AlkB: domínio de desmetilação B; HEL: RNA helicase; RdRp: RNA polimerase dependente de RNA; HSP70h: homólogo de HSP70; CP: proteína do capsídeo; CPm: proteína do capsídeo menor. **Fonte:** Adaptado de Song, Hanner e Meng, 2021.

A estratégia de expressão genômica da RdRp é feita através do mecanismo de mudança do quadro de leitura através do deslizamento ribossomal +1 (*frameshift ribossomal*

+1 Figura 13), um mecanismo alternativo de tradução para produzir proteínas codificadas pelas ORFs 1a e 1b, que são sobrepostas. No caso dos closterovírus em geral, uma estrutura de *pseudoknot* (estrutura de pseudo-nó) se forma, próximo a sequência “GGGUUUAG”, fazendo com que os ribossomos deem uma pausa. Essa pausa pode ser resolvida por um movimento para frente de um nucleotídeo, ou seja, a tradução é retomada no ribossomo avançado no quadro +1, ao invés de ler o stop códon da ORF1a os ribossomos continuam expressando o domínio da RdRp codificado pela ORF1b. Os RNAs mensageiros subgenômicos são expressos a partir das demais ORFs (Agranovsky *et al.*, 1994; Dolja, Karasev and Koonin, 1994; Fuchs *et al.*, 2020).

Figura 13. Representação esquemática do mecanismo de mudança do quadro de leitura pelo deslizamento ribossomal +1, *frameshift ribossomal +1*.



A estrutura secundária proposta para a região de RNA entre 7983 e 8045 nt. A sequência de consenso “GGGUUUUA” da ORF1a e 1b está marcada com letras em amarelo (A). Códon e aminoácidos para sítio de deslocamento de quadro, as letras nos círculos em azul indicam os aminoácidos do quadro de leitura da ORF1a e as letras no círculo em verde, os aminoácidos da ORF1b. O asterisco denota a parada UAG no ORF1a (B). Ao invés de parar a tradução no códon UAG da ORF1a, o ribossomo avança no quadro de leitura +1 (em amarelo), e um novo quadro é formado a partir do códon AGC, emparelhando-se ao anticódon do tRNA de serina, e a tradução da ORF1b inicia. **Fonte:** Adaptado de Agranovsky *et al.*, 1994.

Os vírus deste gênero podem ser transmitidos de forma semipersistente por cochonilhas (Hemiptera: Pseudococcidae) ou insetos de escamas moles (Hemiptera: Coccidae), que são insetos que se alimentam do floema (Tsai *et al.*, 2010). A transmissão também pode ocorrer por meio de propagação vegetativa. Até o momento, nenhum vírus conhecido pertencente a este gênero foi relatado como sendo transmitido por semente (Koch, Jones and Badillo-Vargas, 2020). Somente o ampelovírus, descrito como firespike leafroll-associated virus (FLRaV), foi transmitido mecanicamente para *N. benthamiana*. Estas apresentaram sintomas virais de enrolamento foliar e clorose somente após 30 dias de inoculação (Dey *et al.*, 2019).

Os ampelovírus já foram descritos infectando folhas de mandioca em um estudo que identificou duas espécies provisoriamente denominadas *Manihot esculenta associated ampelovirus 1* (MEaV-1) e *Manihot esculenta associated ampelovirus 2* (MEaV-2) (Kwibuka *et al.*, 2021). O MEaV-1 foi encontrado em plantações na República Democrática do Congo, Ilha da Reunião, em campos de Madagascar e Mayotte, enquanto o MEaV-2 foi detectado apenas em Madagascar e Mayotte. Análises de recombinação realizadas no mesmo estudo também indicaram evidências de recombinação intraespecífica ocorrendo entre as sequências virais dos isolados de MEaV-2 de Madagascar e Mayotte. No entanto, nenhuma associação clara com sintomas visuais em folhas de mandioca pôde ser identificada, e os sintomas não foram observados nas raízes.

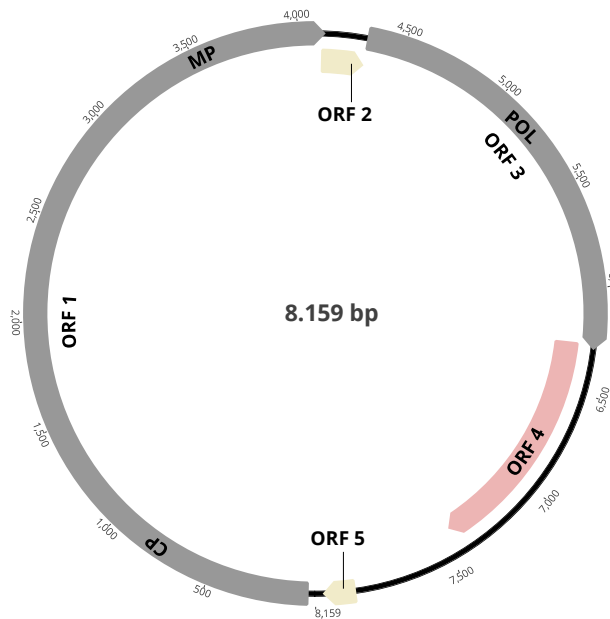
2.3. O GÊNERO *Cavemovirus*

A família *Caulimoviridae* é composta exclusivamente de vírus que infectam plantas, e se caracteriza pelo mecanismo de transcrição reversa como uma marca distintiva da expressão viral. O genoma dessa família é constituído de DNA de dupla fita (ds) circular não covalentemente fechado, que variam de 7,1 a 9,8 kbp. As partículas são encapsidadas por proteínas do revestimento viral, não envelopadas, com vírions de formato isométrico nos gêneros *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus*, *Solendovirus* e *Soymovirus* ou vírions em forma de bacilo para os demais gêneros da família (Teycheney *et al.*, 2020).

O genoma do gênero *Cavemovirus* está representado na Figura 11 pelo cassava vein mosaic virus, CsVMV, (*Cavemovirus venamanihotis*), causador do mosaico das nervuras na mandioca. O CsVMV tem o genoma composto por cinco ORFs (Figura 14). A ORF1 codifica uma poliproteína que contém a capa proteica e proteína de movimento. A ORF3 codifica uma poliproteína que inclui a protease aspártica, transcriptase reversa e ribonuclease RNaseH. A ORF4 codifica o transativador de proteína de tradução. As ORFs2 e 5 codificam

uma proteína de função desconhecida, respectivamente (Calvert, Ospina and Shepherd, 1995; Kochko *et al.*, 1998). Não há evidências conclusivas sobre a transmissão vetorial do CsVMV; até onde se sabe, o vírus é disseminado através de manivas infectadas utilizadas para a propagação da cultura (Teycheney *et al.*, 2020).

Figura 14. Organização e expressão do genoma de um cavemovírus, exemplificado pela espécie *Cavemovirus venamanihotis* (CsVMV) (GenBank NC_001648.1).



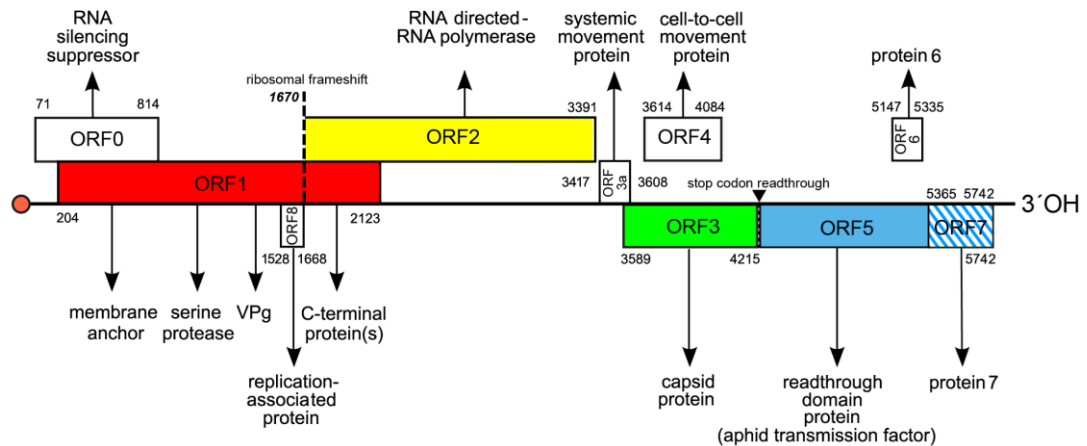
As caixas cinza, amarela e vermelho claro marcam as ORFs. A ORF1 apresenta os domínios proteicos conservados da capa proteica (CP) e proteína de movimento (MP); A ORF3 apresenta o domínio da polimerase (POL). **Fonte:** Adaptado de Kochko *et al.*, 1998.

2.4. O GÊNERO *Polerovirus*

Os vírus da família *Solemoviridae* são construídos de partículas icosaédricas estáveis (20–34 nm de diâmetro) montadas em simetria T=3, tendo como genoma RNA de fita simples sentido positivo (+) monopartido de tamanhos que variam de 4 a 6 kb. Possui uma proteína ligada covalentemente ao terminal 5' (*viral protein genome-linked*, VPg) e não tem cauda poli(A) no terminal 3' (Sõmera *et al.*, 2021). Os genomas dos membros do gênero *Polerovirus* apresentam de 7-10 ORFs (Figura 15). A ORF3a expressa uma proteína responsável pelo movimento sistêmico, a ORF4 codifica para a proteína de movimento célula-a-célula, as ORFs6 e 7 codificam para proteínas de função desconhecida. Essas quatro ORFs são exclusivamente encontradas em genomas de membros do gênero *Polerovirus*. As demais ORFs são comuns em vírus da família *Solemoviridae*. A ORF0 codifica um supressor de silenciamento de RNA. A ORF1 codifica uma poliproteína com os motivos característicos do domínio de ancoragem de membrana. A ORF2 codifica a RdRp. As ORFs0, 1 e 2 são traduzidas diretamente do RNA genômico. A ORF3 codifica a CP. A ORF5 apresenta um

domínio RTD (*readthrough domain*) adjunto a ORF3, onde a ORF5 é expressa quando o ribossomo “ignora” o códon de parada da ORF3. A ORF5 tem função na transmissão por afídeos e retenção viral no floema (Peter *et al.*, 2009). A ORF8 codifica a Rap1, uma proteína associada à replicação e é exclusivamente encontrada no genoma do vírus do enrolamento da batata (potato leafroll virus, PLRV).

Figura 15. Genoma de um polerovírus exemplificado pelo PLRV.

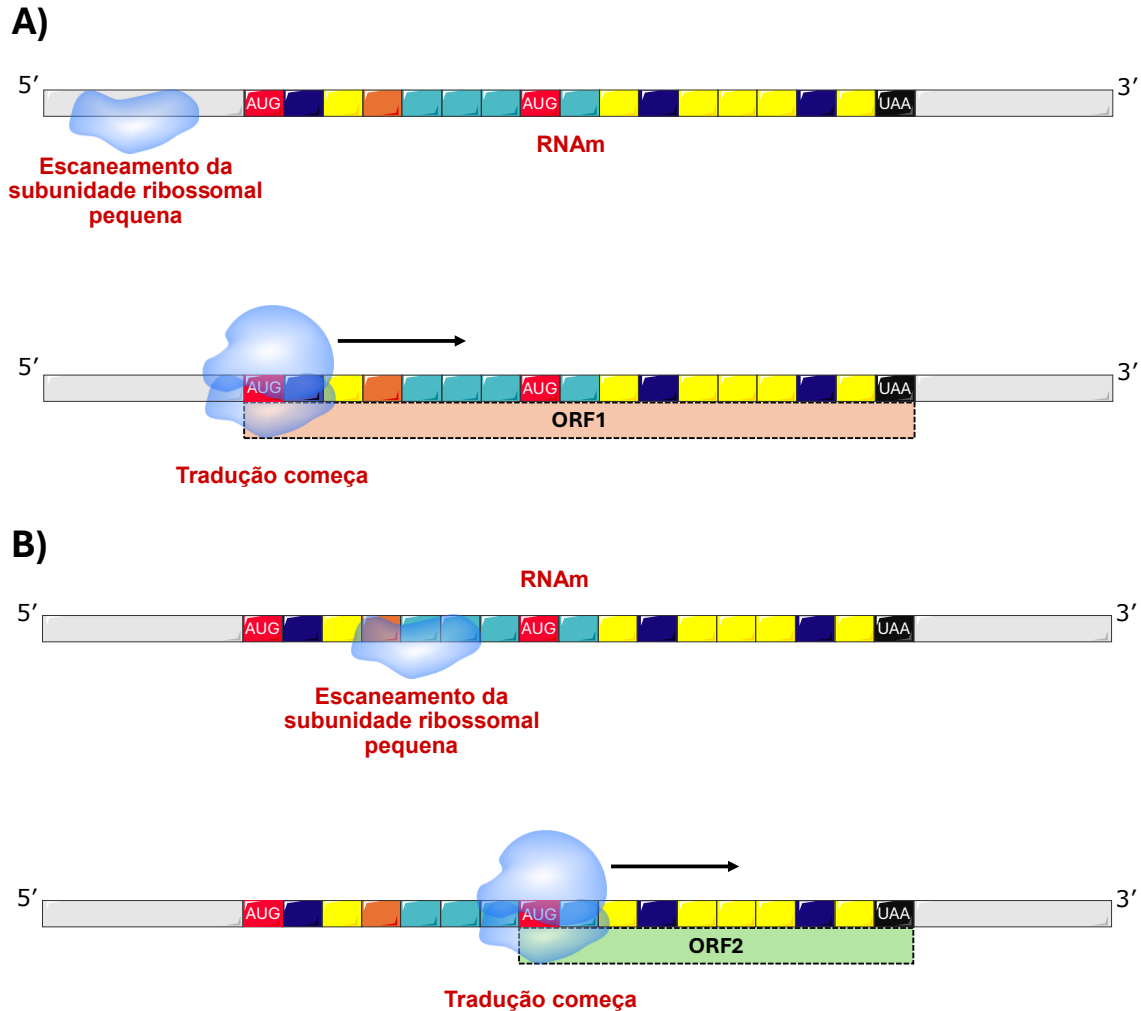


As ORFs são indicadas por caixas retangulares. ORFs homólogas encontradas por outros membros na família são representadas pelas caixas coloridas, e aqueles sem homologia são incolores. O círculo em vermelho na extremidade 3' representa a VPG. **Fonte:** ICTV, 2024d.

A expressão da ORF1 e ORF4 ocorre através de um mecanismo de regulação gênica chamado *leaky scanning*. No início da tradução, a pequena subunidade ribossomal 40S "varre" ou se move no sentido 5' → 3' ao longo da região não traduzida (5'-*Untranslated region*, 5'-UTR) até interagir com um códon de iniciação, assim iniciando o alongamento da cadeia peptídica. No entanto, o ribossomo pode “ignorar” o códon de iniciação da ORF0 e ORF3 e começar a tradução em um outro códon de início mais justamente assim permitindo a síntese da ORF1 e ORF4 (Figura 16). A eficiência com que um ribossomo reconhece e inicia a tradução em um códon de início AUG específico pode ser influenciada pela sequência de nucleotídeos ao redor, conhecida como "contexto" do códon de início. O *leaky scanning* é facilitado pelo encontro de um códon de iniciação sem contexto favorável ao início da tradução (Mayo *et al.*, 1989; Sivakumaran and Hacker, 1998). Em mamíferos, códons de iniciação de contexto “forte” apresentam A ou um G na posição -3 (terceira base antes do AUG), ou um G na posição +4, (onde o A do AUG é o nucleotídeo na posição +1). Códons de iniciação alternativos ao AUG também contribuem para esse mecanismo. Códons como CUG, GUG, ACG, AUU, AUA, UUG e AUC são, sob certas circunstâncias, de 2 a 15% eficientes na iniciação da tradução, sendo o “CUG” o mais eficiente deles (Firth and Brierley, 2012; Fang and Liu, 2023). Em vários vírus de plantas, uma combinação de códons de iniciação

alternativos e de contexto “pobre” permite a produção de três ou até quatro proteínas funcionais a partir de um único transcrito (Fütterer *et al.*, 1996).

Figura 16. Mecanismo de *leaky scanning*.

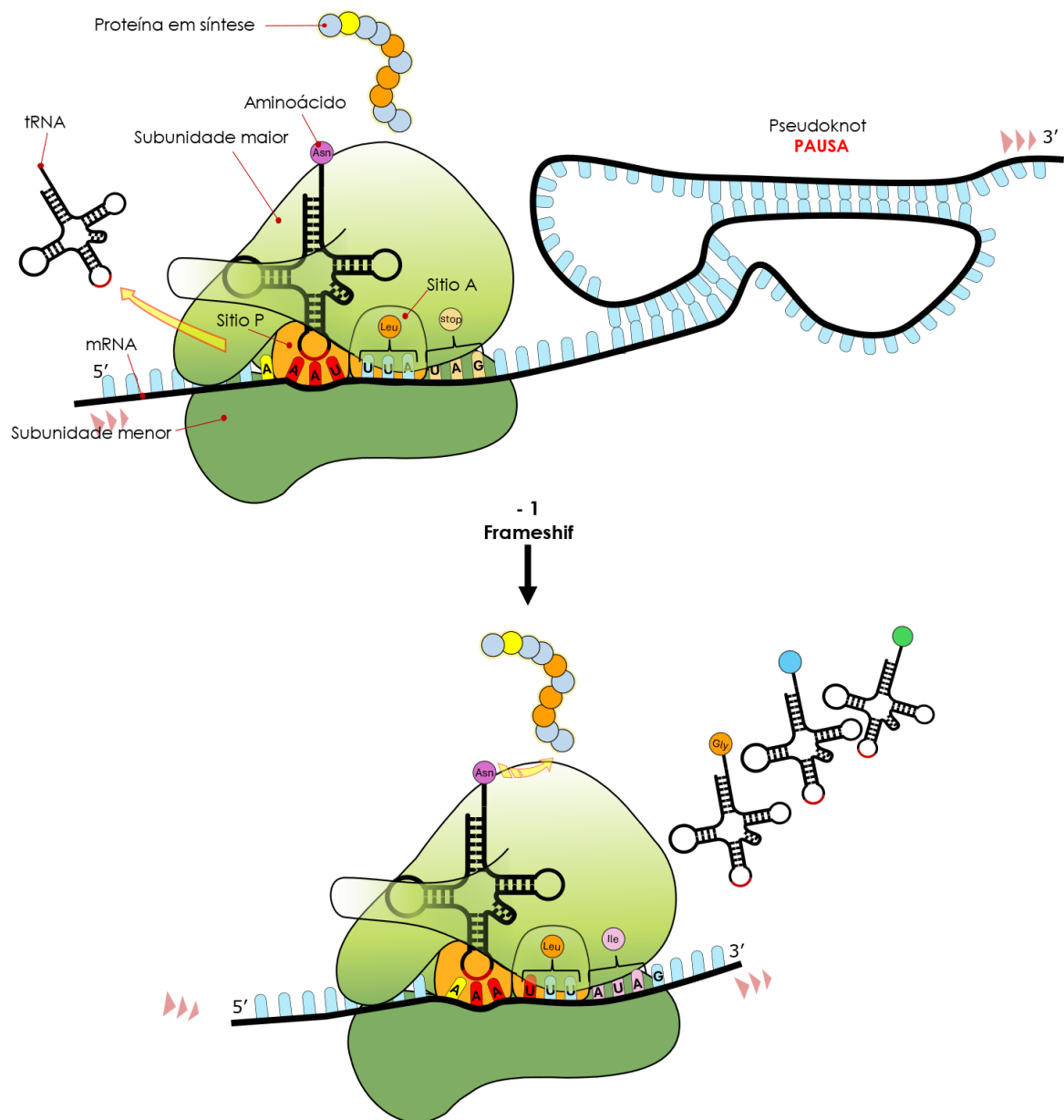


Leitura da ORF1 pelo ribossomo ocorre a partir do primeiro códon de início AUG (A). Leitura da ORF2 pelo ribossomo inicia a partir do segundo códon de início AUG que tem um contexto de iniciação mais “forte” (B). **Fonte:** Adaptado de Ao-Kondo, Kozuka-Hata and Oyam, 2011.

A ORF2 codifica para a RdRp através de um mecanismo de *frameshift ribossomal* -1 (mudança no quadro de leitura pelo deslizamento ribossomal -1). Esse tipo de deslizamento ocorre por dois fatores: um mRNA composto de um motivo X XXY YYZ conhecido como “*slippery sequence*” (sequência deslizante), sequência esta composta por repetições de nucleotídeos onde, o X representa qualquer nucleotídeo (N), Y pode ser uma adenina (A) ou uracila (U) e Z não pode ser uma guanina (G). A presença da *slippery sequence* pode fazer com que o ribossomo deslize um nucleotídeo para frente ou um para trás (Champagne *et al.*, 2022). Além da *slippery sequence*, a presença de estruturas secundárias no mRNA, geralmente um *pseudoknot* ou um *hairpin loop* (grampo) formado quando um RNA

de fita simples tem uma sequência de nucleotídeos complementares que interagem formando um *loop*, favorecem o mecanismo de *frameshift ribossomal*. Em cerca de 10% dos casos, o ribossomo deslizará um nucleotídeo, fazendo com que a tradução siga no quadro -1 (Figura 17) (Aus dem Siepen *et al.*, 2005; Tamm *et al.*, 2009). Por fim, as demais ORFs são traduzidas por dois ou três RNAs subgenômico (sgRNA), o sgRNA1 possui as ORFs 3a, 3, 4 e 5, sgRNA2 as ORF6 e ORF7; a ORF7 também pode ser traduzida do sgRNA3 (Sõmera *et al.*, 2021).

Figura 17. Representação esquemática do mecanismo de deslizamento ribossomal -1, *frameshift ribossomal* -1.



O ribossomo retrocede para o quadro -1 em uma sequência de deslizamento, *slippery sequence* (AAAUUUA). O que deveria ser um stop códon (UAG), se torna no novo quadro em um códon AUA que se emparelha ao anticódon do tRNA da Isoleucina, permitindo que a tradução continue. **Fonte:** Adaptado de Champagne *et al.* 2022.

A transmissão dos vírus desse gênero ocorre quando o afídeo (vetor) adquire a partícula viral se alimentando do floema de plantas infectadas. A medida que se alimenta o vírus é transmitido para plantas saudáveis. A infecção se caracteriza pela necrose do floema, aparecimento de estrias, amarelecimento, encarquilhamento das folhas e atrofiamento das plantas. A partícula viral é adquirida pelo vetor a partir da alimentação do floema (Gildow, 1993). Os vírus entram no hemocel do intestino do pulgão por um processo de transporte mediado por receptor, após o qual circulam na hemolinfa e então entram na glândula salivar acessória por um segundo evento de transporte mediado por receptor. O movimento através das barreiras teciduais dentro do intestino e glândulas salivares acessórias ocorre via endocitose mediada por clatrina (Gray and Gildow, 2003). Além dos pulgões, o pepper whitefly-borne vein yellows virus foi relatado sendo transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Ghosh *et al.*, 2019).

No Brasil, existe apenas um trabalho realizado por Oliveira *et al.*, (2020) que detectaram sequências de polerovírus em mandioca via RT-PCR, em plantas com a doença couro de sapo, (CSFD). No entanto, o trabalho não cita qualquer relação direta do vírus com a doença, e nenhum estudo de caracterização biológica desse vírus foi realizado utilizando plantas de mandioca ou plantas modelo. Sequências de cassava polero-like virus obtidas de isolados da Colômbia em trabalhos não publicados se encontram depositadas no GenBank (KP995076) pelo grupo Carvajal-Yepes *et al.* (2014). Este trabalho publicado que cita a presença de polerovírus em mandioca também não aborda as características biológicas do vírus na cultura.

2.5. O GÊNERO *Potexvirus*

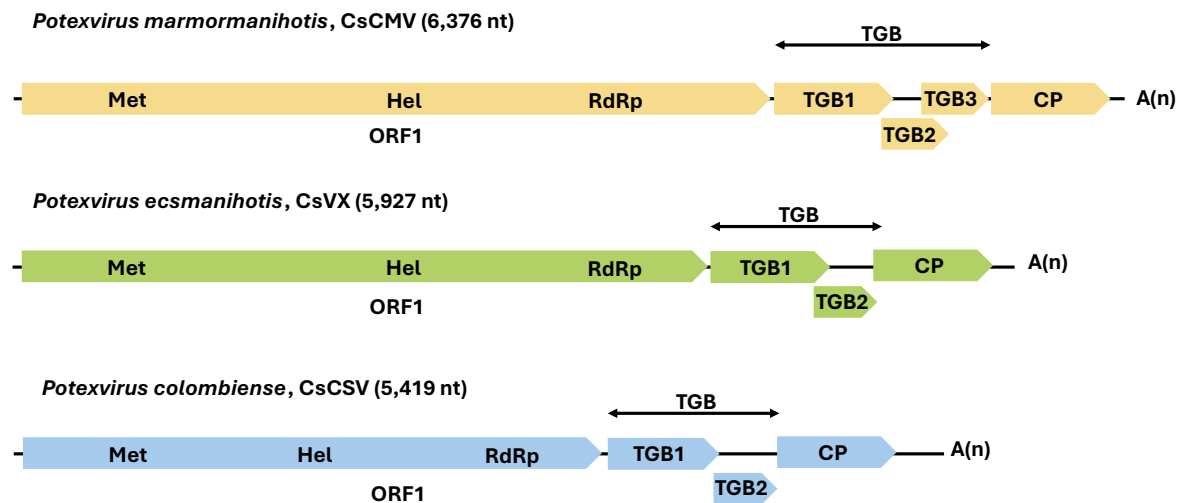
A família *Alphaflexiviridae* inclui membros com vírions de morfologia de filamentosos flexuosos com 470 a 800 nm de comprimento. Os alfaflexivírus possuem genoma de RNA de fita simples e sentido positivo que podem variar de 5,4 a 9 kb. Essa família contém vírus que infectam tanto plantas como fungos (micovírus) que infectam plantas. Dentro dessa família, o gênero *Potexvirus* contém três espécies virais que infectam a mandioca: o cassava common mosaic virus, CsCMV, (vírus do mosaico comum da mandioca, *Potexvirus marmoranivitis*), cassava virus X, CsVX, (*Potexvirus ecsmanivitis*) e o cassava Colombian symptomless virus, CsCSV (*Potexvirus colombiense*) (Albuquerque *et al.*, 2023a).

A partícula do CsCMV tem forma de haste semiflexível de 15 nm × 495 nm de comprimento. Apresenta uma ampla gama de hospedeiros infectando espécies de plantas

pertencentes a famílias das dicotiledóneas (Kitajima *et al.*, 1965). Além disso, o genoma viral é constituído por um ssRNA senso positivo de 5,9 a 7,0 Kb com cinco ORFs, e uma proteína capsidial de peso molecular putativo em cerca de 21 kDa (Nolt, Velasco and Pineda, 1991).

O RNA genômico dos potexvírus possui de quatro a cinco ORFs (Figura 18). A ORF1 codifica a proteína associada à replicação viral (Rep), e a ORF5 codifica a capa proteica (CP). Entre a ORF1 e ORF5 estão os genes envolvidos no movimento célula-a-célula (*triple gene block*, TGB), representados por três ORFs sobrepostas que codificam para proteínas de peso molecular de cerca de 25, 12 e 8 kDa, respectivamente, TGB1, TGB2 e TGB3. A proteína TGB1 desempenha uma atividade supressora de silenciamento de RNA, contém um domínio NTPase-helicase, mas não está envolvida no processo de replicação do RNA. A CP também é envolvida no movimento célula-a-célula. Com exceção da ORF1, todas as demais ORFs de 2 a 5 são expressas através de RNAs subgenômicos (sgRNAs) (Lozano *et al.*, 2017; Kreuze *et al.*, 2020).

Figura 18. Organização genômica do CsCMV (GenBank NC_001658), CsVX (GenBank OP852337) e CsCSV (GenBank KC505252).



As extremidades 5' e 3' não traduzidas (UTR) são representadas por um segmento de reta preta. A ORF1 codifica os domínios Met: metiltransferase; Hel: helicase; RdRp: *RNA-dependent RNA polymerase* da replicase. TGB1, TGB2, TGB3 (*Triple Gene Block*) e CP (capa proteica). A região da cauda poli-A foi representada pela notação A(n). **Fonte:** Adaptado de Calvert *et al.* 1996, Albuquerque *et al.* 2023a, Carvajal-Yepes *et al.* 2014.

No estabelecimento da infecção viral de forma sistêmica, primeiramente os vírus infectam uma célula para posteriormente, se replicarem. Nessa primeira etapa, ocorre o movimento célula-a-célula, onde o vírus transita através dos plasmodesmas para as células vizinhas até alcançar o floema. Em seguida, ocorre o movimento de longa distância, permitindo que o vírus se espalhe de forma sistêmica pela planta (Lucas and Gilbertson, 1994,

Lucas, 1995). No processo de movimento viral o sistema utilizando TGB é um dos mecanismos mais estudados. A proteína TGB1 atua aumentando a permeabilidade dos plasmodesmas, enquanto as proteínas TGB2 e TGB3 mediam o transporte da TGB1 até o plasmodesmas (Morozov and Solovyev, 2020).

O CsVX é um alfaflexivírideo que não possui a proteína TGB3, resultando em uma baixa eficiência (20%) de infecção quando comparado com CsCMV, que contém o complexo TGB completo. Este último é muito mais eficiente (90 a 100%) no processo de infecção durante a transmissão mecânica para plantas de *Nicotiana benthamiana* (Verchot-Lubicz, 2005; Lozano *et al.*, 2017). Estudos realizados por Jimenez, Leiva and Cuellar (2023) mostram que a porcentagem de plantas infectadas sistemicamente por CsVX aumentou de duas a três vezes quando ocorria infecção mista com CsTLV. Os autores sugerem que a expressão da ORF1 do RNA2 do CsTLV, estaria relacionada ao aumento no sucesso de infecção pelo CsVX, indicando que a presença de torradovírus em infecções mistas poderia favorecer outras infecções virais em *N. benthamiana*.

A transmissão do CsCMV, assim como em outros potexvírus, ocorre de maneira mecânica e a disseminação se dá através de manivas de mandioca infectadas. Isolados de mandioca de CsCMV apresentam fraca reação cruzada com antissoro contra outros potexvírus em teste de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Infecções mistas são comuns entre os potexvírus, porém o único capaz de causar doença em infecções simples em mandioca é o CsCMV (Lozano *et al.*, 2017).

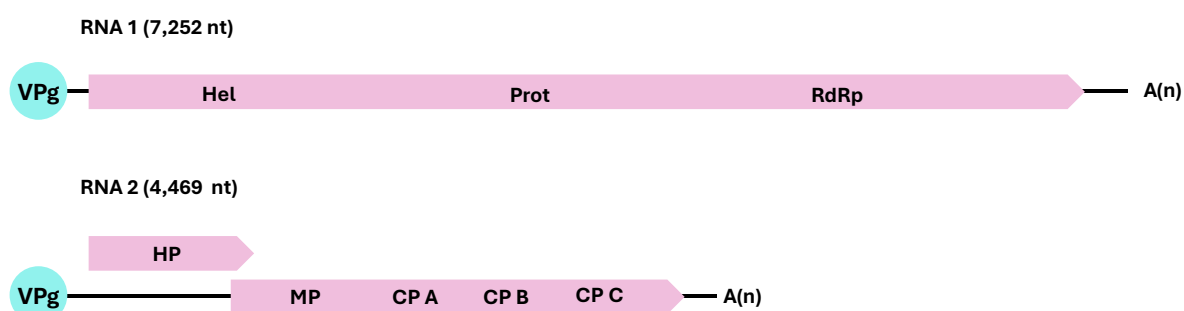
2.6. O GÊNERO *Torradovirus*

Os membros da família *Secoviridae* são vírus não envelopados com genomas de ssRNA de sentido positivo linear podendo ser mono ou bipartido (RNA1 e RNA2), de 9 a 13,7 kb no total (Fuchs *et al.*, 2022). A maioria dos membros conhecidos infecta plantas dicotiledôneas, e são importantes fitopatógenos (por exemplo, grapevine fanleaf virus e rice tungro spherical virus) (Sanfaçon, 2015).

Nessa família, a espécie *Torradovirus manihotis* (cassava torrado-like virus, CsTLV) é classificada dentro do gênero *Torradovirus*. O CsTLV é encontrado frequentemente infectando folhas da mandioca (Albuquerque *et al.*, 2022), sendo identificado pela primeira vez na Colômbia em 2014 (Carvajal-Yepes *et al.*, 2014). O genoma do CsTLV é bipartido composto por uma fita simples de RNA senso positivo (Figura 19). O RNA1 e RNA2 têm tamanhos variando de 6911-7802 nucleotídeos (nt), e 5695-4701 nt,

respectivamente, semelhantes a outros genomas do gênero. O RNA1 expressa uma poliproteína responsável pela replicação viral (RdRp), com domínios de helicase, proteinase, e polimerase, e a VPg. O RNA2 apresenta duas ORFs: a ORF1 codifica a proteína hipotética (HP), já a ORF2 codifica uma poliproteína que contém a proteína de movimento e proteínas da capa proteica (CP-A, CP-B e CP-C) (Vlugt, Van Der *et al.*, 2015). A transmissão dos torradovírus pode ocorrer de forma semi-persistente por espécies de moscas-brancas e pulgões (Lecoq *et al.*, 2016; Rozado-Aguirre *et al.*, 2016).

Figura 19. Organização e expressão do genoma do CsTLV 1 (*Torradorvirus manihotis*) (GenBank RNA1-MF449522 e RNA2-MF449523).

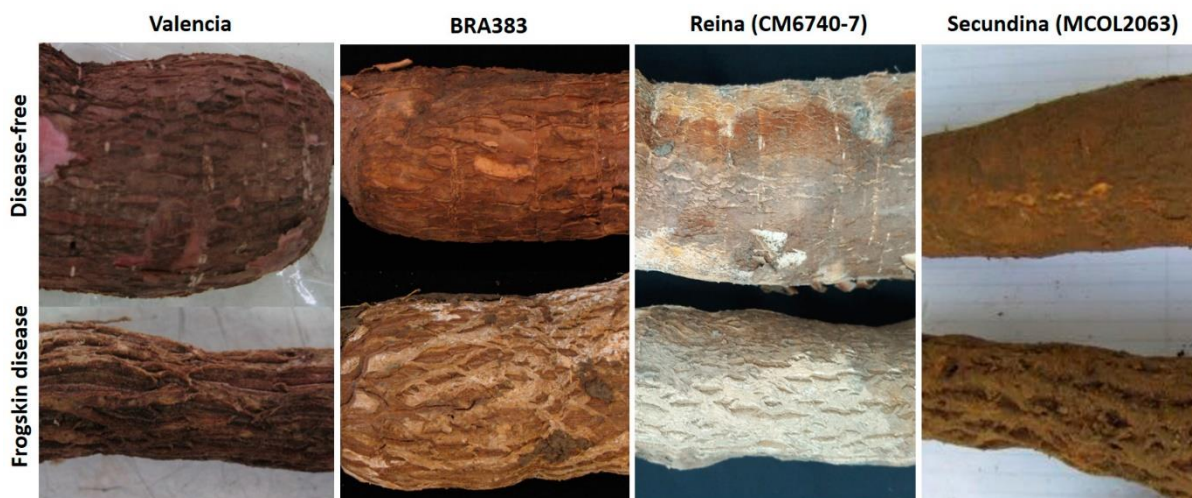


O RNA 1 codifica RdRp expressando os domínios de helicase (Hel), proteinase (Prot) necessárias para a replicação. O RNA 2 codifica uma proteína hipotética (HP), proteína do movimento célula-a-célula (MP) e proteínas do capsídeo (CP-A, CP-B e CP-C). A região da cauda poli(A) foi representada pela notação A(n). A VPg está destacada em azul **Fonte:** Adaptado de Albuquerque *et al.* 2022.

3. A DOENÇA COURO DE SAPO

No início da década de 70, uma nova doença associada a sintomas radiculares da mandioca foi descrita pela primeira vez no sul da Colômbia, causando grandes perdas na cultura (Pineda, Jayasinghe and Lozano, 1983). A doença foi denominada “couro de sapo” (*Cassava Frogskin Disease*, CFSD) devido ao aspecto visual da casca da raiz, que se torna espessa com fissuras longitudinais e constrições (Figura 20). A raiz tuberosa se torna fibrosa e fina, com redução no teor de amido. No entanto, a parte aérea da planta não apresenta sintomas (Calvert, Cuervo and Lozano, 2012).

Figura 20. Sintomas radiculares de CFSD observados em quatro diferentes genótipos de mandioca.



As imagens superiores correspondem a raízes que não apresentam sintomas da doença. As imagens inferiores mostram os sintomas característicos da raiz do CFSD. **Fonte:** Pardo *et al.*, 2022.

Desde o primeiro relato, a doença já foi observada no Brasil, Argentina, Costa Rica, Paraguai, Panamá, Peru e Venezuela. A partir de 1983, começou a se especular que a etiologia da doença fosse viral. Pesquisas conduzidas por Calvert *et al.* (2008) atribuíam a causa da doença aos vírus classificados na família *Reoviridae* (dsRNA), com base na presença viral em plantas infectadas. Os torradovírus e polerovírus já foram detectados em amostras com sintomas de couro de sapo em mandioca (Carvajal-Yepes *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2020), mas não foi comprovada sua relação com a doença. Existem relatos da associação do CFSD à fitoplasmas (grupo III-L) na Colômbia (Alvarez *et al.*, 2009). No Brasil, a doença foi associada a fitoplasmas do subgrupo III-L e ao subgrupo III-A (Oliveira *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014). Até os dias de hoje, embora essa questão ainda não tenha sido completamente elucidada, a associação da doença a um fitoplasma ou a interação vírus-fitoplasma ainda não foi totalmente descartada, visto que, a espécie ou complexo viral que causam a doença permanecem desconhecidos (Lozano *et al.*, 2017).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRANOVSKY, A. A. *et al.* Beet Yellows Closterovirus: Complete Genome Structure and Identification of a Leader Papain-like Thiol Protease. **Virology**, Amsterdã, v. 198, n. 1, p. 311–324, 1994. ISSN 0042-6822. DOI 10.1006/viro.1994.1034.
- ALBUQUERQUE, J. A. A.; SEDIYAMA, T.; SILVA, A. A.; CARNEIRO, J. E. S.; CECON, P. R.; and ALVES, J. M. A. Interferência de plantas daninhas sobre a produtividade da mandioca (*Manihot esculenta*). **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 279–289, 2008. ISSN 0100-8358. DOI 10.1590/S0100-83582008000200004.
- ALBUQUERQUE, G. R.; BOARI, A. J.; OLIVEIRA, E. J.; MARGARIA, P.; WINTER, S.; and BLAWID, R. **Diversidade viral em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) nas regiões Norte e Nordeste do Brasil**. 2022. 122 p. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2022.
- ALBUQUERQUE, G. R. *et al.* First report of cassava virus X infecting cassava plants in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 105, n. 4, p. 1669–1674, 2023a. ISSN 2239-7264. DOI 10.1007/s42161-023-01499-7.
- ALBUQUERQUE, G. R. *et al.* **Cassava torrado-like virus 2 segment RNA1 and RNA2, complete sequence**. 2023b. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ON887638,ON887639>. Accessed: 4 may 2024.
- ALICAI, T. *et al.* Re-emergence of cassava brown streak disease in Uganda. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 1, p. 24–29, 2007. ISSN 0191-2917. DOI 10.1094/PD-91-0024.
- ALVAREZ, E. *et al.* Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. **American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 93, n. 11, p. 1139–1145, 2009. ISSN 0191-2917. DOI 10.1094/PDIS-93-11-1139.
- AO-KONDO, H.; KOZUKA-HATA, H.; OYAM, M. Emergence of the Diversified Short ORFeome by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *In: Computational Biology and Applied Bioinformatics*. London: InTech, 2011. DOI 10.5772/19433.
- AUS DEM SIEPEN, M.; POHL, J. O.; KOO, B. J.; WEGE, C.; and JESKE, H. Poinsettia latent virus is not a cryptic virus, but a natural polerovirus–sobemovirus hybrid. **Virology**, Amsterdã, v. 336, n. 2, p. 240–250, 2005. ISSN 0042-6822. DOI 10.1016/j.virol.2005.03.020.
- BOCK, K. R.; and WOODS, R. D. Etiology of African Cassava Mosaic Disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 9, p. 994, 1983. ISSN 0191-2917. DOI 10.1094/PD-67-994.
- BRADBURY, J. H.; and DENTON, I. C. Simple method to reduce the cyanogen content of gari made from cassava. **Food Chemistry**, Amsterdã, v. 123, n. 3, p. 840–845, 2010. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.05.020.
- BRANDÃO, A. F. **Diálogos das Grandezas do Brasil**. 2. ed. Brasília: Senado federal, 2010. ISBN 978-85-7018-274-6. Available at: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=1736.
- CALVERT, L. A.; CUERVO, M. I.; OSPINA, M. D.; FAUQUET, C. M.; and RAMIREZ, B. C. Characterization of cassava common mosaic virus and a defective RNA species. **Journal**

of **General Virology**, London, v. 77, n. 3, p. 525–530, 1996. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/0022-1317-77-3-525.

CALVERT, L. A.; CUERVO, M.; LOZANO, I.; VILLAREAL, N.; and ARROYAVE, J. Identification of Three Strains of a Virus Associated with Cassava Plants Affected by Frogskin Disease. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 156, n. 11–12, p. 647–653, 2008. ISSN 0931-1785. DOI 10.1111/j.1439-0434.2008.01412.x.

CALVERT, L.; CUERVO, M.; LOZANO, I. Cassava Viral Diseases of South America. In: **Cassava in the third millennium: Modern production, processing, use and marketing systems**. Colombia: CIAT, 2012. p. 309–318. ISBN 978-958-694-112-9.

CALVERT, L. A.; OSPINA, M. D.; and SHEPHERD, R. J. Characterization of cassava vein mosaic virus: a distinct plant pararetrovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 76, n. 5, p. 1271–1278, 1995. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/0022-1317-76-5-1271.

CARVAJAL-YEPES, M.; OLAYA, C.; LOZANO, I.; CUERVO, M.; CASTAÑO, M.; and CUELLAR, W. J. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from colombia. **Virus Research**, Amsterdã, v. 186, p. 76–86, 2014. ISSN 1872-7492. DOI 10.1016/j.virusres.2013.12.011.

CEBALLOS, H.; CRUZ, G. Cassava Taxonomy and Morphology. In: **Cassava in the Third Millennium: Modern production, processing, use, and marketing systems**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2012. p. 15–28.

CHAMPAGNE, J.; MORDENTE, K.; NAGEL, R.; and AGAMI, R. Slippy-Sloppy translation: a tale of programmed and induced-ribosomal frameshifting. **Trends in Genetics**, Amsterdã, v. 38, n. 11, p. 1123–1133, 2022. ISSN 0168-9525. DOI 10.1016/j.tig.2022.05.009.

CHEN, C. C. Effects of rice transitory yellowing virus on yield and yield components. **Plant Protection Bulletin**, Taichung, v. 26, n. 1, p. 11–22, 1984.

COSTA, A. S. Observações sobre o mosaico comum e o mosaico das nervuras da mandioca (*Manihot utilissima* Pohl.). **Jornal de Agronomia**, Piracicaba, SP, v. 3, p. 239–248, 1940.

COSTA, A. S. História da fitovirologia no Brasil. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Brasil, v. 43, n. 1, p. 51–78, 1986. ISSN 0071-1276. DOI 10.1590/S0071-12761986000100005.

COSTA, A. S.; and KITAJIMA, E. W. Studies on virus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil. **Proceedings of Cassava Mosaic Workshop**. Ibadan, Nigéria, p. 18, 1972.

DEY, K. K.; SUGIKAWA, J.; KERR, C.; and MELZER, M. J. Air potato (*Dioscorea bulbifera*) plants displaying virus-like symptoms are co-infected with a novel potyvirus and a novel ampelovirus. **Virus Genes**, Berlim, v. 55, p. 117–121, 2019. ISBN 0123456789. DOI 10.1007/s11262-018-1616-6.

DIETZGEN, R. G. *et al.* Diversity and epidemiology of plant rhabdoviruses. **Virus Research**, Amsterdã, v. 281, p. 197–942, 2020. ISSN 1872-7492. DOI 10.1016/j.virusres.2020.197942.

DOLJA, V. V.; KARASEV, A. V.; and KOONIN, E. V. MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION OF CLOSTEROVIRUSES: Sophisticated Build-up of Large RNA Genomes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, n. 1, p. 261–285, 1994. ISSN 0066-4286. DOI 10.1146/annurev.py.32.090194.001401.

DUNSTAN, S. C.; CHUMA, E. Cassava cultivation in sub-Saharan Africa. In: **Achieving sustainable cultivation of cassava**. 1. ed. Nigeria: Burleigh Dodds Science Publishing, 2017. p. 123–148. ISBN 9781351114264. DOI 10.19103/AS.2016.0014.06.

EL-SHARKAWY, M. A. Physiological characteristics of cassava tolerance to prolonged drought in the tropics: implications for breeding cultivars adapted to seasonally dry and semiarid environments. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Viçosa, MG, v. 19, n. 4, p. 257–286, 2007. ISSN 1677-0420. DOI 10.1590/S1677-04202007000400003.

FANG, J. C.; and LIU, M. J. Translation initiation at AUG and non-AUG triplets in plants. **Plant Science**, Amsterdã, v. 335, p. 111822, 2023. ISSN 0168-9452. DOI 10.1016/j.plantsci.2023.111822.

FAO. **Production quantities of Cassava, fresh by country**. 2024. Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Accessed: 28 may 2024.

FIRTH, A. E.; and BRIERLEY, I. Non-canonical translation in RNA viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 93, n. 7, p. 1385–1409, 2012. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/vir.0.042499-0.

FREITAS-ASTÚA, J. *et al.* ICTV Proposal 2019.031M.A.v1: Split the genus *Nucleorhabdovirus*, creating three new genera (*Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, and *Gammanucleorhabdovirus*), comprising sixteen species, including six new species, in the family *Rhabdoviridae*. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**, 2019.

FUCHS, M. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Closteroviridae*. **Journal of General Virology**, London, v. 101, n. 4, p. 364–365, 2020. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/jgv.0.001397.

FUCHS, M. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Secoviridae*. **Journal of General Virology**, London, v. 103, n. 12, 2022. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/jgv.0.001807.

FUCHS, M. *et al.* Family: *Closteroviridae*. **ICTV**. 2024. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/closteroviridae/closteroviridae>. Accessed: 3 jun. 2024.

FÜTTERER, J. *et al.* Position-dependent ATT initiation during plant pararetrovirus rice tungro bacilliform virus translation. **Journal of Virology**, Washington, D.C, v. 70, n. 5, p. 2999–3010, 1996. ISSN 0022-538X. DOI 10.1128/jvi.70.5.2999-3010.1996.

GAMBLEY, C. F.; STEELE, V.; GEERING, A. D. W.; and THOMAS, J. E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australasian Plant Pathology**, Berlim, v. 37, p. 95–105, 2008. DOI 10.1071/AP07096.

GHANEM-SABANADZOVIC N, A.; SABANADZOVIC, S.; GUGERLI, P.; and ROWHANI, A. Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications. **Virus Research**, Amsterdã, v. 163, n. 1, p. 120–128, 2012. ISSN 0168-1702. DOI 10.1016/j.virusres.2011.09.001.

GHOSH, S. *et al.*; SIMON, Anne E. (ed.). Transmission of a New Polerovirus Infecting Pepper by the Whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of Virology**, Washington, D.C., v. 93, n. 15, 2019. ISSN 0022-538X. DOI 10.1128/JVI.00488-19.

GILDOW, F. E. Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p. 270-270, 1993.

GRAY, S.; and GILDOW, F. E. Luteovirus-aphid interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, n. 1, p. 539–566, 2003. ISSN 0066-4286. DOI 10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815.

HOMMA, A. K. O. *et al.* **Cultura da Mandioca: Aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2016. 257 p. v. 1. ISBN 9788570356215.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. 2022. Available at: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html>. Accessed: 17 jun. 2024.

IBGE. **Produção de mandioca**. 2024. Available at: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mandioca/br>. Accessed: 28 may 2024.

ICTV. **Subfamily: *Betarhabdovirinae* Genus: *Alphanucleorhabdovirus***. 2024a. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/alphanucleorhabdovirus>. Accessed: 2 jun. 2024.

ICTV. **Subfamily: *Betarhabdovirinae* Genus: *Betanucleorhabdovirus***. 2024b. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/betanucleorhabdovirus>. Accessed: 3 jun. 2024.

ICTV. **Subfamily: *Betarhabdovirinae* Genus: *Gammanucleorhabdovirus***. 2024c. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/gammanucleorhabdovirus>. Accessed: 3 jun. 2024.

ICTV. **Family: *Solemoviridae***. 2024d. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/solemoviridae/solemoviridae>. Accessed: 17 jun. 2024.

JACKSON, A. O.; DIETZGEN, R. G.; GOODIN, M. M.; BRAGG, J. N.; and DENG, M. Biology of Plant Rhabdoviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 623–660, 2005. ISSN 0066-4286. DOI 10.1146/annurev.phyto.43.011205.141136.

JIMENEZ, J.; LEIVA, A. M.; and CUELLAR, W. J. Cassava torrado-like virus encodes a gene that facilitates the mechanical transmission to *Nicotiana benthamiana* of Cassava virus X. **Scientia Agropecuaria**, Trujillo, v. 14, n. 2, p. 213–221, 2023. ISSN 2306-6741. DOI 10.17268/sci.agropecu.2023.019.

JIMÉNEZ, J.; ZANINI, A.; FERNANDEZ, E.; MARTINEZ GARAY, C.; BOLAÑOS, C.; CUELLAR, W. **Screening for gemini- and potyviridae-related viruses infecting cassava in South America**. 2019. DOI 10.7910/DVN/TNSMM7.

JONES, W. O. **Manioc in Africa**. 1. ed. California: Stanford University Press, 1959. 315 p. ISBN 0804700028.

KANJU, E.; LEGG, J. P.; PATIL, B. L.; and FAUQUET, C. M. Cassava brown streak disease: a threat to food security in Africa. **Journal of General Virology**, London, v. 96, n. 5, p. 956–968, 2015. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/vir.0.000014.

KITAJIMA, E. W.; WETTER, C.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, D. M.; and COSTA, A. S. Morfologia do vírus do mosaico comum da mandioca. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 24, n. unico, p. 247–260, 1965. ISSN 0006-8705. DOI 10.1590/S0006-87051965000100021.

KITAJIMA, E. W.; and COSTA, A. S. Rhabdovirus-like particles in tissues of five different plant species. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 55–62, 1979.

KOCH, K. G.; JONES, T. K. L.; BADILLO-VARGAS, I. E. Arthropod vectors of plant viruses. In: **Applied Plant Virology**. London: Elsevier, 2020. p. 349–379. DOI 10.1016/B978-0-12-818654-1.00026-8.

KOCHKO, A.; VERDAGUER, B.; TAYLOR, N.; CARCAMO, R.; BEACHY, R. N.; and FAUQUET, C. Cassava vein mosaic virus (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses? **Archives of virology**, Berlim, v. 143, n. 5, p. 945–62, 1998. ISSN 0304-8608. DOI 10.1007/s007050050344.

KREUZE, J. F. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Alphaflexiviridae*. **Journal of General Virology**, London, v. 101, n. 7, p. 699–700, 2020. ISSN 1465-2099. DOI 10.1099/JGV.0.001436.

KUHN, J. H. *et al.* 2020 taxonomic update for phylum *Negarnaviricota* (*Riboviria*: *Orthornavirae*), including the large orders *Bunyavirales* and *Mononegavirales*. **Archives of Virology**, Berlim, v. 165, n. 12, p. 3023–3072, 2020. ISSN 0304-8608. DOI 10.1007/s00705-020-04731-2.

KUHN, J. H. *et al.* Annual (2023) taxonomic update of RNA-directed RNA polymerase-encoding negative-sense RNA viruses (realm *Riboviria*: kingdom *Orthornavirae*: phylum *Negarnaviricota*). **Journal of General Virology**, London, v. 104, n. 8, 2023. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/jgv.0.001864.

KWIBUKA, Y. *et al.* Novel ampeloviruses infecting cassava in central africa and the south-west indian ocean islands. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 6, p. 1030, 2021. ISSN 1999-4915. DOI 10.3390/V13061030/S1.

LECOQ, H. *et al.* Characterization and occurrence of squash chlorotic leaf spot virus, a tentative new torradovirus infecting cucurbits in Sudan. **Archives of virology**, Berlim, v. 161, n. 6, p. 1651–1655, 2016. ISSN 1432-8798. DOI 10.1007/S00705-016-2797-8.

LEGG, J. P. *et al.* Cassava virus diseases: Biology, epidemiology, and management. In: **Advances in Virus Research**. Berlim: Academic Press Inc., 2015. v. 91, n. 1, p. 85–142. ISSN 1557-8399. DOI 10.1016/bs.aivir.2014.10.001.

LEGG, J. P.; and FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant Molecular Biology**, Berlin, v. 56, n. 4, p. 585–599, 2004. ISSN 0167-4412. DOI 10.1007/S11103-004-1651-7/METRICS.

LEGG, J. P.; KUMAR, P. L.; KANJU, E. E. Cassava Brown Streak. *In: Virus Diseases of Tropical and Subtropical Crops*. Wallingford: CABI Publishing, 2015. p. 42–55.

LÉOTARD, G. *et al.* Phylogeography and the origin of cassava: New insights from the northern rim of the Amazonian basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdã, v. 53, n. 1, p. 329–334, 2009. ISSN 1055-7903. DOI 10.1016/J.YMPEV.2009.05.003.

LING, K. S.; ZHU, H. Y.; and GONSALVES, D. Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus *Ampelovirus*. **Journal of General Virology**, London, v. 85, n. 7, p. 2099–2102, 2004. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/vir.0.80007-0.

LOZANO, I. *et al.* Resolution of cassava-infecting alphaflexiviruses: Molecular and biological characterization of a novel group of potexviruses lacking the TGB3 gene. **Virus Research**, Amsterdã, v. 241, p. 53–61, 2017. ISSN 0168-1702. DOI 10.1016/J.VIRUSRES.2017.03.019.

MALUF, J. R. T.; MATZENAUER, R.; MALUF, D. E. Zoneamento Agroclimático da Mandioca no Estado do Rio Grande do Sul—Uma alternativa para a produção de etanol. Porto Alegre: FEPAGRO. 60p. **Boletim Técnico**, v. 22, 2011.

MAREE, H. J. *et al.* Grapevine leafroll-associated virus 3. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, 2013. ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2013.00082.

MARTINS, C. R. F. *et al.* Sonchus Yellow Net Rhabdovirus Nuclear Viroplasms Contain Polymerase-Associated Proteins. **Journal of Virology**, Washington, D.C, v. 72, n. 7, p. 5669–5679, 1998. ISSN 0022-538X. DOI 10.1128/JVI.72.7.5669-5679.1998.

MATTOS, P. L. P. DE; FARIAS, A. R. N.; and FERREIRA FILHO, J. R. (ed.). **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 176 p. ISBN 85-7383-368-8.

MAYO, M. A.; ROBINSON, D. J.; JOLLY, C. A.; and HYMAN, L. Nucleotide Sequence of Potato Leafroll Luteovirus RNA. **Journal of General Virology**, London, v. 70, n. 5, p. 1037–1051, 1989. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/0022-1317-70-5-1037.

MELZER, M. J.; KARASEV, A. V.; SETHER, D. M.; and HU, J. S. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 1, p. 1–7, 2001. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/0022-1317-82-1-1.

MOHAMMED, I. U.; ABARSHI, M. M.; MULI, B.; HILLOCKS, R. J.; and MARUTHI, M. N. The symptom and genetic diversity of cassava brown streak viruses infecting cassava in east africa. **Advances in Virology**, Berlin, v. 2012, 2012. ISSN 1687-8639. DOI 10.1155/2012/795697.

MOROZOV, Y. S.; and SOLOVYEV, A. G. Small hydrophobic viral proteins involved in intercellular movement of diverse plant virus genomes. **AIMS Microbiology**, Springfield, v.

6, n. 3, p. 305–329, 2020. ISSN 2471-1888. DOI 10.3934/microbiol.2020019.

NICHOLS, R. F. W. The Brown Streak Disease of Cassava. **The East African Agricultural Journal**, Nairobi, v. 15, n. 3, p. 154–160, 1950. ISSN 0367-0074. DOI 10.1080/03670074.1950.11664727.

NOLT, B. L.; VELASCO, A. C.; and PINEDA, B. Improved purification procedure and some serological and physica properties of cassava common mosaic virus from South America. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 118, n. 1, p. 105–113, 1991. ISSN 1744-7348. DOI 10.1111/J.1744-7348.1991.TB06089.X.

OLIVEIRA, S. A. S. *et al.* First Report of a 16SrIII-L Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 1, p. 153–153, jan. 2014. ISSN 0191-2917. DOI 10.1094/PDIS-05-13-0499-PDN.

OLIVEIRA, S. A. S.; FERREIRA, C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; SANTOS, T. A.; PEREIRA, J. S.; and OLIVEIRA, E. J. DE. First report of cassava torrado-like virus, cassava polero-like virus and cassava new alphaflexivirus associated with cassava frogskin disease in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 102, n. 1, p. 247, 2020. ISSN 2239-7264. DOI 10.1007/S42161-019-00384-6/METRICS.

OTIM-NAPE, G. W. *et al.* **Cassava mosaic virus disease in Uganda: the current pandemic and approaches to control**. Chatham: Natural Resources Institute (NRI), 1997. ISBN 0859544.

OTSUBO, A. A.; LORENZI, J. O. Cultivo da Mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. *In: Sistemas de Produção*. 3. ed. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. ISBN 1678-8796.

PARDO, J. M.; ALVAREZ, E.; BECERRA LOPEZ-LAVALLE, L. A.; OLAYA, C.; LEIVA, A. M.; and CUELLAR, W. J. Cassava Frogskin Disease: Current Knowledge on a Re-Emerging Disease in the Americas. **Plants**, Basel, v. 11, n. 14, p. 1841, 2022. ISSN 2223-7747. DOI 10.3390/PLANTS11141841/S1.

PETER, K. A.; GILDOW, F.; PALUKAITIS, P.; and GRAY, S. M. The C Terminus of the Polerovirus P5 Readthrough Domain Limits Virus Infection to the Phloem. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 11, p. 5419–5429, 2009. ISSN 0022-538X. DOI 10.1128/JVI.02312-08.

PINEDA, B. L.; JAYASINGHE, W. U.; and LOZANO, J. C. La enfermedad cuero de sapo en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). **ASIAVA**, Colombia, v. 4, p. 10–12, 1983.

PIPERNO, D. R. The Origins of Plant Cultivation and Domestication in the New World Tropics. **Current Anthropology**, Chicago, v. 52, n. S4, p. S453–S470, 2011. ISSN 0011-3204. DOI 10.1086/659998.

REDDY, P. P. Cassava, *Manihot esculenta*. *In: Plant Protection in Tropical Root and Tuber Crops*. India: Springer, 2015. p. 17–81. ISBN 9788132223894. DOI 10.1007/978-81-322-2389-4.

REZAIAN, M. A.; and FAZELI, C. F. Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of Grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of

three subgenomic RNAs. **Journal of General Virology**, London, v. 81, n. 3, p. 605–615, 2000. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/0022-1317-81-3-605.

ROTT, M. E.; and JELKMANN, W. Detection and Partial Characterization of a Second Closterovirus Associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 3, p. 261–267, 2001. ISSN 0031-949X. DOI 10.1094/PHYTO.2001.91.3.261.

ROZADO-AGUIRRE, Z.; ADAMS, I.; COLLINS, L.; FOX, A.; DICKINSON, M.; and BOONHAM, N. Detection and transmission of Carrot torrado virus, a novel putative member of the *Torradovirus* genus. **Journal of virological methods**, Amsterdã, v. 235, p. 119–124, 2016. ISSN 1879-0984. DOI 10.1016/J.JVIROMET.2016.05.018.

RWAHNIH, M. AL; UYEMOTO, J. K.; FALK, B. W.; and ROWHANI, A. Molecular characterization and detection of plum bark necrosis stem pitting-associated virus. **Archives of Virology**, Berlim, v. 152, n. 12, p. 2197–2206, 2007. ISSN 0304-8608. DOI 10.1007/s00705-007-1064-4.

SANFAÇON, H. *Secoviridae*: A Family of Plant Picorna-Like Viruses with Monopartite or Bipartite Genomes. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester: Wiley, 2015. p. 1–14. DOI 10.1002/9780470015902.a0000764.pub3.

SANTIAGO, A. D.; GUZZO, E. C.; SILVEIRA, H. F.; and FALCÃO, R. F. **Práticas para Produção de Mandioca por Agricultores Familiares na Região do Sealba**. 2. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2023. 33 p. ISBN 978-65-89957-94-2.

SILBERSCHMIDT, K. O mosaico da Mandioca. **O Biológico**, São Paulo, v. 4, n. 6, p. 177–181, 1938.

SILVA, V. P. R.; PEREIRA, E. R. R.; AZEVEDO, P. V.; SOUSA, F. A. S.; and SOUSA, I. F. Análise da pluviometria e dias chuvosos na região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 2, p. 131–138, 2011. ISSN 1415-4366. DOI 10.1590/S1415-43662011000200004.

SILVA, M. R.; PICOLI, M. H. S.; and ROMANO, M. R. Sintomas e alterações provocadas na raiz de BRS 429 pelo “couro-de-sapo.” In: 2021. **15ª Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura**. 2021. Available at: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1150384/sintomas-e-alteracoes-provocadas-na-raiz-de-brs-429-pelo-couro-de-sapo>.

SIVAKUMARAN, K.; and HACKER, David L. The 105-kDa Polyprotein of Southern Bean Mosaic Virus Is Translated by Scanning Ribosomes. **Virology**, Amsterdã, v. 246, n. 1, p. 34–44, 1998. ISSN 0042-6822. DOI 10.1006/viro.1998.9183.

SÔMERA, M.; FARGETTE, D.; HÉBRARD, E.; and SARMIENTO, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Solemoviridae* 2021. **Journal of General Virology**, London, v. 102, n. 12, 2021. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/jgv.0.001707.

SONG, Y.; HANNER, R. H.; and MENG, B. Probing into the Effects of Grapevine Leafroll-Associated Viruses on the Physiology, Fruit Quality and Gene Expression of Grapes. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 4, p. 593, 2021. ISSN 1999-4915. DOI 10.3390/v13040593.

SORO, M. *et al.* Epidemiological assessment of cassava mosaic disease in Burkina Faso. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 70, n. 9, p. 2207–2216, 2021. ISSN 0032-0862. DOI 10.1111/ppa.13459.

SOUSA, G. S. **Tratado Descritivo do Brasil em 1587**. 9. ed. Recife: Fundação Joaquim Nabuco Editora Massangana, 2000. 355 p. ISBN 85-7019-337-8. Available at: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=38095.

SOUZA, A. N.; SILVA, F. N.; BEDENDO, I. P.; and CARVALHO, C. M. A Phytoplasma Belonging to a 16SrIII-A Subgroup and dsRNA Virus Associated with Cassava Frogskin Disease in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 6, p. 771–779, 2014. ISSN 0191-2917. DOI 10.1094/PDIS-04-13-0440-RE.

STOREY, H. H. Virus Diseases of East African Plants. **The East African Agricultural Journal**, Nairobi, v. 1, n. 6, p. 471–475, 1936. ISSN 0367-0074. DOI 10.1080/03670074.1936.11663710.

TAMM, T.; SUURVÄLI, J.; LUCCHESI, J.; OLSPERT, A.; and TRUVE, E. Stem-loop structure of Cocksfoot mottle virus RNA is indispensable for programmed –1 ribosomal frameshifting. **Virus Research**, Amsterdã, v. 146, n. 1–2, p. 73–80, 2009. ISSN 0168-1702. DOI 10.1016/j.virusres.2009.09.002.

TEYCHENEY, P. Y. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Caulimoviridae*. **Journal of General Virology**, London, v. 101, n. 10, p. 1025, 2020. ISSN 1465-2099. DOI 10.1099/JGV.0.001497.

THRESH, J. M.; OTIM-NAPE, G. W.; FARGETTE, D. The control of African cassava mosaic virus disease : phytosanitation and/or resistance ? *In: Plant virus disease control*. [S. l.]: American Phytopathological Society, 1998. p. 670–677.

TSAI, C. W.; ROWHANI, A.; GOLINO, D. A.; DAANE, K. M.; and ALMEIDA, R. P. P. Mealybug Transmission of Grapevine Leafroll Viruses: An Analysis of Virus–Vector Specificity. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 8, p. 830–834, 2010. ISSN 0031-949X. DOI 10.1094/PHYTO-100-8-0830.

VENTURINI, M. T. *et al.* Crop losses in Brazilian cassava varieties induced by the Cassava common mosaic virus. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 73, n. 6, p. 520–524, 2016. ISSN 1678-992X. DOI 10.1590/0103-9016-2015-0374.

VERCHOT-LUBICZ, J. A New Cell-to-Cell Transport Model for Potexviruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 4, p. 283–290, 2005. ISSN 0894-0282. DOI 10.1094/MPMI-18-0283.

VLUGT, R. A. A. VAN DER *et al.* *Torrado*viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, p. 485–512, 2015. ISSN 1545-2107. DOI 10.1146/ANNUREV-PHYTO-080614-120021.

WAGNER, J. D.; and JACKSON, A. O. Characterization of the components and activity of *Sonchus* yellow net rhabdovirus polymerase. **Journal of Virology**, Washington, D.C., v. 71, n. 3, p. 2371–2382, 1997. ISSN 0022-538X. DOI 10.1128/jvi.71.3.2371-2382.1997.

WALKER, P. J. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Rhabdoviridae*. **Journal of General Virology**, London, v. 99, n. 4, p. 447–448, 2018. ISSN 1465-2099. DOI 10.1099/JGV.0.001020/CITE/REFWORKS.

WALKER, P. J. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Rhabdoviridae* 2022. **Journal of General Virology**, London, v. 103, n. 6, 2022. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/jgv.0.001689.

WARBURG, O. *Manihot utilissima* Pohl. - Maniok. In: **Die kulturpflanzen usambaras**. Berlin: [s. n.], 1894. p. 23–25. Available at: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=YboUAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Warburg,+O.+\(1894\)+Die+kulturpflanzen+usambaras.+Mirt.+Deutsch+Schutzgeb+7,+131.+&ots=oThCLriZoS&sig=ygCECiEv tPShkFXsb95_hEei-7E#v=snippet&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=YboUAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Warburg,+O.+(1894)+Die+kulturpflanzen+usambaras.+Mirt.+Deutsch+Schutzgeb+7,+131.+&ots=oThCLriZoS&sig=ygCECiEv tPShkFXsb95_hEei-7E#v=snippet&q&f=false).

WCVP. **World Checklist of Vascular Plants *Manihot esculenta* Crantz**. [S. l.]: Kew: Royal Botanic Gardens, 2024. Available at: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:351790-1>. Accessed: 25 may 2024.

WINTER, S.; MBEWE, W.; ALBUQUERQUE, G. R.; BLAWID, R.; and MARGARIA, P. **Cassava ampelovirus 1 isolate Brazil_20, partial genome**. [S. l.: s. n.], 2021. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW929100.1>. Accessed: 4 may 2024.

ZHEN, F. F. (ed.). **The World of Rhabdoviruses**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. 220 p. (Current Topics in Microbiology and Immunology). v. 292. ISBN 3-540-24011-X. DOI 10.1007/3-540-27485-5.

CAPÍTULO II

**Viral diversity in Cassava roots
showing Cassava Frogskin symptoms**

CAPÍTULO 2: VIRAL DIVERSITY IN CASSAVA ROOTS SHOWING CASSAVA FROGSKIN SYMPTOMS

D. G. P. BEZERRA¹, S. A. S. OLIVEIRA^{2,3}, E. J. OLIVEIRA², P. MARGARIA³, S. WINTER³, A. C. G. NETO¹, *R. BLAWID¹

¹ Department of Agronomy, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

² Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Brazil

³ Plant Virus Department, Leibniz Institute DSMZ, Braunschweig, Germany

*Corresponding author: E-mail: rosana.blawid@ufrpe.br; phone: +51-81-3020-6213

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), native to Brazil, is a major crop due to its starch-rich tuberous roots. In South America, cassava frog skin disease (CFSD) is an emerging disease that poses a significant risk to the crop, causing thickening and cracking of the roots, which can lead to yield losses of up to 100%. Although various studies have associated CFSD with multiple viral species and phytoplasmas, its precise etiology remains undefined. This study aims to elucidate the viral diversity in CFSD-affected cassava roots using RT-PCR, Sanger Sequencing and High-Throughput Sequencing (HTS). Five known viral sequences were identified: cassava torrado-like virus 1 (CsTLV 1) and 2 (CsTLV 2), cassava ampelovirus 1 (CsAV 1), cassava vein mosaic virus (CsVMV), and cassava common mosaic virus (CsCMV). Additionally, two novel viral sequences were assembled, an ampelovirus and an alphanucleorhabdovirus. RT-PCR results indicated the presence of CsTLV 1, the novel ampelovirus, and the novel rhabdovirus in asymptomatic plants. Notably, CsAV 1 was detected exclusively in symptomatic samples and was absent from the pools of asymptomatic roots, highlighting the potential role of ampeloviruses in the manifestation of CFSD symptoms. The positive control, BGM-1124 (PL 38), tested positive for all five viruses, highlighting the significance of mixed infections in symptomatic roots. These findings shed light on the understanding of viral diversity and virus-host interactions in cassava.

Keywords: High-Throughput Sequencing (HTS), ampeloviruses, torradoviruses, rhabdoviruses, cassava frog skin disease (CFSD).

1. Introduction

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a perennial plant indigenous to Brazil, known for its resilience and adaptability to adverse conditions, and is cultivated extensively in tropical and subtropical regions worldwide (Reddy, 2015). This crop is a crucial source of carbohydrates for human and animal consumption, particularly in developing countries across Africa, Asia, and Latin America. In addition to its importance for food security, cassava possesses considerable commercial value, being used in the production of flour, starch, and

various industrial products (Li *et al.*, 2017). However, cassava production losses have been intensified by diseases caused by different pathogens that can significantly reduce both yield and root quality. Among them are the following: Cassava Bacterial Blight (CBB), Cassava Mosaic Disease (CMD), Cassava Root Rot (CRR), Cassava Brown Streak Disease (CBSD) and Cassava Frogskin Disease (CFSD) (Alvarez, Alberto and Mejía, 2012; Legg *et al.*, 2015).

In South America, CFSD is an emerging disease that poses a significant threat to cassava cultivation. It causes thickening and cracking of the tuberous roots, severely impacting the development and starch production of the cassava, potentially leading to yield losses of up to 100%. (Pineda, Jayasinghe and Lozano, 1983; Reddy, 2015). The disease causes longitudinal cracks and constrictions on the roots develop fibrous tissue, characterized by deep grooves and a reduced diameter. The outer skin thickens, becoming opaque and brittle, while the aerial parts of the plant remain asymptomatic (Alvarez *et al.*, 2009, Souza *et al.*, 2014). This lack of aboveground symptoms complicates early identification and the implementation of control strategies (Pardo *et al.*, 2022). The first documented cases of CFSD root symptoms were in Colombian cassava fields in 1971 (Pineda, Jayasinghe and Lozano, 1983). Subsequent studies across South America have sought to link viral species and phytoplasma to CFSD symptoms (Alvarez *et al.*, 2009; Cuervo, 1990; Nolt, Pineda L. and Velasco, 1992; Oliveira, *et al.*, 2020; Pineda *et al.*, 1980; Pineda, Jayasinghe and Lozano, 1983).

Over the years, different viruses have been associated with CFSD. Among them, members of the families *Alphaflexiviridae*, *Closteroviridae*, *Reoviridae*, *Secoviridae*, and *Solemoviridae* have already been detected in plants affected by the disease in Latin America, but the role of these viruses in the disease remains unknown (Alvarez *et al.*, 2009; Angel, Nolt and Pineda, 1987; Calvert *et al.*, 2008; Calvert, Cuervo and Lozano, 2012; Carvajal-Yepes *et al.*, 2014; Kitajima and Costa, 1979; Lennon, Aiton and Harrison, 1986; Pineda *et al.*, 1982). Because the specific viral agents directly involved in CFSD remain poorly understood, the development of effective control methods, such as the use of resistant varieties, is limited.

To date, new virus species continue to be discovered in cassava, often without a clear association with visual symptoms in the host plant. For example, in 2021, Kwibuka *et al.* identified two new species of ampeloviruses, tentatively named *Manihot esculenta*-associated virus 1 and 2 (MEaV-1 and MEaV-2). MEaV-1 was found widely across all study countries, whereas MEaV-2 was limited to Madagascar and Mayotte. The inspection of vegetative propagation material in cassava cultivation continues to be crucial for maintaining

the genetic uniformity of a variety from one season to the next (Legg *et al.*, 2015), although it also perpetuates the persistence of pathogens across growing seasons. This persistence plays a critical role in the epidemiology of plant viruses, as accumulated viral loads can worsen disease severity over successive seasons.

Given the significant impact of diseases on cassava, along with associated economic and productivity losses, this study aims to determine viral diversity in cassava roots showing symptoms of CFSD, as well as from field surveys in the Northeast region of Brazil, through RT-PCR and High-Throughput Sequencing (HTS). Thereby contributing to the enrichment of databases used in studies of viral dissemination, identification of emerging viral strains.

2. Materials and methods

2.1 Collected material

In total, fifty cassava genotypes from the cassava breeding program of Embrapa Mandioca e Fruticultura were evaluated in an open field, comprising 28 clones of cuttings from the cassava germplasm bank (BGM) and 22 cuttings derived from seed-propagated material (crossing population: BR-21GS-C3) (supplementary table 1). Plants were maintained at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) in an open field for a period of 6 to 8 months to observe symptoms on tuberous roots. Simultaneously, plants were maintained in greenhouse condition at the UFRPE.

Lyophilized root material with CFSD symptoms was provided by Embrapa and was also included in the study at a later stage, comprising 19 BGMs that were divided into three designated pools for RT-PCR analysis: Pool AE1 (BGM 0074, BGM 0179, BGM 0266, BGM 0544, BGM 0547 and BGM 0560), Pool AE2 (BGM 0611, BGM 0671, BGM 1193, BGM 1294, BGM 1468 and BGM 2102) and Pool AE3 (BGM 2352, BR 11-34-64, BRS Caipira, BRS Poti Branca, BRS Tapioqueira, BGM 0065, BGM 1300).

Additionally, asymptomatic samples were collected during a visit to a cassava-producing farm in Pitimbu, Paraíba (PB) in April 2023, and root samples were obtained from from supply centers (CEASA) market in Recife, Pernambuco (PE) in February 2024, originating from farms in the production region of Rio Grande do Norte (RN). The asymptomatic samples from both regions, identified as the Rainha da Praia/Doce Mel variety, were grouped into two pools of ten samples each—one pool from PB and the other from RN—serving as negative controls for disease symptomatology.

2.2 High-Throughput Sequencing (HTS)

Exsiccates of leaves from 22 cassava clones were prepared for sequencing. For this purpose, leaves from the apical and basal regions of the plants or symptomatic leaves were collected. Subsequently, the leaves were placed between sheets of filter paper and pressed for two weeks for dehydration. The exsiccates were sent to the DSMZ Institute in Germany for high-throughput sequencing of total RNA. The 22 clones were organized into five pools and sequenced using the Illumina NextSeq2000 platform with paired-end reads of 2x150 nt (supplementary table 2 and Figure 1). The library was constructed using Illumina FlexM and generated 38-60 million reads per sample.

The HTS of 22 clones generated the following five datasets: 7C, 7D, 7E, 7F, and 7G. The sequences were organized into pools of 4 to 5 clones each. Pools 7C, 7D, 7E, and 7F consisted exclusively of clones derived from seeds. In contrast, the 7G pool comprised 5 clones, including one clone derived from seed and the remaining clones being BGM. Only HTS pools 7E and 7G contained clones whose leaves exhibited transient mosaic symptoms at some stage of their development in the greenhouse. The 7C pool included plants displaying symptoms of excessive sprouting, which did not appear to be associated with viral infection. The clones in pools 7D and 7F did not exhibit any foliar symptoms in the greenhouse.

2.3 Bioinformatics workflow for HTS data analysis

The workflow followed the PhytoPipe protocol described by Hu *et al.* (2023a) with some adaptations. Briefly, first, the quality of reads was checked using FastQC v. 0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The library composition generated by sequencing was assessed using FastQ Screen v. 0.15.2. (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq_screen/). The Kaiju program (Menzel, Ng and Krogh, 2016) was employed to preliminarily classify viral reads. In the data pre-processing stage, BBtools v. 39.01 (Bushnell, 2018) was used to remove ribosomal RNA (rRNA) against the SILVA eukaryote ribosomal 18S and 28S RNA database as reference (Yilmaz *et al.*, 2014) and duplicate sequences. Trimming was performed using Trimmomatic v. 0.36 (Bolger, Lohse and Usadel, 2014) with parameters: ILLUMINACLIP: NEXTERAPE-PE.FA:2:30:10, LEADING:20, TRAILING:20, SLIDINGWINDOW:4:20, CROP:150, HEADCROP:15, and MINLEN: 36. After trimming, the reads were assembled into contigs using MegaHit v. 1.2.9 (Li *et al.*, 2015) with the default k-mer values (21, 29, 39, 59, 79, 99, 119, and 141). For BlastX analysis of the contigs, Diamond v. 2.0.7 (Buchfink, Reuter and

Drost, 2021) was used with a RefSeq database containing 683,337 viral amino acid sequences downloaded in May 2023 from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The taxonomic analysis resulting from the Diamond alignment and extraction of contigs from viral genera and families reported in cassava was conducted using Meganizer, part of the MEGAN 6 package (Huson *et al.*, 2016). To obtain complete genomic sequences, viral contigs were extended by consecutive mapping against the reads using Geneious Prime v. 11.0.5 (<https://www.geneious.com>).

2.4 Phylogenetic of newly discovered viruses and sequence analyses

Nucleotide and amino acid sequences were used in multiple sequence alignments with MAFFT v.7 (Katoh and Standley, 2013). The statistical selection of best-fit models of nucleotide and amino acid substitutions was assessed with MEGA 11 (Tamura, Stecher and Kumar, 2021) based on the AIC and BIC criteria. Phylogenetic trees were constructed using PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), visualized and edited with iTOL v.4 online website (Letunic and Bork, 2019). The Sequence Demarcation Tool (SDT) v.1.2 (Muhire, Varsani and Martin, 2014) was used to calculate identity scores by amino acid or nucleotide alignment with MAFFT v.7. A functional motif search was conducted against the Pfam database using the InterPro website (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). For known genomic sequences, motifs were manually identified based on descriptions in the literature using Geneious Prime v. 11.0.5.

2.5 Total RNA extraction from tuberous roots

Total RNA was extracted from roots following the protocol described by Ferreira *et al.* (2019), with an adaptation in the sample maceration step where a hammer was used instead of a bench drill. The extraction buffer used was CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), consisting of 2% CTAB, 1% PVP, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM sodium-EDTA (pH 8.0), and 1.4 M NaCl, for a final concentration of 2% (v/v). The extraction procedure was carried out as follows: macerate 300 mg of root tissue in the phloem region in a plastic bag and add 2 mL of CTAB buffer plus 0.2% β -mercaptoethanol; incubate the samples at room temperature for 15 minutes; transfer 800 μ L of the sample to an 2 mL microtube and add 800 μ L of isoamyl chloroform (24:1); centrifuge at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C; recover 600 μ L of the supernatant and add 360 μ L of isopropanol; precipitate the RNA at -20 °C for 20 min. The RNA pellet was obtained by centrifugation at 13,000 rpm, 4 °C for 10 min. The RNA precipitate was washed with 70% ethanol, dissolved in 50 μ L of ultrapure

water, and stored at -20 °C. Confirmation of total RNA extraction was performed by electrophoresis using 0.8% agarose gel stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA, Invitrogen™) and visualized under blue light.

2.6 Detection by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

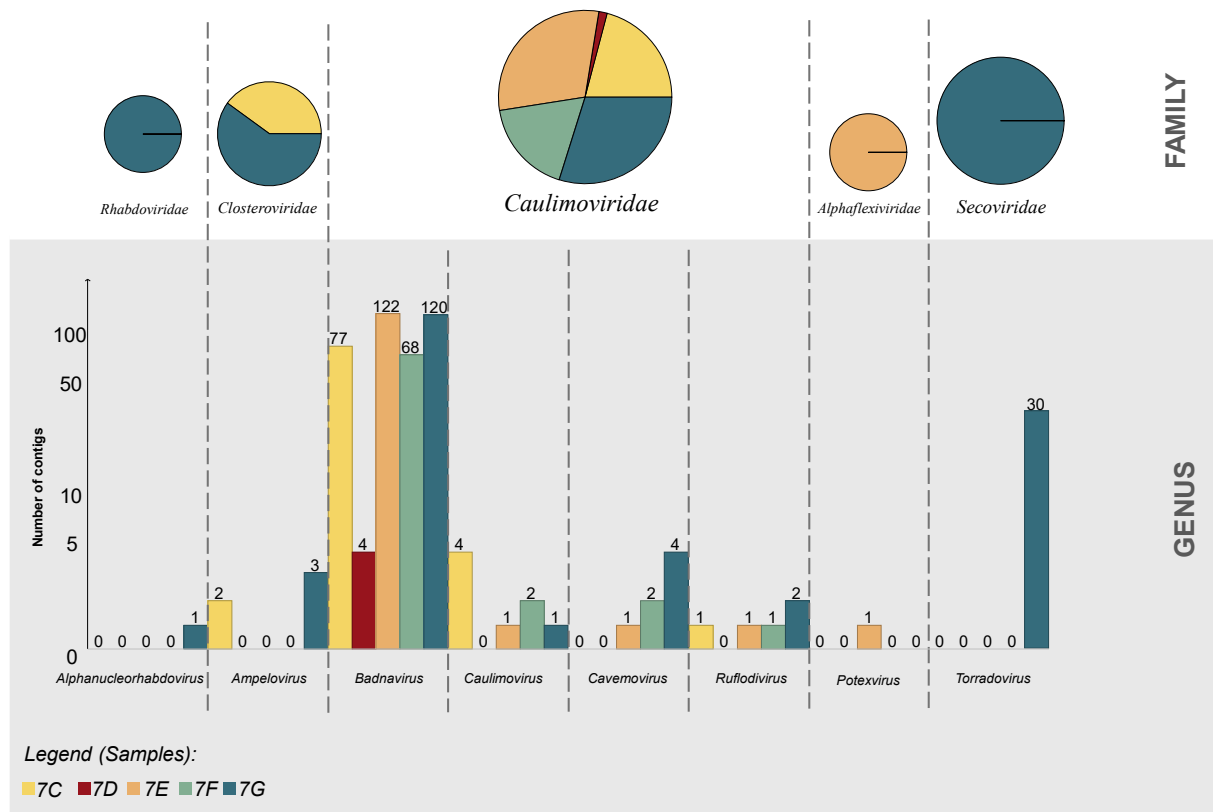
RT-PCR assays were conducted to amplify viral fragments using specific primers (supplementary table 20) designed to detect various viral genomic regions based on HTS data analysis. Total RNA was used as a template for complementary DNA (cDNA) synthesis. The reverse transcriptase reaction was performed using the M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (200 u/μL) (Invitrogen™, MA, USA) following the manufacturer's specifications. The cDNA was amplified using the Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™, Carlsbad, USA). The cycling conditions were as follows: 80 °C for 1 minute; 95 °C for 3 min, 35 cycles of 98 °C for 30 sec, 59 °C for 30 sec, 72 °C for 90 sec; and a final extension at 72 °C for 10 min. The number of cycles and PCR annealing temperatures were subject to change depending on the need to adapt to the melting temperature (T_m) of the designed primers. Amplicons were excised from gel, purified, and sequenced by Sanger sequencing at the Universidade Federal de Pernambuco.

3. Results

3.1 High-Throughput Sequencing analysis

The total number of reads per sample ranged from 19,475,455 to 30,015,310. After filtering duplicate sequences, removing rRNA, and quality trimming, the number of reads ranged from 3,833,981 to 8,968,699. The number generated of contigs per sample ranged from 14,790 and 234,681 (supplementary table 2). BlastX analysis of contigs revealed identity percentage to sequences from a total of 31 viral families. However, out of these 31 families, only sequences classified within five families that include viruses known to infect plants—namely, *Rhabdoviridae*, *Closteroviridae*, *Caulimoviridae*, *Alphaflexiviridae*, and *Secoviridae*—were considered in the analysis of this study (Figure 1). Most of the assembled viral genomes were found in the dataset 7G, except for one sequence of a potexvirus that could be assembled only from the dataset 7E. Although the datasets 7C, 7D and 7F generated contigs that matched viral sequences found in cassava, no complete genomic sequence could be assembled from these datasets.

Fig. 1. Number of contigs associated with plant virus sequences (genera and families) resulting from BlastX analysis of the assembled HTS datasets 7C, 7D, 7E, 7F and 7G of cassava leaf RNA.



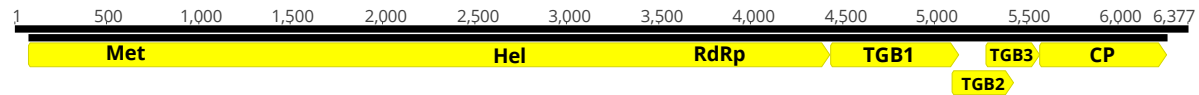
3.2 Assembled viral genome sequences related to cassava foliar viral diseases

3.2.1 Cassava Common Mosaic Disease (CsCMD)

The assembled consensus sequence of cassava common mosaic virus (CsCMV), comprising 6,420 nucleotides excluding the poly(A) tail, had a coverage of 39,343X (1,003,904 reads). The potexvirus CsCMV genomic sequence could only be assembled from dataset 7E, which consisted of a pool of plants originating from seeds. The genomic organization was consistent with that observed for other potexviruses, presenting five ORFs located at nucleotide positions 98–4468, 4471–5166, 5132–5470, 5319–5612, and 5615–6304, respectively (Figure 2). ORF1 encodes a protein involved in viral replication (Rep), which includes the following functional domains: a methyltransferase domain (Pfam01660) spanning amino acid positions 39–335, a helicase domain (Pfam01443) at positions 733–963, and an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain (Pfam00978) located between positions 1144–1396. The TGB1 protein, known for its role in RNA silencing suppression, contains a superfamily 1 helicase domain (Pfam01443) spanning amino acid positions 24–223. The sequence similarity of these putative proteins to corresponding isolates of CsCMV ranged from 86.5% to 97.3% at the nucleotide level and from 92.6% to 99.6% at the amino acid

level, with the highest amino acid similarity observed in the CP coding region (Table 1).

Fig. 2. Representation of assembled genomic sequence of the cassava common mosaic virus.



ORF1 encodes domains including Met (methyltransferase), Hel (helicase), and RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) of the replicase. The regions TGB1, TGB2, and TGB3 (Triple Gene Block) and CP (coat protein) are also indicated in the yellow boxes.

Table 1 – Percentage identity between isolate sequences and the assembled cassava common mosaic virus sequence at the amino acid and nucleotide levels.

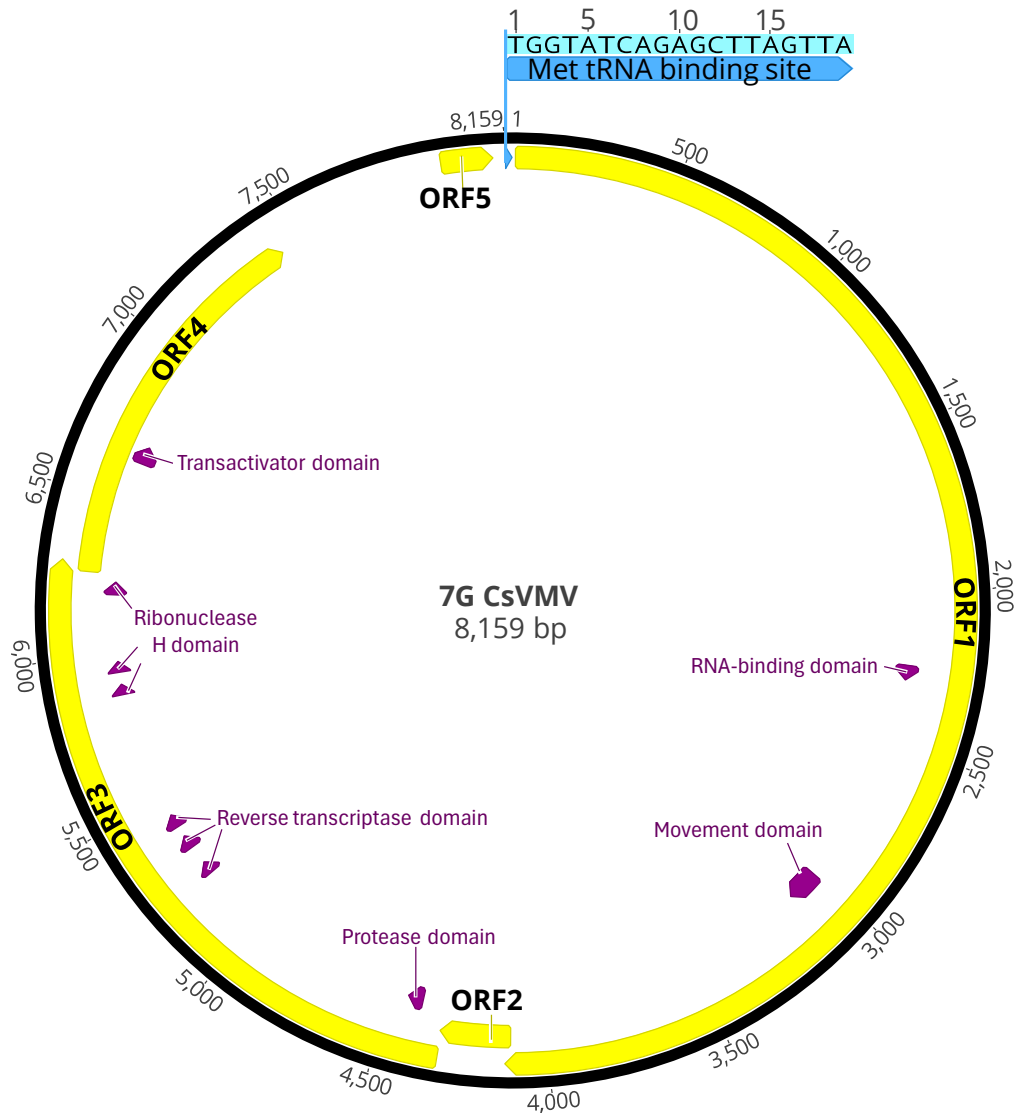
Isolate	% identity (nt)					% identity (aa)				
	ORF1	TGB1	TGB2	TGB3	CP	ORF1	TGB1	TGB2	TGB3	CP
Arg1271	89.9	88.4	95.8	95.1	90	97.4	95.7	96.4	95.8	98.3
BR	95	94.7	97	96.2	94.3	99	99.1	96.4	97.9	99.1
Hainan-CM	95.4	96.3	97.3	96.2	96.5	99.4	98.7	97.3	98.9	98.7
Hainan-DZ	88.4	86.6	93.1	94.8	89.7	97.9	96.5	95.5	92.6	96.1
JB017_ApX	96	97.1	97.3	96.5	96.7	99.4	99.1	97.3	98.9	99.1
LG	93.3	94.5	95.2	95.1	93.9	97.6	97.8	94.5	97.9	99.6
Mcol221	88.9	87.6	95.2	94.1	88.4	97.6	95.2	94.5	95.8	97.4
Chinese	88.4	86.5	93.1	94.4	89.7	98.2	96.5	94.5	92.6	96.5
Refseq	88.6	87.4	95.5	94.1	88.8	96.5	94.8	95.5	95.8	98.3

For complete data analysis see supplementary table 9-19.

3.2.2 Cassava Vein Mosaic Disease (CsVMD)

The complete circular genome of cassava vein mosaic virus (CsVMV) is 8,159 bp long and contains five ORFs. The genomic sequence was assembled with an average coverage of 66X, derived from 1,701 reads. BlastX analysis of a 4,606-nucleotide contig revealed 94.7% identity (E-value = 0) to the CsVMV coat protein sequence (NP_056846). In the genomic sequence from dataset 7G, the 5' tRNA binding site showed a single nucleotide variation, with a T-to-A substitution at position 19. Upstream of the tRNA binding site lies ORF1, which potentially encodes a polyprotein of 1,365 amino acids, including both the coat and movement proteins. ORF3 encodes a polyprotein comprising an aspartic protease, reverse transcriptase, and RNase H. ORF4 encodes the transactivator of translation protein, while ORFs 2 and 5 encode proteins of unknown function (Figure 3). Several key motifs were identified in the assembled sequence, including those for the RNA-binding domain, movement domain, protease, reverse transcriptase, and RNase H. The transactivator region within ORF4, responsible for the formation of inclusion bodies, was also identified (Table 2).

Fig. 3. Genomic representation of the assembled cassava vein mosaic virus sequence from the 7G dataset.



Yellow boxes denote ORF positions, purple boxes represent protein motifs and blue box denote the tRNA binding sequence.

Table 2 – Detected conserved motifs of biological significance in cassava vein mosaic virus (CsVMV).

Conserved region or motif	Region	Reference
RNA-binding domain CKCYNCGEEGHISPNC	ORF1	Calvert, Ospina and Shepherd, 1995
Movement domain KIKNIHLAAVEIVVKAYFREGIDTPLEIILCDDRI		
Protease domain FDTGANICICKKKVLPDE	ORF3	
Reverse transcriptase domain YYSKFDCKSGFYHI <20> WKVLPFGYHNPSIF <12> DFIIVYIDDILVFS		
Ribonuclease H domain IIEVDASNAYG <12> EYLCRYNSGTFK <73> QLIDGKQNIADYL		
Transactivator domain YSLTDYNKLVADIYTDKNLV	ORF4	Kochko <i>et al.</i> , 1998

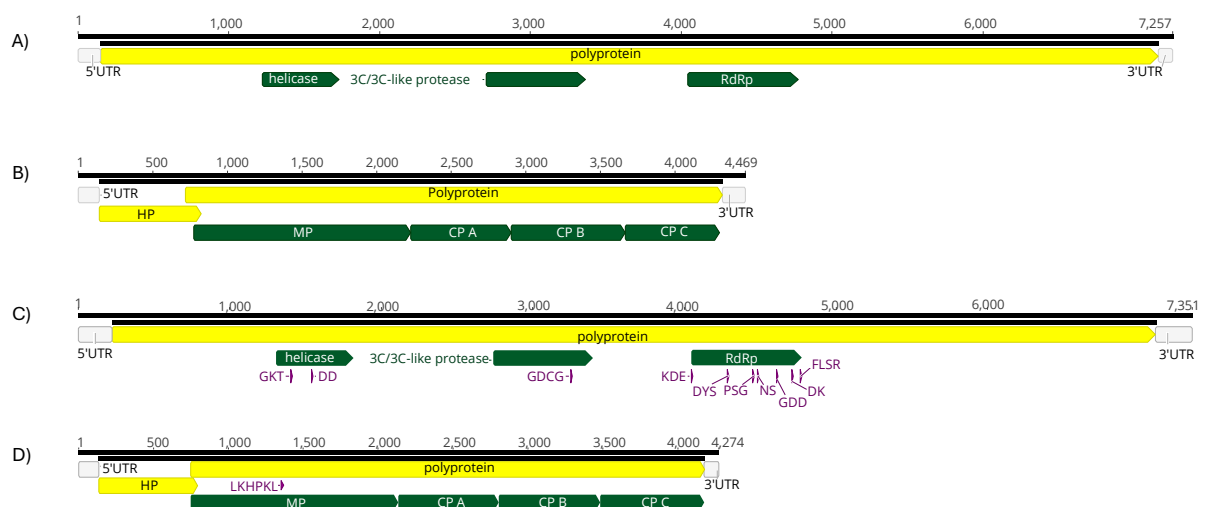
3.3 Assembled viral genome sequences related to CFSD

3.3.1 Torradovirus

A total of 30 contigs assembled from the dataset 7G showed similarities to sequences of members of the *Torradovirus* genus in BlastX analysis. These sequences aligned with sequences of polyproteins of tomato marchitez virus (19.64%), squash chlorotic virus (13.69%), carrot torradovirus (13.10%), motherwort yellow virus (13.10%), lettuce necrotic virus (11.31%), tomato chocolate virus (10.71%), tomato necrotic virus (10.12%) and tomato torrado virus (8.33%). Two torradoviruses with bipartite genomes consisting of RNA1 and RNA2 were assembled using reference genomic sequences of cassava torrado-like virus 1 (RNA1 acc. number ON924327, RNA2 acc. number ON924328) and cassava torrado-like virus 2 (RNA1 acc. number ON887638, RNA2 acc. number ON887639). The genome coverage ranged from 332X to 931X for RNA1 and 617X to 1240X for RNA2.

The genomic sequences of CsTLV1 and CsTLV2 ranged in size from 7257-7351 nt for RNA1 and 4469-4274 nt for RNA2, respectively (Table 3), consistent with typical sizes observed in members of other genera within the family. RNA1 encodes a polyprotein crucial for viral replication (RdRp), featuring helicase domains (GKT and DD motifs), a protease (GDCG motif), and polymerase domains (KDE, DYS, NS, PSG, GDD, DK, FLSR motifs). RNA2 contains two ORFs: ORF1 codes for a hypothetical protein (HP), whereas ORF2 encodes a polyprotein encompassing the movement protein and capsid proteins (CP-A, CP-B, and CP-C) (Figure 4). The conserved LxxPxL motif within the movement protein was also identified.

Fig. 4. Genomic representation of the cassava torrado-like 1 and 2 virus assembled from the 7G dataset.



CsTLV1 RNA 1 (A). CsTLV1 RNA 2 (B). CsTLV2 RNA 1 (C) CsTLV2 RNA 2 (D). Yellow boxes denote ORF

positions, green boxes indicate protein domains, and purple boxes represent protein motifs. Capsid protein (CP), movement protein (MP), hypothetical protein (HP), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

Table 3 – Genomic characteristics of isolates of CsTLV 1 and CsTLV 2.

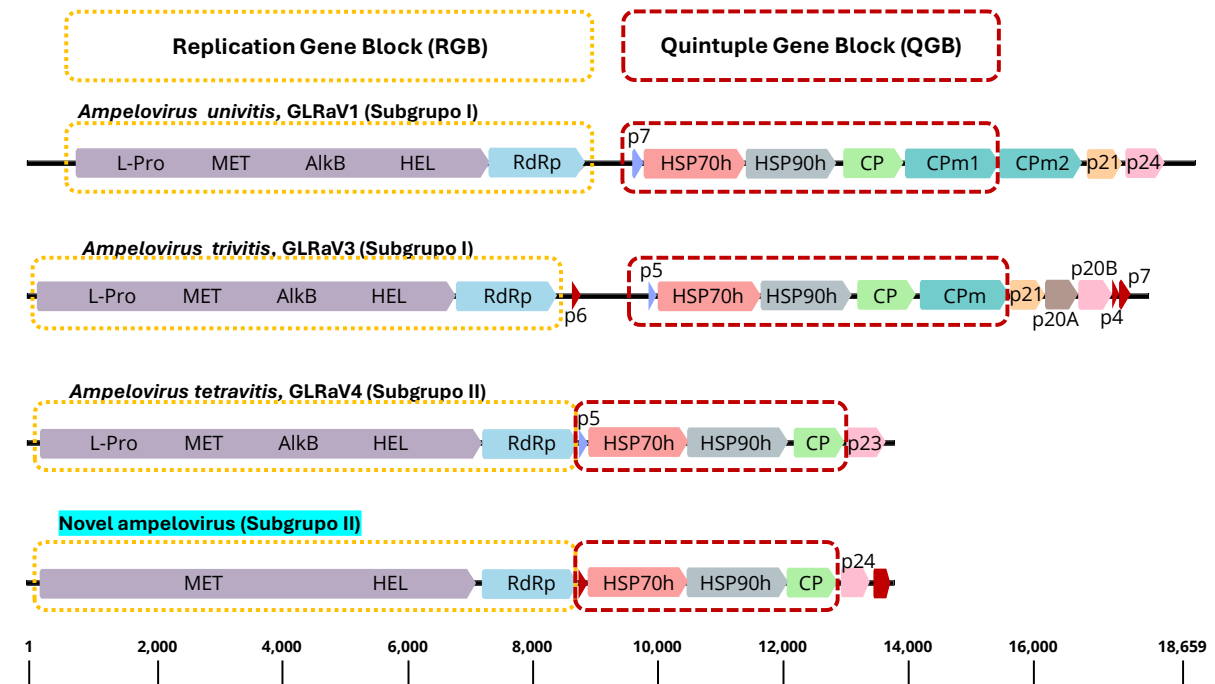
Virus	Segment	Genome Length (nt)	Length of Open Reading Frames (Orfs) (nt)			
			5' UTR	Polyprotein	HP	3' UTR
CsTLV 1	RNA1	7257	149	7011	-	97
	RNA2	4469	141	3597	681	154
CsTLV 2	RNA1	7351	225	6885	-	241
	RNA2	4274	135	3432	660	99

3.3.2 Ampelovirus

BlastX analysis using a contig of 13,924 nucleotides revealed 50.7% identity at amino acid level (E-value: 2.79e-146) to a sequence of the heat shock protein 70 of grapevine leafroll-associated virus 10 (GLRaV-10) (acc. number YP_002364305). The same sequence also showed similarities that did not exceed 50% to other viral sequences classified within the *Ampelovirus* genus, including GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-4, plum bark virus, pineapple mealybug wilt-associated virus, and air potato virus. The complete genome sequence of a novel ampelovirus was assembled with an average coverage of 276X (7,368 reads).

The assembled ampelovirus sequence is a monopartite, positive-sense, single-stranded RNA measuring 13,938 nt and containing eight ORFs. The genus *Ampelovirus* is divided into two subgroups: subgroup I, which includes species with larger genomes (15,000 to over 18,000 nt) and complex structures (9 to 12 ORFs). Notably, subgroup I features a GC-rich intergenic region between the RGB and QGB gene blocks, spanning over 600 nucleotides in length. In contrast, subgroup II comprises five species characterized by smaller genomes (13,000 to 14,000 nt) and simpler structures (7 to 8 ORFs), and an intergenic region that averages around 150 nucleotides in length. Based on its genomic organization, the assembled ampelovirus sequence is classified within subgroup II of the ampeloviruses (Figure 5).

Fig. 5. Comparison of genomic characteristics of a novel ampelovirus assembled from the dataset 7G and those from other ampeloviruses.



The colored boxes represent the ORFs. Homologous proteins, which perform the same function in each species, are represented by the same colors across the three genomes. The ORFs in red have unknown functions. The abbreviations are as follows: L-Pro: protease; MET: methyltransferase; AlkB: AlkB domain; HEL: RNA helicase; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase; HSP70h: HSP70 homolog; CP: capsid protein; CPm: minor capsid protein. The virus in the present study is highlighted in blue.

The genomic assembled sequence contains the two main gene blocks characteristic of ampeloviruses: the replication gene block (RGB) and the quintuple gene block (QGB). The RGB consists of ORF1a and ORF1b. ORF1a encodes a polyprotein with two conserved domains: the viral methyltransferase (pfam01660) located at amino acid positions 562-888 and the viral helicase (pfam01443) at amino acid positions 1752-2022. ORF1b encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) with the RdRp 2 superfamily domain (pfam00978). The QGB consists of ORF2, encoding a small hydrophobic protein, ORF3, which encodes a 70 kDa heat shock protein homolog (HSP70h), ORF4, encoding a 90 kDa heat shock protein homolog (HSP90h) with the HSP90h domain (pfam03225) spanning amino acid positions 6-486, ORF5 encoding the capsid protein with the closter coat superfamily motif (pfam01785) spanning amino acid positions 133-242, and two additional ORFs with unknown functions.

Amino acid sequences of four gene products used for taxonomic demarcation within the genus *Ampelovirus* were compared. The ORF1a, RdRp, HSP70h and CP protein sequences of the new ampelovirus, compared with other ampelovirus sequences available in NCBI (supplementary table 4), showed sequence identities ranging from 25.0% to 49.1%

(Table 4). These variations exceed the 25% threshold of genetic variability within the genus.

Table 4 – Percentage amino acid sequence identities between proteins encoded by the novel ampelovirus and others.

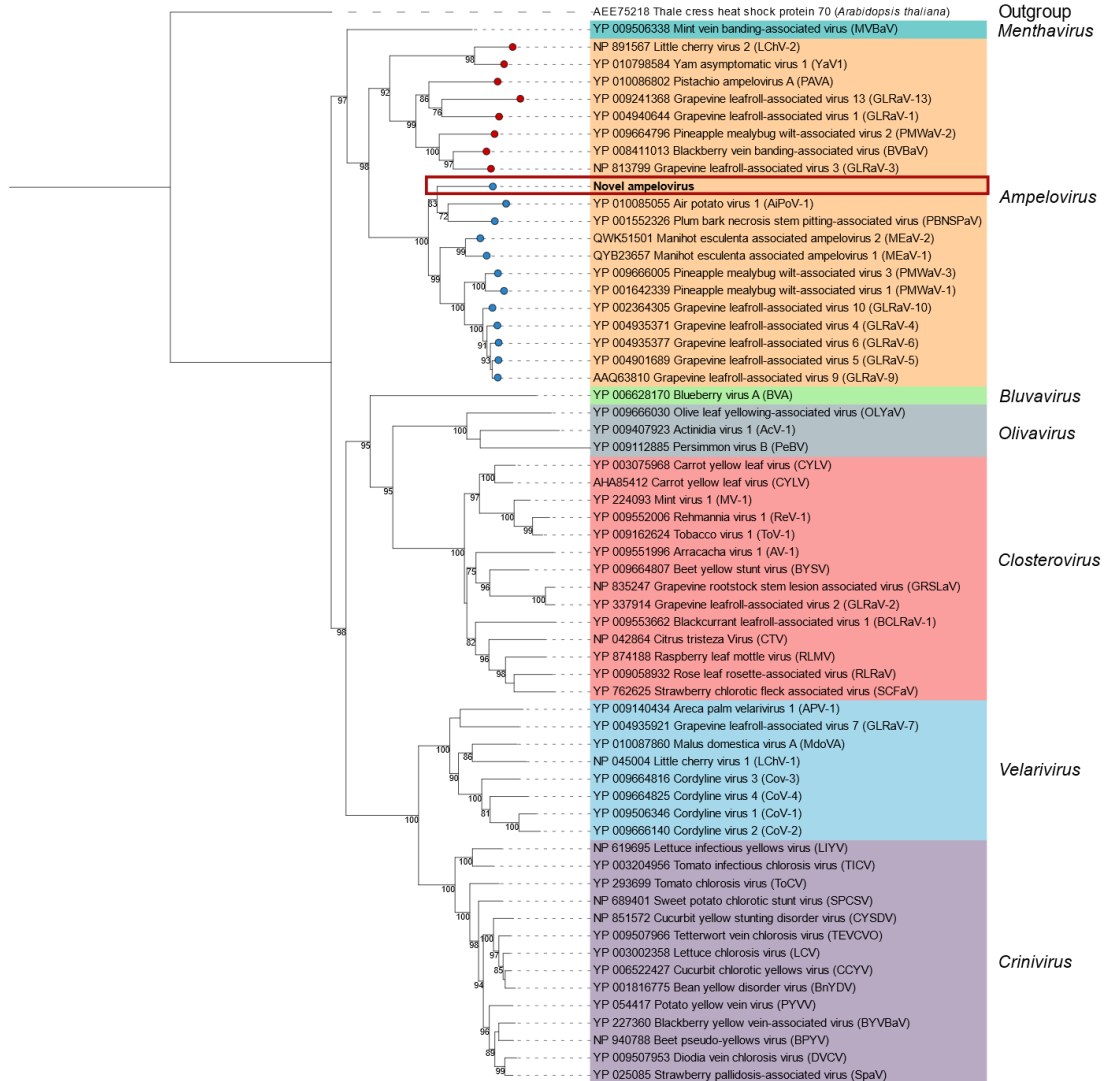
Virus	Acronym	Novel Ampelo from 7G			
		ORF1a	RdRp	HSP70h	CP
Air potato virus 1	AiPoV-1	28.4	47.8	46.5	34.4
Blackberry vein banding-associated virus	BVBaV	27.5	35.9	34.0	29.7
<i>Manihot esculenta</i> associated ampelovirus 1	MEaV-1	29.2	45.7	48.4	40.8
<i>Manihot esculenta</i> associated ampelovirus 2	MEaV-2	30.0	47.4	49.1	37.3
Grapevine leafroll-associated virus 1	GLRaV-1	26.4	35.3	34.5	25.4
Grapevine leafroll-associated virus 3	GLRaV-3	26.1	35.1	34.0	33.2
Grapevine leafroll-associated virus 4	GLRaV-4	29.0	41.2	47.0	40.8
Grapevine leafroll-associated virus 5	GLRaV-5	29.5	43.0	49.0	40.0
Grapevine leafroll-associated virus 6	GLRaV-6	29.2	44.7	47.5	39.8
Grapevine leafroll-associated virus 9	GLRaV-9	29.1	43.8	47.5	42.2
Grapevine leafroll-associated virus 10	GLRaV-10	28.4	42.5	46.9	43.0
Grapevine leafroll-associated virus 13	GLRaV-13	25.5	36.2	35.9	25.5
Little cherry virus 2	LChV-2	25.0	37.1	28.8	25.4
Pineapple mealybug wilt-associated virus 1	PMWaV-1	30.5	41.6	46.8	34.4
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2	PMWaV-2	26.2	34.2	35.7	30.8
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3	PMWaV-3	30.6	40.7	48.2	38.8
Pistachio ampelovirus A	PAVA	27.1	39.6	34.2	29.9
Plum bark necrosis stem pitting-associated virus	PBNSPaV	26.8	47.0	47.8	33.5
Yam asymptomatic virus 1	YaV1	27.6	35.9	35.2	25.3

For complete data analysis see supplementary table 4-7.

Phylogenetic analyses based on amino acid sequences of the HSP70h gene from sequences of the *Closteroviridae* family were conducted using the maximum likelihood algorithm. Phylogenetic analysis revealed that the new ampelovirus sequence clustered with other ampeloviruses, confirming its classification within the genus *Ampelovirus* (Figure 6). Furthermore, the phylogenetic analysis placed the new ampelovirus sequence within the subgroup II, in a branch that includes sequences of AiPov-1, PBNSPaV, PMWaV-1, PMWaV-3, cassava ampelovirus 1 and 2, as well as grapevine leafroll-associated virus 4, 5, 6, 9, and 10 (Figure 6). The genomic sequence of the new ampelovirus exhibits typical characteristics of members of the subgroup II, including a reduced genomic size and a small intergenic region between the two gene modules. Collectively, these results clearly indicate that this new ampelovirus represents a distinct species within the *Ampelovirus* genus.

Fig. 6. Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of HSP70h from members of the *Closteroviridae* family.

Tree scale: 1



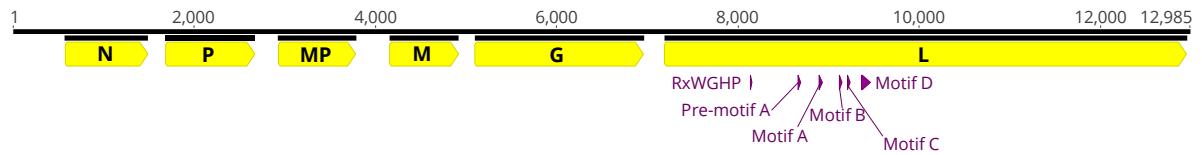
Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood. The LG +R+F substitution model was determined to be the best-fit model. Bootstrap values (%) from 1000 replicates are indicated at the nodes, with only values exceeding 70% shown. A *Arabidopsis thaliana* sequence was used as an outgroup. Subgroups I and II of the ampeloviruses are depicted by the circles at the ends of the branches in red and blue, respectively. Fully colored rectangles denote different genera within the family. The new ampelovirus species is highlighted in bold marked by the red dashed rectangle.

3.3.3 Rhabdovirus

A sequence of a rhabdovirus could be assembled despite its low average coverage of 27X (858 reads) in the dataset 7G. The assembled genome has a length of 12,985 nt (Table 5) and contained the canonical structural proteins found in members of the *Rhabdoviridae* family, specifically the nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M),

glycoprotein (G), and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (L). Additionally, a putative cell-to-cell movement protein (MP) was identified (Figure 7).

Fig. 7. Genomic and motifs representation of the novel assembled rhabdovirus sequence.



Yellow boxes denote ORF positions and purple arrows represent protein motifs. Nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), movement protein (MP), matrix protein (M), glycoprotein (G), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (L).

Table 5 – Genomic characteristics of the novel assembled rhabdovirus sequence.

Virus	Genome Length (nt)	Length of Open Reading Frames (Orfs) (nt)					
		N	P	MP	M	G	L
Novel rhabdo	12,985	912	981	854	756	1860	5764

The conserved domains, such as the RxWGHP motif, Pre-motif A (GxxxKERE), Motif A (DFxKWNxxxR), Motif B (GxEGxRQKxWT), Motif C (GxGDNQ), and Motif D (GLPxKxxExWxSx7Kx13K), were found in the L ORF at amino acid positions 319–323, 495–501, 573–581, 646–655, 678–682, and 727–759, respectively. Only Motif A (DFxKWNxxxR) differed by two amino acids from that reported by Hu *et al.* (2023b), where the motif “DExKWNxxxE” was described as Motif A for a species in the *Betanucleorhabdovirus* genus.

The phylogenetic analysis of the L gene, compared with other plant-infecting rhabdoviruses as classified by the ICTV for genus demarcation within the family *Rhabdoviridae*, confirms that the assembled sequence belongs to the genus *Alphanucleorhabdovirus* (Figure 8).

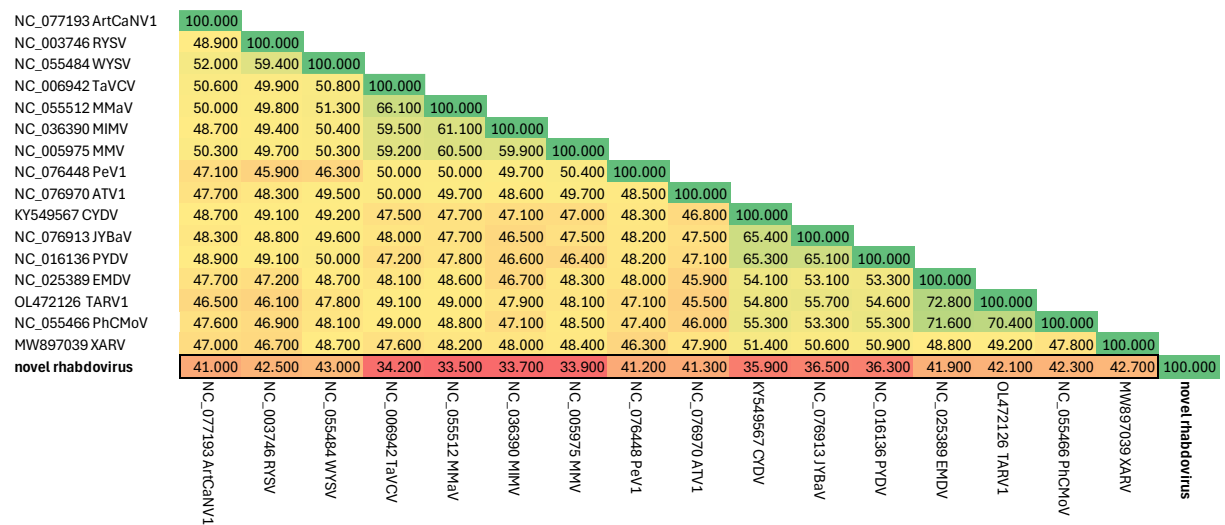
Fig. 8. Phylogenetic reconstruction based on L gene sequences of viruses of the subfamily *Betarhabdovirinae*.



An unrooted phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood method. The GTR + R substitution model was determined as the best-fitting model. Bootstrap values (%) for 1000 replicates are indicated at the nodes, with only bootstrap values greater than 70% shown. Colored rectangles represent different genera within the family. The new assembled alphanucleorhabdovirus sequence is highlighted in bold.

The complete genomic sequence of the novel rhabdovirus with nucleotide sequence alignment from other alphanucleorhabdoviruses available in the NCBI database (supplementary table 8) revealed similarities ranging from 33.5% to 43% (Figure 9). This adheres to the species demarcation criteria for the genus, where nucleotide sequence identity of complete genomes is below 75%.

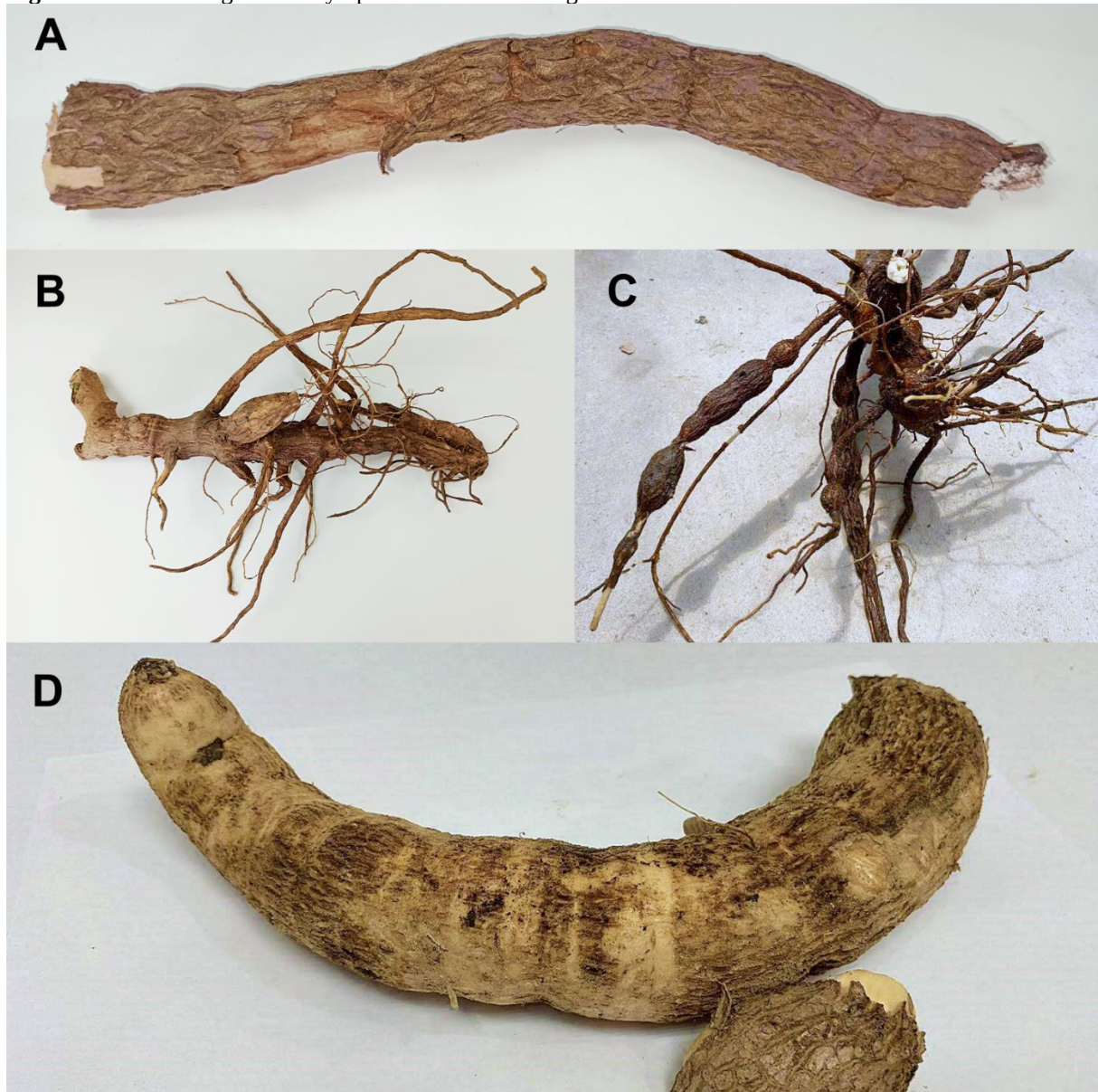
Fig. 9. SDT percentage nucleotide sequence identities between the novel and other alphanucleorabdovirus sequences.



3.4 Root Symptomatology

Regarding symptomatology, as described by Pardo *et al.* (2022), roots displaying rough and irregular bark texture, surface fissures or cracks, and tapering of the tuberous root were visually considered indicative of the disease. In the advanced stage of the disease, roots exhibit characteristic constrictions, and the internal tissue becomes lignified (Figure 10). Symptoms of CFSD were observed in the roots of plants from dataset 7G. The roots of other sequenced plants did not exhibit CFSD symptoms, which was expected as these plants in the pools were grown from seed. Despite detecting CsCMV in a pool of seed-derived plants, no symptoms of CFSD were observed in the roots of these plants. Only one accession from this pool (PL11/ BR-21GS-C3-251-6) exhibited foliar symptoms of mosaic. Additionally, among the 28 other BGM plants observed in field conditions, only isolate PL 38 (BGM-1124, Figure 10A) showed visual symptoms indicative of CFSD. This plant was included in the RT-PCR analysis. The symptoms observed in the BGM-1124 plant, considered visually positive for CFSD in this study, were reproduced at least twice in the field.

Fig. 10. Roots showing various symptoms of Cassava Frogskin Disease.



Plant accessions from Embrapa Cassava and Fruits: BGM-1124 (A). BGM-0929 (B). BGM-1618 (C). BGM-1275 (D).

The negative controls consisted of commercial table cassava root samples that appeared visually asymptomatic, appearing firm, smooth, and free from any external blemishes or abnormalities. The skin is intact without cracks or lesions, and the flesh is white or cream-colored, without discoloration, soft spots, or signs of decay. There are no signs of unusual swelling, deformities, or fibrous texture, indicating a well-developed and disease-free root system.

3.5 RT-PCR detection

Based on the HTS results, primers were designed for RT-PCR detection of CsTLV 1, CsTLV 2, Ampelo 1, novel Ampelovirus, and novel rhabdovirus sequences. Specific primers for cassava ampelovirus 1 were also developed, taking into account the presence of the novel ampelovirus and the detection of cassava ampelovirus 1 sequence in Brazil (see supplementary table 20). To this extent, we first determined the best region for RNA extraction from cassava roots. The RT-PCR results for CsTLV 2 were more consistent when using root samples compared to leaf extractions, indicating an uneven distribution of the virus throughout the plant. RT-PCR assays performed on tuberous root tissues, cortical parenchyma, and storage parenchyma showed better amplification than assays using the vascular bundle region, which yielded no amplification. This may be related to the distribution of phloem vessels, which are more abundant near the cortical regions where CsTLV was amplified. Based on these findings, all subsequent RT-PCRs were conducted using tissue extracted directly from the tuberous root.

Interestingly, asymptomatic roots tested positive for CsTLV 1, the novel ampelovirus, and the novel rhabdovirus via RT-PCR (Table 6). However, in the symptomatic pools AE1, AE2, and AE3, CsTLV 2 was not detected despite the presence of ampelovirus 1. Asymptomatic plants showed absence of CsTLV 2 and ampelovirus 1, while some symptomatic plants had either presence or absence of CsTLV 2. This suggests that the absence of CsTLV 2 alone does not directly influence symptom expression in the roots. The key difference between symptomatic samples and controls was the presence of ampelovirus 1, highlighting the significance of this virus in symptomatology.

Table 6 – Virus sequences amplified in cassava tuberous root by RT-PCR.

Sample (Tuberous Root)	Ampelovirus 1	Novel Ampelovirus	CsTLV1 RNA 1	CsTLV2 RNA 1	CsTLV2 RNA 2	Novel rhabdovirus	Symptoms of CFSD
Pool Control - (PB)	+	+	+	+	+	+	+
Pool Control - (RN)	+	+	+	+	+	+	+
PL 22 + 23 (BR-21GS-C3-130-17 + BGM-1634)	+	+	+	+	+	+	+
PL 23 (BGM-1634)	+	+	+	+	+	+	+
PL 25 + 27 (BGM-0929 + BGM-1275)	+	+	+	+	+	+	+
PL 27 (BGM-1275)	+	+	+	+	+	+	+
PL 38 (BGM-1124)	+	+	+	+	+	+	+
Pool AE1	+	+	+	+	+	+	+
Pool AE2	+	+	+	+	+	+	+
Pool AE3	+	+	+	+	+	+	+

The symptomatic sample PL38 (BGM-1124) tested positive by RT-PCR for all five viruses: CsTLV 1, CsTLV 2, CsAV 1, novel ampeloviruses, and rhabdoviruses. This detection pattern was also observed in other symptomatic root samples, possibly indicating the significance of mixed infections involving CsAV 1 and other viruses in the disease. These findings do not exclude the involvement of CsTLV 2 in more severe disease manifestations. Finally, the interaction of ampelovirus 1 with other detected viruses remains poorly understood. Future grafting studies need to be conducted to confirm the importance of ampeloviruses or the interaction between torradoviruses and ampeloviruses in the disease's symptomatology.

4. Discussion

Cassava (*Manihot esculenta*) is a critical staple crop for millions of people in tropical and subtropical regions, particularly in Africa, Asia, and Latin America. It plays a vital role in food security due to its ability to thrive in poor soils and withstand drought conditions (Reddy, 2015; Li *et al.*, 2017). However, cassava is vulnerable to numerous viral diseases that significantly impact crop yield and quality. Among the most severe viral pathogens are cassava mosaic disease (CMD) and cassava brown streak disease (CBSD), caused by geminiviruses and ipomoviruses, respectively. These diseases can lead to devastating crop losses, sometimes exceeding 80% (Legg *et al.*, 2015). In addition to CMD and CBSD, cassava is affected by other viral pathogens, such as cassava common mosaic virus (CsCMV) and cassava vein mosaic virus (CsVMV). These viruses, though often less studied, pose potential threats to cassava cultivation. CsCMV belongs to the *Potexvirus*

genus, while CsVMV c However, CsVMV has not been associated with significant root damage in cassava. While CsCMV is primarily spread through mechanical infection and vegetative propagation, studies have raised the possibility of seed transmission (Choi, Park, and Ryu, 2012). Although no CsCMV isolates have been confirmed to be seed-transmitted, research on related viruses within the same *Potexvirus* genus, such as hosta virus X (HVX), suggests that seed transmission could be a potential route. In a study by Choi, Park, and Ryu (2012), HVX was transmitted from infected parent plants to progeny via seeds in *Hosta 'Blue Cadet'*, with detection by RT-PCR of the virus in the embryo but not in the seed coat or endosperm. Our findings, which detected CsCMV in a pool of seed-derived cassava plants, highlight the need for further investigation into the possibility of seed transmission as an alternative mechanism for virus spread. This could have significant implications for cassava propagation and breeding programs.

Despite its long history in cassava cultivation in Brazil, CsVMV has not been linked to root diseases in cassava. This virus mainly affects the semiarid region of northeastern Brazil (Calvert, Ospina and Shepherd, 1995), where cases of cassava frogskin disease (CFSD) are rare or nonexistent. Furthermore, in the southern regions of the country, CsVMV and CsCMV have also not been associated with CFSD. A study by Colariccio et al. (2020) on the occurrence of CsCMV and CsVMV in 17 commercially cultivated cassava cultivars, grown for both fresh consumption and flour production in the southern region of Santa Catarina, Brazil, did not detect the presence of cassava frogskin disease in the cultivars studied. CsCMV infection, both alone and in co-infection with CsVMV, was identified in the majority of the cultivars. Another study by Carvalho et al. (2017) investigated the cleaning of cassava genotypes showing cassava frogskin symptoms through *in vitro* shoot tip culture from the accessions 'Cidade Rica' (BGM0232), 'Riqueza II' (BGM0584), 'Mandioca Lagoa' (BGM1342), 'CM-425/7' (BGM0315), 'Sabará' (BGM0464), and 'Sauma' (BGM0841). PCR results confirmed that only the accessions BGM0315 and BGM0464 were infected with CsVMV, demonstrating that CFSD was still observed even in the absence of CsVMV.

In Brazil, cassava torrado-like virus 1 (CsTLV 1) has been identified in cassava samples exhibiting typical symptoms of cassava frogskin disease, despite testing negative for phytoplasmas (Oliveira *et al.*, 2020). Previous studies have reported mixed infections in cassava involving CsTLV 1 and viruses from other species (Carvajal-Yepes *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2020), though none have detected CsTLV 2. This raises the question of whether CsTLV 1 or CsTLV 2 plays a more significant role in the manifestation of CFSD symptoms. The root symptoms of CFSD were first identified in southern Colombia in the

1970s and have since been observed in other regions, often in combination with leaf mosaic symptoms (Pineda, Jayasinghe and Lozano, 1983). One of the key indicators of CFSD is the presence of root symptoms in the absence of foliar or stem symptoms, making it difficult to detect the disease through visual inspection alone. The *Secundina* genotype has served as an indicator plant for CFSD due to its susceptibility to the disease. However, not all cassava genotypes that display CFSD root symptoms exhibit visible symptoms on leaves or stems, complicating efforts to diagnose and manage the disease (Alvarez *et al.*, 2009; Calvert *et al.*, 2008). Further research is needed to clarify the roles of these viruses in symptom expression, particularly in cassava roots. The role of insect vectors, specifically the whitefly *Aleurotrachelus socialis*, has been studied in relation to the transmission of CFSD. Early research linked this species with the transmission of leaf symptoms from CFSD-affected plants to *Secundina* (Angel, Nolt, and Pineda, 1987; Angel *et al.*, 1990). Since members of the genus *Torradovirus*—to which CsTLV 1 belongs—are known to be transmitted by whiteflies, the possibility that *A. socialis* may transmit CsTLV 1 in cassava warrants further investigation. While CsTLV 1 has been shown to cause leaf symptoms in single infections (Carvajal-Yepes *et al.*, 2014), it is crucial to explore its potential to induce root symptoms, which are the hallmark of CFSD, and whether this is associated with CsTLV 1, CsTLV 2, or both. Historical observations of CFSD have identified virus-like particles and mycoplasma-like structures in infected cassava plants, suggesting a complex disease etiology. For instance, Pineda *et al.* (1980) described particles resembling members of the *Closteroviridae* family in CFSD-affected plants. Advances in HTS have since provided new insights, revealing that plants infected with viruses from this family can contain subviral defective RNAs. However, the roles of these defective RNAs in disease development remain unknown (Bar-Joseph and Mawassi, 2013). The discovery of two new ampeloviruses, cassava ampelovirus 1 (CsAV 1) and cassava ampelovirus 2 (CsAV 2), further complicates our understanding of cassava viral infections. These viruses were first described by Kwibuka *et al.* (2021) in the Democratic Republic of Congo, Madagascar, Mayotte, and Réunion, in cassava cuttings showing symptoms similar to CBSD. Although the plants no longer exhibited symptoms after six months in greenhouse conditions, no direct link between these ampeloviruses and CFSD or CBSD was established. In Brazil, CsAV 1 was first detected by Winter *et al.* (2021) in cassava tubers with frogskin symptoms, but ongoing studies have been conducted to investigate the relationship between CsAV 1 and CFSD. The detection of CsAV 1 in regions with reported CFSD cases suggests a broader distribution of this virus, raising important questions about its epidemiology and pathogenicity.

High throughput sequencing (HTS) has revolutionized virus discovery in cassava, allowing for the identification and classification of various viral agents, including nucleorhabdoviruses. Historically, nucleorhabdovirus particles were first observed in cassava leaves by Kitajima and Costa (1979) using electron microscopy. These particles were found in asymptomatic plants, suggesting viral latency. In this study, we assembled the complete genomic sequence of this virus, 45 years after its initial discovery. The classification of nucleorhabdoviruses into three new genera - *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, and *Gammanucleorhabdovirus* - further underscores the complexity of nucleorhabdoviral infections in cassava (Freitas-Astúa *et al.*, 2019). Although the presence of a nucleorhabdovirus in cassava has long been known, its biological role in the plant and its contribution to diseases like CFSD remain unclear. Further research is essential to determine whether nucleorhabdoviruses contribute to the symptomatology of CFSD or act in synergy with other viral agents such as CsTLV 1-2 or CsAV 1.

It is well established that torradoviruses, ampeloviruses, and plant rhabdoviruses are phloem-restricted (Ferriol *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2023; Prator *et al.*, 2017). Therefore, selecting the appropriate root regions for extraction is crucial for facilitating the detection of these viruses. Despite the main difference in the presence of ampelovirus 1 in symptomatic and asymptomatic samples, what has been reported indicates that isolated infections by ampeloviruses may not be the primary cause of the observed disease. For instance, CsAV 1 is widespread in African countries where frogskin disease has not been reported (Kwibuka *et al.*, 2021), raising important questions about the viral load and behavior of ampeloviruses, which are known to generate variants over time. It remains uncertain what impact defective viral accumulation over multiple cultivation cycles might have on plant health.

Finally, our findings align with earlier work by Kitajima and Costa (1979), who identified nucleorhabdovirus particles in asymptomatic cassava leaves used as negative controls in cassava virus tests. We also detected viruses in asymptomatic root samples from the northeast region of Brazil. The detection of the novel ampelovirus and CsTLV 1 in asymptomatic plants presents significant sanitary concerns. Infected, yet symptomless, cassava plants can be inadvertently propagated and distributed, potentially introducing these viruses into new regions. Both Rio Grande do Norte and Paraíba fields showed the presence of these viruses even in negative control samples, emphasizing the widespread nature of the infection. Interestingly, most studies on CsTLV 1 and ampelovirus detection in cassava have focused solely on leaf material and symptomatic samples (Carvajal-Yepes *et al.*, 2014; Kwibuka *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2020). Our study highlights the importance of including

negative controls in virus detection, as the mere presence of the novel ampelovirus, CsTLV 1, and a novel rhabdovirus did not consistently correlate with disease symptoms. Importantly, the absence of CsAV 1 and CsTLV 2 in negative controls from symptomatic plants suggests that one or both of these viruses may be key contributors to disease development. This finding highlights the importance of adopting more comprehensive viral detection strategies in cassava research, including the need to explore mixed infections, asymptomatic carriers, and viral evolution over multiple cultivation cycles. A deeper understanding of these viral interactions will be crucial for developing effective disease management and prevention strategies, ultimately safeguarding cassava cultivation and food security in regions reliant on this vital crop.

5. Acknowledgements

We gratefully acknowledge support from the Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Edital 09/2023 of CAPES-PROBAL, process 88881.895122/2023-01), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE, Edital 29/2022, APQ-1106-5.01/22), the Leibniz Institute DSMZ, Embrapa Mandioca e Fruticultura, and the Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE).

References

- ALVAREZ, E. *et al.* Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. **American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 93, n. 11, p. 1139–1145, 2009. ISSN 0191-2917. DOI 10.1094/PDIS-93-11-1139.
- ALVAREZ, E.; ALBERTO, L. G.; MEJÍA, J. F. Cassava diseases in Latin America, Africa and Asia. In: **THE CASSAVA HANDBOOK**. Rome: FAO, 2012. p. 258–304.
- ANGEL, J. C.; PINEDA, B. L.; NOLT, B.; and VELASCO, A. C. Mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae) asociadas a transmisión de virus en yuca. **Fitopatología Colombiana**, Bogotá, v. 13, n. 1, p. 65–71, 1990.
- ANGEL, J. C. S.; NOLT, B. L.; and PINEDA, B. L. Estudios sobre la transmisión por “moscas blancas” (Homoptera: aleyrodidae) de virus asociados con el “cuero de sapo” en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Agronómica**, Bogotá, 1987.
- BAR-JOSEPH, M.; MAWASSI, M. The defective RNAs of *Closteroviridae*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, 2013. ISSN 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00132.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; and USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014. ISSN 1367-4803. DOI 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170.

BUCHFINK, B.; REUTER, K.; and DROST, H. G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. **Nature Methods**, London, v. 18, n. 4, p. 366–368, 2021. ISSN 1548-7105. DOI 10.1038/s41592-021-01101-x.

BUSHNELL, B. **BBTools: a suite of fast, multithreaded bioinformatics tools designed for analysis of DNA and RNA sequence data**. [S. l.]: Joint Genome Institute, 2018. Available at: sourceforge.net/projects/bbmap/.

CALVERT, L. A.; CUERVO, M.; LOZANO, I.; VILLAREAL, N.; and ARROYAVE, J. Identification of Three Strains of a Virus Associated with Cassava Plants Affected by Frogskin Disease. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 11–12, p. 647–653, 2008. ISSN 0931-1785. DOI 10.1111/j.1439-0434.2008.01412.x.

CALVERT, L.; CUERVO, M.; LOZANO, I. Cassava Viral Diseases of South America. In: **Cassava in the third millennium: Modern production, processing, use and marketing systems**. Cali: CIAT, 2012. p. 309–318. ISBN 978-958-694-112-9.

CALVERT, L. A.; OSPINA, M. D.; and SHEPHERD, R. J. Characterization of cassava vein mosaic virus: a distinct plant pararetrovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 76, n. 5, p. 1271–1278, 1995. ISSN 0022-1317. DOI 10.1099/0022-1317-76-5-1271.

CARVAJAL-YEPES, M.; OLAYA, C.; LOZANO, I.; CUERVO, M.; CASTAÑO, M.; and CUELLAR, W. J. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from colombia. **Virus Research**, Amsterdã, v. 186, p. 76–86, 2014. ISSN 1872-7492. DOI 10.1016/j.virusres.2013.12.011.

CARVALHO, M. J. S.; OLIVEIRA, E. J.; SOUZA, A. S.; PEREIRA, J. S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; and OLIVEIRA, S. A. S. Cleaning cassava genotypes infected with cassava frogskin disease via in vitro shoot tip culture. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 2, 2017. ISSN 1676-5680. DOI 10.4238/gmr16029556.

CHOI, S.; PARK, M.; and RYU, K. Phylogeny, coat protein genetic variability, and transmission via seeds of Hosta Virus X. **Acta Biologica Hungarica**, Budapeste, v. 63, n. 1, p. 151–161, 2012. ISSN 0236-5383. DOI 10.1556/ABiol.63.2012.1.12.

COLARICCIO, A.; RIVAS, E. B.; BONFIM JUNIOR, M. F.; and PERUCH, L. A. M. Ocorrência do Cassava Common Mosaic Vírus (CsCMV) e Cassava Vein Mosaic Vírus (CsVMV) em cultivares de mandioca em Santa Catarina, Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v. 82, n. 1, p. 1–9, 2020. ISSN 1980-6221. DOI 10.31368/1980-6221v82a10001.

COSTA, A. S. Observações sobre o mosaico comum e o mosaico das nervuras da mandioca (*Manihot utilissima* Pohl.). **Jornal de Agronomia**, Piracicaba, SP, v. 3, p. 239–248, 1940.

CUERVO, M. Caracterización de los ácidos nucleicos de doble cadena asociados a enfermedades similares a las ocasionadas por virus en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). **Fitopatol. Colomb**, Bogotá, v. 14, p. 10–17, 1990.

FERREIRA, C. F. *et al.* Rapid plant DNA and RNA extraction protocol using a bench drill. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 1–8, 2019. ISSN 1676-5680. DOI 10.4238/gmr18394.

FERRIOL, I. *et al.* The Torradovirus -specific RNA2-ORF1 protein is necessary for plant

systemic infection. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 19, n. 6, p. 1319–1331, 2018. ISSN 1464-6722. DOI 10.1111/mpp.12615.

FREITAS-ASTÚA, J. *et al.* ICTV Proposal 2019.031M.A.v1: Split the genus *Nucleorhabdovirus*, creating three new genera (*Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, and *Gammanucleorhabdovirus*), comprising sixteen species, including six new species, in the family *Rhabdoviridae*. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**, 2019.

GAO, D. M. *et al.* A plant cytorhabdovirus modulates locomotor activity of insect vectors to enhance virus transmission. **Nature Communications**, London, v. 14, n. 1, p. 5754, 2023. ISSN 2041-1723. DOI 10.1038/s41467-023-41503-3.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; and GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010. ISSN 1076-836X. DOI 10.1093/sysbio/syq010.

HU, X. *et al.* PhytoPipe: a phytosanitary pipeline for plant pathogen detection and diagnosis using RNA-seq data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 24, n. 1, p. 470, 2023a. ISSN 1471-2105. DOI 10.1186/s12859-023-05589-2.

HU, J. *et al.* Identification, molecular characterization and phylogenetic analysis of a novel nucleorhabdovirus infecting *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Scientific Reports**, London, v. 13, n. 1, p. 10040, 2023b. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-023-37022-2.

HULL, R.; SADLER, J.; and LONGSTAFF, M. The sequence of carnation etched ring virus DNA: comparison with cauliflower mosaic virus and retroviruses. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 5, n. 12, p. 3083–3090, 1986. ISSN 0261-4189. DOI 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04614.x.

HUSON, D. H. *et al.*; POISOT, Timothée (ed.). MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. **PLOS Computational Biology**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. e1004957, 2016. ISSN 1553-7358. DOI 10.1371/journal.pcbi.1004957.

KATOH, K.; and STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. ISSN 0737-4038. DOI 10.1093/molbev/mst010.

KITAJIMA, E. W.; and COSTA, A. S. Rhabdovirus-like particles in tissues of five different plant species. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 55–62, 1979.

KOCHKO, A.; VERDAGUER, B.; TAYLOR, N.; CARCAMO, R.; BEACHY, R. N.; and FAUQUET, C. Cassava vein mosaic virus (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses? **Archives of Virology**, Berlin, v. 143, n. 5, p. 945–62, 1998. ISSN 0304-8608. DOI 10.1007/s007050050344.

KWIBUKA, Y. *et al.* Novel ampeloviruses infecting cassava in central africa and the south-west indian ocean islands. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 6, p. 1030, 2021. ISSN 1999-4915. DOI 10.3390/V13061030/S1.

- LEGG, J. P. *et al.* Cassava Virus Diseases: Biology, Epidemiology, and Management. **Advances in Virus Research**, Amsterdã, v. 91, n. 1, p. 85–142, 2015. ISSN 0065-3527. DOI 10.1016/BS.AIVIR.2014.10.001.
- LENNON, A. M.; AITON, M. M.; and HARRISON, B. D. **Cassava Viruses from Africa**. SCRI, Dundee, UK: SCRI, 1986. 168–169 p.
- LETUNIC, I.; and BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 47, n. W1, p. W256–W259, 2019. ISSN 0305-1048. DOI 10.1093/nar/gkz239.
- LI, D.; LIU, C. M.; LUO, R.; SADAKANE, K.; and LAM, T. W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 2015. ISSN 1367-4811. DOI 10.1093/bioinformatics/btv033.
- LI, S.; CUI, Y.; ZHOU, Y.; LUO, Z.; LIU, J.; and ZHAO, M. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 97, n. 8, p. 2282–2290, 2017. ISSN 0022-5142. DOI 10.1002/jsfa.8287.
- MEDBERRY, S. L.; LOCKHART, B. E. L.; and OLSZEWSKI, N. E. Properties of Commelina yellow mottle virus's complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 18, p. 5505–5513, 1990. ISSN 0305-1048. DOI 10.1093/nar/18.18.5505.
- MENZEL, P.; NG, K. L.; and KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, London, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2016. ISSN 2041-1723. DOI 10.1038/ncomms11257.
- MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; and MARTIN, D. P.; KUHN, Jens H. (ed.). SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e108277, 2014. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0108277.
- NOLT, B. L.; PINEDA L., B.; and VELASCO, A. C. Surveys of cassava plantations in Colombia for virus and virus-like diseases. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 41, n. 3, p. 348–354, 1992. ISSN 0032-0862. DOI 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02357.x.
- OLIVEIRA, S. A. S.; FERREIRA, C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; SANTOS, T. A.; PEREIRA, J. S.; and OLIVEIRA, E. J. DE. First report of cassava torrado-like virus, cassava polero-like virus and cassava new alphaflexivirus associated with cassava frogskin disease in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 102, n. 1, p. 247, 2020. ISSN 2239-7264. DOI 10.1007/S42161-019-00384-6/METRICS.
- PARDO, J. M.; ALVAREZ, E.; BECERRA LOPEZ-LAVALLE, L. A.; OLAYA, C.; LEIVA, A. M.; and CUELLAR, W. J. Cassava Frogskin Disease: Current Knowledge on a Re-Emerging Disease in the Americas. **Plants**, Basel, v. 11, n. 14, p. 1841, 2022. ISSN 2223-7747. DOI 10.3390/PLANTS11141841/S1.
- PINEDA, B.; JAYASINGHE, U.; MORALES, F.; and LOZANO, J. C. Partículas similares a virus asociadas con la enfermedad “Cuero de Sapo” en Yuca. *In*: 1980, Medellín, Colombia.

In Proceedings of the IV National Congress of the Colombian Phytopathology Association (ASCOLFI). Medellín, Colombia: [s. n.], 1980. p. 2–5.

PINEDA, B.; LOZANO, J. C.; JAYASINGHE, U.; and UPALI, W. **El mosaico caribeño de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz).** [S. l.: s. n.], 1982. 6 p.

PINEDA, B. L.; JAYASINGHE, W. U.; and LOZANO, J. C. La enfermedad cuero de sapo en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). **ASIAVA**, Colombia, v. 4, p. 10–12, 1983.

PRATOR, C. A.; KASHIWAGI, C. M.; VONČINA, D.; and ALMEIDA, R. P. P. Infection and Colonization of *Nicotiana benthamiana* by Grapevine leafroll-associated virus 3. **Virology**, Amsterdã, v. 510, p. 60–66, 2017. ISSN 0042-6822. DOI 10.1016/j.virol.2017.07.003.

REDDY, P. P. Cassava, *Manihot esculenta*. In: **Plant Protection in Tropical Root and Tuber Crops**. India: Springer, 2015. p. 17–81. ISBN 9788132223894. DOI 10.1007/978-81-322-2389-4.

SOUZA, A. N.; SILVA, F. N.; BEDENDO, I. P.; and CARVALHO, C. M. A Phytoplasma Belonging to a 16SrIII-A Subgroup and dsRNA Virus Associated with Cassava Frogskin Disease in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 6, p. 771–779, 2014. ISSN 0191-2917. DOI 10.1094/PDIS-04-13-0440-RE.

SPRINZL, M.; HARTMANN, T.; MEISSNER, F.; MOLL, J.; and VORDERWULBECKE, T. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 15, n. suppl, p. r53–r188, 1987. ISSN 0305-1048. DOI 10.1093/nar/15.suppl.r53.

TAMURA, K.; STECHER, G.; and KUMAR, S.; BATTISTUZZI, Fabia Ursula (ed.). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021. ISSN 1537-1719. DOI 10.1093/molbev/msab120.

WINTER, S.; MBEWE, W.; ALBUQUERQUE, G. R.; BLAWID, R.; and MARGARIA, P. **Cassava ampelovirus 1 isolate Brazil_20, partial genome**. [S. l.: s. n.], 2021. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW929100.1>. Accessed: 4 may 2024.

YILMAZ, P. *et al.* The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 42, n. D1, p. D643–D648, 2014. ISSN 0305-1048. DOI 10.1093/nar/gkt1209.

CAPÍTULO III

Conclusões Gerais

CAPÍTULO 3: CONCLUSÕES GERAIS

1. Foram montadas sequências genômicas de duas novas espécies virais pertencendo aos gêneros *Ampelovirus* e *Alphanucleorabdovirus*;
2. Os resultados da RT-PCR mostram que todas as amostras assintomáticas de raiz havia presença de CsTLV 1, o novo ampelovírus e o novo rhabdovírus;
3. A amplificação de sequências do novo ampelovírus 1 em todas as amostras sintomáticas na raiz sugere que ele possa estar associado com o sintoma observado na raiz, seja sozinho ou em sinergismo com os demais vírus testados.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



SUPPLEMENTARY MATERIAL I

Table 1: Cassava accessions and symptomatology.

Registration	Registration EMBRAPA	From	Foliar Symptom	Tuberous Root Symptom
Cassava PL 1	BR-21GS-C3-130-8	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 2	BR-21GS-C3-096-14	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 3	BR-21GS-C3-149-15	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 4	BR-21GS-C3-059-85	Bahia	Bunching of shoots	Asymptomatic
Cassava PL 5	BR-21GS-C3-059-47	Bahia	Bunching of shoots	Asymptomatic
Cassava PL 6	BR-21GS-C3-155-4	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 7	BR-21GS-C3-131-4	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 8	BR-21GS-C3-130-3	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 9	BR-21GS-C3-292-12	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 10	BR-21GS-C3-253-10	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 11	BR-21GS-C3-251-6	Bahia	Mosaic	Asymptomatic
Cassava PL 12	BR-21GS-C3-148-7	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 13	BR-21GS-C3-156-2	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 14	BR-21GS-C3-253-61	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 15	BR-21GS-C3-059-87	Bahia	Bunching of shoots	Asymptomatic
Cassava PL 16	BGM-0395	Bahia	Not observed	Not observed
Cassava PL 17	BR-21GS-C3-096-6	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 18	BR-21GS-C3-289-11	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 19	BR-21GS-C3-059-88	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 20	BR-21GS-C3-096-5	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 21	BR-21GS-C3-151-5	Bahia	Asymptomatic	Asymptomatic
Cassava PL 22	BR-21GS-C3-130-17	Bahia	Mosaic	Asymptomatic
Cassava PL 23	BGM-1634	Bahia	Mosaic	Asymptomatic
Cassava PL 24	BGM-1618	Bahia	Mosaic	CFSD
Cassava PL 25	BGM-0929	Bahia	Vein mosaic	CFSD
Cassava PL 26	BGM-1325	Bahia	Mosaic	Not observed
Cassava PL 27	BGM-1275	Bahia	Mosaic	CFSD
Cassava PL 28	BGM-0018	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 29	BGM-1655	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 30	BGM-0873	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 31	BRS-Mulatinha	Bahia	Mosaic	Not observed
Cassava PL 32	BGM-1609	Bahia	Asymptomatic	Not observed

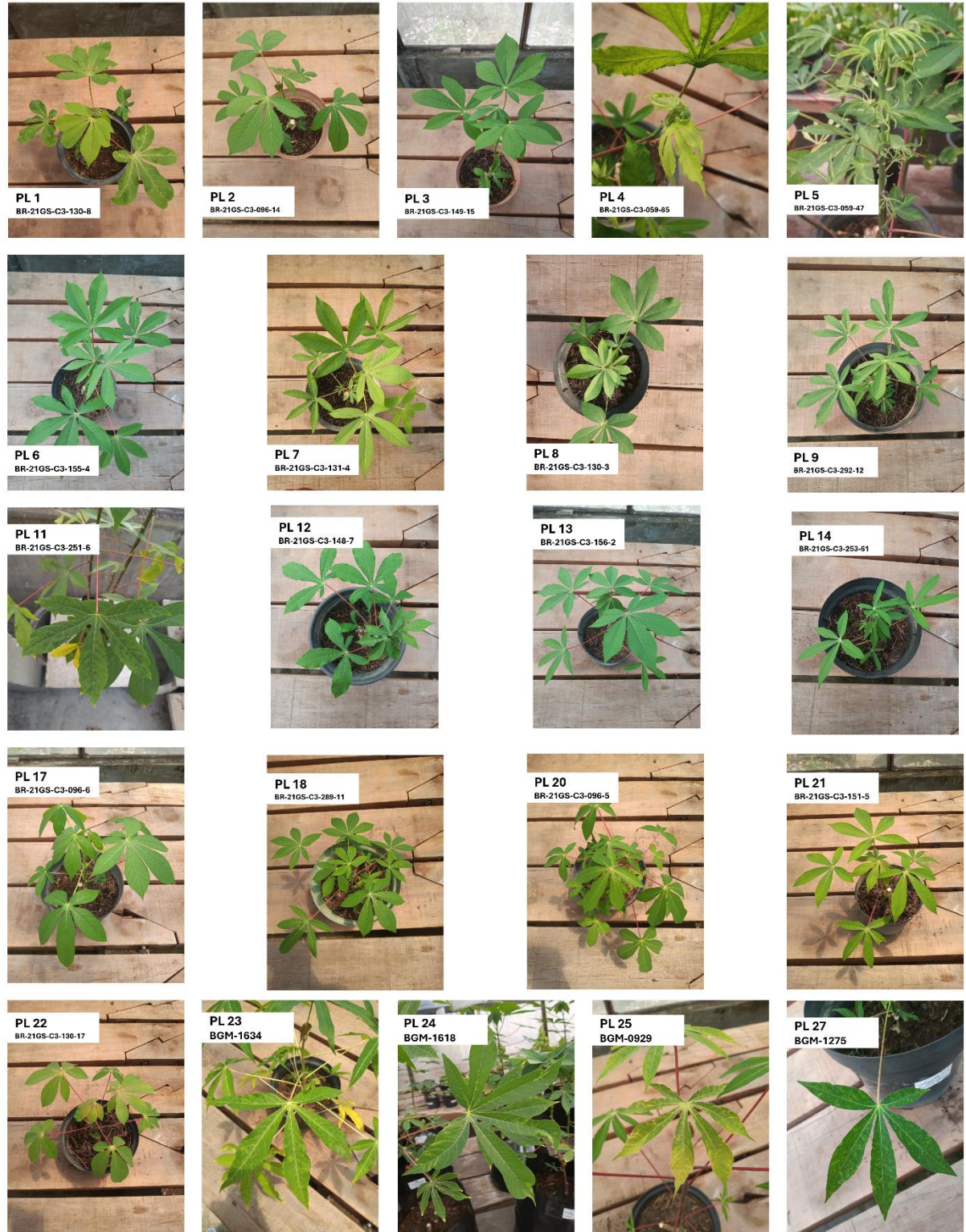
Cassava PL 33	BGM-1331	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 34	BGM-2200	Bahia	Mosaic	CFSD
Cassava PL 35	BGM-1294	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 36	BGM-2050	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 37	BGM-1880	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 38	BGM-1124	Bahia	Vein mosaic	CFSD
Cassava PL 39	BR-11S1-52-10	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 40	BGM-0022	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 41	BGM-0641	Bahia	Mosaic	Not observed
Cassava PL 42	BGM-2346	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 43	BGM-1193	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 44	BGM-0037	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 45	BGM-2352	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 46	BGM-1300	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 47	BGM-1773	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 48	BGM-1108	Bahia	Asymptomatic	Not observed
Cassava PL 49	IPR Paraguinha	Paraná	Mosaic, rugosity	Not observed
Cassava PL 50	GS-20-106-12	Bahia	Asymptomatic	Not observed

SUPPLEMENTARY MATERIAL II

Table 2: Virus detected in HTS.[illegible]

SUPPLEMENTARY MATERIAL III

Fig. 1. Symptoms observed in plant accessions from Embrapa Cassava and Fruits sent to DSMZ for High-Throughput Sequencing.



SUPPLEMENTARY MATERIAL IV

Table 3: Accession numbers and abbreviations for selected viruses of the *Closteroviridae* family used in the phylogenetic reconstruction of the amino acid sequences.

Genus	Virus Name	Acronym	Nucleotide genome RefSeq	Protein HSP70 region	Protein CP region	Protein RdRp region	Protein ORF1a region
<i>Ampelovirus</i>	Air potato virus 1	AiPoV-1	NC_055177	YP_010085055	YP_010085057	YP_010085053	YP_010085052
	Blackberry vein banding-associated virus	BVBaV	NC_022072	YP_008411013	YP_008411015	YP_008411010	YP_008411009
	<i>Manihot esculenta</i> associated ampelovirus 1	MEaV-1	MW929100	QYB23657	QYB23659	QYB23658	QYB23655
	<i>Manihot esculenta</i> associated ampelovirus 2	MEaV-2	MT773591	QWK51501	QWK51503	QWK51499	QWK51498
	Grapevine leafroll-associated virus 1	GLRaV-1	NC_016509	YP_004940644	YP_004940646	YP_004940642	YP_004940641
	Grapevine leafroll-associated virus 3	GLRaV-3	NC_004667	NP_813799	NP_813801	NP_813795	NP_813795
	Grapevine leafroll-associated virus 4	GLRaV-4	NC_016416	YP_004935371	YP_004935373	YP_004935369	YP_004935369
	Grapevine leafroll-associated virus 5	GLRaV-5	NC_016081	YP_004901689	YP_004901691	YP_004901687	YP_004901686
	Grapevine leafroll-associated virus 6	GLRaV-6	NC_016417	YP_004935377	YP_004935379	YP_004935375	YP_004935375
	Grapevine leafroll-associated virus 9	GLRaV-9	AY297819	AAQ63810	AAQ63812	AAQ63807	AAQ63806
	Grapevine leafroll-associated virus 10	GLRaV-10	NC_011702	YP_002364305	YP_002364307	YP_002364303	YP_002364302
	Grapevine leafroll-associated virus 13	GLRaV-13	NC_029783	YP_009241368	YP_009241370	YP_009241367	YP_009241366
	Little cherry virus 2	LChV-2	NC_005065	NP_891567	NP_891570	NP_891562	NP_891562
	Pineapple mealybug wilt-associated virus 1	PMWaV-1	NC_010178	YP_001642339	YP_001642341	YP_001642337	YP_001642336
	Pineapple mealybug wilt-associated virus 2	PMWaV-2	NC_043105	YP_009664796	YP_009664798	YP_009664794	YP_009664793
	Pineapple mealybug wilt-associated virus 3	PMWaV-3	NC_043406	YP_009666005	YP_009666007	YP_009666003	YP_009666002
	Pistachio ampelovirus A	PAVA	NC_055482	YP_010086802	YP_010086804	YP_010086800	YP_010086799
	Plum bark necrosis stem pitting-associated virus	PBNSPaV	NC_009992	YP_001552326	YP_001552328	YP_001552324	YP_001552323
	Yam asymptomatic virus 1	YaV1	NC_076495	YP_010798584	YP_010798587	YP_010798581	YP_010798580
<i>Bluvavirus</i>	Blueberry virus A	BVA	NC_018519	YP_006628170	YP_006628172	YP_006638806	YP_006628168
<i>Closterovirus</i>	Arracacha virus 1	AV-1	NC_040570	YP_009551996	YP_009551999	YP_009551994	YP_009551993
	Beet yellow stunt virus	BYSV	NC_043106	YP_009664807	YP_009664810	YP_009664804	YP_009664803
	Blackcurrant leafroll-associated virus 1	BCLRaV-1	NC_040840	YP_009553662	YP_009553664	YP_009553246	YP_009553246
	Carrot closterovirus 1	CCV-1	KF533697	AHA85412	AHA85414	AHA85410	AHA85409
	Carrot yellow leaf virus	CYLV	NC_013007	YP_003075968	YP_003075970	YP_003075965	YP_003075964
	Citrus tristeza Virus	CTV	NC_001661	NP_042864	NP_042867	NP_733947	NP_733947
	Grapevine leafroll-associated virus 2	GLRaV-2	NC_007448	YP_337914	YP_337917	YP_337912	YP_337911
	Grapevine rootstock stem lesion associated virus	GRSLaV	NC_004724	NP_835247	NP_835250	NP_835244	NP_835244
	Mint virus 1	MV-1	NC_006944	YP_224093	YP_224096	YP_224091	YP_224090
	Raspberry leaf mottle virus	RLMV	NC_008585	YP_874188	YP_874191	YP_874185	YP_874184
	Rehmannia virus 1	ReV-1	NC_040572	YP_009552006	YP_009552008	YP_009552003	YP_009552004
	Rose leaf rosette-associated virus	RLRaV	NC_024906	YP_009058932	YP_009058935	YP_009058929	YP_009059065
	Strawberry chlorotic fleck associated virus	SCFaV	NC_008366	YP_762625	YP_762628	YP_762622	YP_762621
	Tobacco virus 1	ToV-1	NC_027712	YP_009162624	YP_009162627	YP_009162622	YP_009162621
	Bean yellow disorder virus	BnYDV	NC_010561	YP_001816775	YP_001816779	YP_001816770	YP_001816769

	Beet pseudo-yellows virus	BPYV	NC_005210	NP_940788	NP_940792	NP_940796	NP_940795
	Blackberry yellow vein-associated virus	BYVbV	NC_006963	YP_227360	YP_227364	YP_227378	YP_227357
	Cucurbit chlorotic yellows virus	CCYV	NC_018173	YP_006522427	YP_006522431	YP_006522442	YP_006522441
	Cucurbit yellow stunting disorder virus	CYSDV	NC_004810	NP_851572	NP_851576	NP_851566	NP_851566
	Diodia vein chlorosis virus	DVCV	NC_038787	YP_009507953	YP_009507957	YP_009507950	YP_009507951
	Lettuce chlorosis virus	LCV	NC_012910	YP_003002358	YP_003002362	YP_003002352	YP_003002353
Crinivirus	Lettuce infectious yellows virus	LIYV	NC_003618	NP_619695	NP_619697	NP_619692	NP_619692
	Potato yellow vein virus	PYVV	NC_006063	YP_054417	YP_054421	YP_829128	YP_054415
	Strawberry pallidosis-associated virus	SpaV	NC_005896	YP_025085	YP_025089	YP_003289291	YP_025098
	Sweet potato chlorotic stunt virus	SPCSV	NC_004124	NP_689401	NP_689404	NP_733939	NP_733941
	Tetterwort vein chlorosis virus	TEVCVO	NC_038789	YP_009507966	YP_009507970	YP_009507961	YP_009507960
	Tomato chlorosis virus	ToCV	NC_007341	YP_293699	YP_293703	YP_293695	YP_293694
	Tomato infectious chlorosis virus	TICV	NC_013259	YP_003204956	YP_003204960	YP_003204952	YP_003204953
Menthavirus	Mint vein banding-associated virus	MVBaV	NC_038420	YP_009506338	YP_009506340	YP_009506336	YP_009506335
	<i>Actinidia virus 1</i>	AcV-1	NC_035453	YP_009407923	YP_009407926	YP_009407919	YP_009407918
Olivavirus	Olive leaf yellowing-associated virus	OLYaV	NC_043417	YP_009666030	UXN85457	YP_009666027	UXN85451
	Persimmon virus B	PeBV	NC_025967	YP_009112885	YP_009112888	YP_009112883	YP_009112894
	Areca palm velarivirus 1	APV-1	NC_027121	YP_009140434	YP_009140437	YP_009140432	YP_009140431
	Cordyline virus 1	CoV-1	NC_038421	YP_009506346	YP_009506349	YP_009506344	YP_009506343
	Cordyline virus 2	CoV-2	NC_043453	YP_009666140	YP_009666143	YP_009666138	YP_009666137
Velarivirus	Cordyline virus 3	Cov-3	NC_043107	YP_009664816	YP_009664819	YP_009664814	YP_009664813
	Cordyline virus 4	CoV-4	NC_043108	YP_009664825	YP_009664829	YP_009664824	YP_009664823
	Grapevine leafroll-associated virus 7	GLRaV-7	NC_016436	YP_004935921	YP_004935924	YP_004935919	YP_004935918
	Little cherry virus 1	LChV-1	NC_001836	NP_045004	NP_045006	NP_045001	NP_045001
	Malus domestica virus A	MdoVA	NC_055599	YP_010087860	YP_010087863	YP_010087858	YP_010087857
Outgroup	<i>Arabidopsis thaliana</i>			AEE75218			

In red the coding region sequence is partial.

In yellow the RdRp sequence (ORF1b) was not separated from ORF1a, thus the same accession code for both proteins.

SUPPLEMENTARY MATERIAL V

Table 4: SDT percentage amino acid sequence identity between ORF1a encoded proteins by ampeloviruses.

>YP_010085052_AiPoV1	100.000
>YP_001552323_PBNSPaV	31.000 100.000
YP_004901686_GLRaV5	30.000 27.800 100.000
YP_004935375_GLRaV6	29.400 28.000 89.800 100.000
YP_004935369_GLRaV4	31.000 27.200 73.400 72.400 100.000
AAQ63806_GLRaV9	28.600 28.600 71.700 71.100 64.200 100.000
YP_002364302_GLRaV10	29.400 28.400 58.000 56.400 61.400 56.400 100.000
YP_001642336_PMWaV1	26.100 27.800 36.400 35.900 35.300 36.500 36.700 100.000
YP_009666002_PMWaV3	28.500 28.800 35.400 35.500 35.400 34.700 36.200 46.300 100.000
QYB23655_MEaV1	28.400 29.700 31.000 29.500 30.300 28.700 30.900 28.800 31.400 100.000
QWK51498_MEaV2	28.400 28.200 30.900 30.200 30.300 31.600 31.300 30.800 30.800 50.900 100.000
Novel ampelo - 7G_Brazil-5	28.400 26.800 29.500 29.200 29.000 29.100 28.400 30.500 30.600 29.200 30.000 100.000
YP_004940641_GLRaV1	26.600 24.500 27.100 27.300 26.600 26.300 27.700 26.800 25.400 26.100 24.900 26.400 100.000
YP_009241366_GLRaV13	25.600 24.800 27.200 26.900 25.200 24.800 27.200 23.800 26.300 25.100 24.400 25.500 34.700 100.000
YP_008411009_BVBaV	26.600 27.300 27.800 27.600 29.100 27.300 27.500 26.000 26.500 25.900 26.100 27.500 33.800 32.000 100.000
NP_813795_GLRaV3	26.500 25.400 26.800 28.400 29.000 27.700 27.900 25.000 25.800 26.400 26.400 26.100 33.600 32.800 46.300 100.000
YP_009664793_PMWaV2	27.300 26.100 25.700 25.500 25.900 24.700 28.200 24.500 27.400 25.100 24.900 26.200 32.700 32.300 35.400 37.000 100.000
YP_010086799_PAVA	27.500 26.100 26.300 27.800 26.300 26.900 26.600 27.100 24.000 26.300 27.100 27.100 32.000 31.300 30.000 31.800 27.400 100.000
NP_891562_LChv2	24.900 26.900 29.300 30.200 28.800 27.600 26.800 26.500 25.500 25.700 27.200 25.000 30.600 29.900 30.500 32.200 30.500 33.600 100.000
YP_010798580_YaV1	27.300 24.700 27.000 28.500 27.300 27.200 26.700 26.100 24.600 26.400 27.500 27.600 29.000 29.600 29.700 29.100 26.900 31.800 49.600 100.000
	YP_010085052_AiPoV1 YP_001552323_PBNSPaV YP_004901686_GLRaV5 YP_004935375_GLRaV6 YP_004935369_GLRaV4 AAQ63806_GLRaV9 YP_002364302_GLRaV10 YP_001642336_PMWaV1 YP_009666002_PMWaV3 QYB23655_MEaV1 QWK51498_MEaV2 Novel ampelo - 7G_Brazil-5 YP_004940641_GLRaV1 YP_009241366_GLRaV13 YP_008411009_BVBaV NP_813795_GLRaV3 YP_009664793_PMWaV2 YP_010086799_PAVA NP_891562_LChv2 YP_010798580_YaV1

Table 5: SDT percentage amino acid sequence identity between RdRp encoded proteins by ampeloviruses.

AAQ63807 GLRaV9	100.000																			
YP 004901687 GLRaV5	90.400	100.000																		
YP 004935375 GLRaV6	89.100	89.200	100.000																	
YP 002364303 GLRaV10	83.300	82.100	84.700	100.000																
YP 004935369 GLRaV4	84.600	85.700	72.400	81.600	100.000															
YP 009666003 PMWaV3	58.400	56.700	59.000	57.700	58.100	100.000														
YP 001642337 PMWaV1	58.800	57.900	58.300	57.700	59.800	71.200	100.000													
QWK51499 MEaV2	45.300	44.500	43.800	42.400	43.200	40.800	42.200	100.000												
QYB23658 MEaV1	44.600	43.500	43.300	43.000	44.200	40.000	42.800	68.100	100.000											
Novel ampelo - 7G_Brazil-5	43.800	43.000	44.700	42.500	41.200	40.700	41.600	47.400	45.700	100.000										
YP 010085053 AiPoV1	40.900	40.000	40.000	39.200	39.900	37.100	36.300	40.000	42.400	47.800	100.000									
YP 001552324 PBNSPaV	42.200	42.000	42.500	39.500	42.500	37.700	38.200	37.800	40.800	47.000	46.500	100.000								
YP 004940642 GLRaV1	32.500	34.800	35.200	35.100	35.400	32.800	32.200	33.500	36.600	35.300	37.300	34.500	100.000							
YP 009241367 GLRaV13	30.700	34.000	34.400	32.600	33.000	31.800	31.700	36.100	36.300	36.200	35.700	35.000	51.600	100.000						
NP 813795 GLRaV3	33.200	34.700	28.400	33.100	29.000	34.000	34.100	36.900	37.100	35.100	37.100	37.500	52.200	48.400	100.000					
YP 008411010 BVBaV	33.200	34.500	35.900	35.800	38.500	34.200	34.500	35.100	36.700	35.900	35.600	36.000	51.200	49.000	65.900	100.000				
YP 009664794 PMWaV2	34.100	34.100	36.100	34.500	36.600	34.200	31.800	36.100	36.000	34.200	36.600	36.200	50.200	47.300	52.100	49.400	100.000			
NP 891562 LChV2	37.800	37.800	30.200	35.500	28.800	34.800	34.500	35.000	36.300	37.100	38.600	36.800	38.100	39.200	32.200	40.000	36.700	100.000		
YP 010798581 YaV1	37.500	37.600	35.700	35.500	38.700	38.400	38.400	37.100	36.200	35.900	38.700	34.800	37.500	38.500	37.500	40.200	38.300	70.200	100.000	
YP 010086800 PAVA	38.500	37.600	38.800	36.200	38.300	35.000	36.100	36.800	37.700	39.600	37.900	37.400	43.200	40.000	42.100	44.300	43.500	44.800	46.300	100.000
	AAQ63807 GLRaV9	YP 004901687 GLRaV5	YP 004935375 GLRaV6	Novel ampelo 7G_Brazil5	YP 004935369 GLRaV4	YP 009666003 PMWaV3	YP 001642337 PMWaV1	QWK51499 MEaV2	QYB23658 MEaV1	Novel ampelo - 7G_Brazil-5	YP 010085053 AiPoV1	YP 001552324 PBNSPaV	YP 004940642 GLRaV1	YP 009241367 GLRaV13	NP 813795 GLRaV3	YP 008411010 BVBaV	YP 009664794 PMWaV2	NP 891562 LChV2	YP 010798581 YaV1	YP 010086800 PAVA

Table 6: SDT percentage amino acid sequence identity between HSP70h encoded proteins by ampeloviruses.

YP 010798584 YaV1	100.000																				
YP 008411013 BVBaV	36.200	100.000																			
NP 813799 GLRaV3	35.300	56.000	100.000																		
YP 009664796 PMWaV2	33.900	48.800	47.600	100.000																	
YP 004940644 GLRaV1	36.000	41.400	41.000	40.600	100.000																
YP 010086802 PAVA	38.400	39.300	41.400	38.000	42.700	100.000															
YP 009241368 GLRaV13	35.300	41.400	38.100	38.200	42.300	38.800	100.000														
YP 010085055 AiPoV1	33.700	33.100	33.800	30.700	34.000	35.000	36.300	100.000													
YP 001552326 PBNSPaV	34.000	36.500	32.500	33.000	33.100	34.500	35.100	48.600	100.000												
YP 004935371 GLRaV4	33.100	35.900	34.700	35.200	33.300	33.900	36.000	43.900	44.800	100.000											
YP 004901689 GLRaV5	31.200	34.700	35.200	35.900	34.000	32.200	36.100	44.500	43.900	82.000	100.000										
AAQ63810 GLRaV9	31.300	34.900	35.300	38.100	32.900	31.800	36.300	43.500	43.700	82.000	89.900	100.000									
YP 004935377 GLRaV6	30.400	34.500	34.000	37.300	34.100	31.700	35.900	44.200	43.500	78.200	85.000	84.100	100.000								
YP 002364305 GLRaV10	30.700	35.600	35.000	36.700	34.500	32.000	35.400	46.300	42.500	77.700	80.000	79.700	78.400	100.000							
YP 001642339 PMWaV1	31.600	34.000	37.100	34.500	32.700	30.400	34.900	44.000	44.100	59.900	59.300	60.500	58.900	60.900	100.000						
YP 009666005 PMWaV3	33.800	34.800	35.600	34.400	34.700	32.500	34.300	46.500	44.400	59.500	59.300	59.300	58.200	60.400	72.100	100.000					
QYB23657 MEaV1	33.300	32.500	34.600	34.300	32.400	33.900	33.000	46.800	46.300	50.000	52.600	50.500	52.100	50.400	49.100	49.800	100.000				
QWK51501 MEaV2	37.800	34.800	37.100	35.100	33.700	36.300	34.800	46.400	48.000	51.900	51.900	50.800	52.600	51.500	49.700	51.900	69.500	100.000			
Novel ampelo - 7G_Brazil-5	35.200	34.000	34.000	35.700	34.500	34.200	35.900	46.500	47.800	47.000	49.000	47.500	47.500	46.900	46.800	48.200	48.400	49.100	100.000		
NP 045004 LChV2	32.900	32.500	32.600	31.200	31.600	29.900	28.400	29.500	30.200	29.300	29.400	29.800	28.900	27.500	26.900	28.800	28.700	28.400	28.800	100.000	
	YP 010798584 YaV1	YP 008411013 BVBaV	NP 813799 GLRaV3	YP 009664796 PMWaV2	YP 004940644 GLRaV1	YP 010086802 PAVA	YP 009241368 GLRaV13	YP 010085055 AiPoV1	YP 001552326 PBNSPaV	YP 004935371 GLRaV4	YP 004901689 GLRaV5	AAQ63810 GLRaV9	YP 004935377 GLRaV6	YP 002364305 GLRaV10	YP 001642339 PMWaV1	YP 009666005 PMWaV3	QYB23657 MEaV1	QWK51501 MEaV2	Novel ampelo - 7G_Brazil-5	NP 045004 LChV2	

Table 7: SDT percentage amino acid sequence identity between coat proteins (CP) encoded by ampeloviruses.

YP 008411005 BVbAV	100.000																				
NP 813800 GLRaV3	54.300	100.000																			
YP 009664798 PMWaV2	39.900	42.200	100.000																		
YP 004940646 GLRaV1	34.000	36.900	32.100	100.000																	
YP 000086804 PAVA	31.800	32.100	31.900	35.500	100.000																
YP 009241370 GLRaV13	34.200	33.200	33.600	34.300	35.100	100.000															
YP 000085057 AiPoV1	24.900	25.500	27.900	24.700	27.200	27.100	100.000														
YP 000552328 PBNSPaV	23.800	23.500	28.300	25.000	29.500	27.400	47.300	100.000													
YP 004935373 GLRaV4	27.200	31.900	25.700	27.200	27.100	24.500	36.900	40.900	100.000												
YP 004900691 GLRaV5	27.600	29.200	25.700	26.300	27.800	24.800	35.700	37.800	83.600	100.000											
AAQ63812 GLRaV9	28.300	30.600	27.700	27.800	26.900	27.600	36.400	39.500	84.600	87.700	100.000										
YP 004935379 GLRaV6	30.400	30.000	25.200	27.900	27.700	24.800	36.900	36.100	81.400	85.100	86.500	100.000									
YP 002364307 GLRaV10	31.400	33.300	28.200	24.700	29.300	24.500	35.300	34.800	79.800	81.400	78.700	75.800	100.000								
YP 000642341 PMWaV1	30.600	26.300	27.600	26.700	28.100	26.500	29.400	32.700	54.500	56.800	54.500	56.900	54.500	100.000							
YP 009666007 PMWaV3	28.300	28.600	25.600	24.500	29.500	27.300	38.100	36.400	65.300	68.000	65.500	65.600	63.000	63.200	100.000						
QYB23659 MEaV1	31.100	31.300	27.800	24.800	32.000	31.400	37.000	41.500	51.800	51.400	51.800	49.800	50.200	42.100	52.200	100.000					
QWK51503 MEaV2	28.500	30.000	27.400	25.900	27.000	27.400	38.200	35.400	49.800	54.400	57.000	53.600	50.000	46.400	53.200	79.400	100.000				
Novel ampelo - 7G_Brazil-5	29.700	33.200	30.800	25.400	29.900	25.500	34.400	33.500	40.800	40.000	42.200	39.800	43.000	34.400	38.800	40.800	37.300	100.000			
NP 891570 LChV2	26.500	25.900	23.900	26.300	25.200	27.200	24.300	21.900	24.000	26.200	27.200	23.600	24.100	23.200	22.300	26.000	24.600	25.400	100.000		
YP 000798587 YaV1	26.800	28.000	27.000	26.000	22.700	27.600	23.100	20.500	23.900	23.900	23.700	25.600	22.600	24.600	23.000	25.200	23.500	25.300	57.300	100.000	
	YP 008411005 BVbAV	NP 813800 GLRaV3	YP 009664798 PMWaV2	YP 004940646 GLRaV1	YP 000086804 PAVA	YP 009241370 GLRaV13	YP 000085057 AiPoV1	YP 000552328 PBNSPaV	YP 004935373 GLRaV4	YP 004900691 GLRaV5	AAQ63812 GLRaV9	YP 004935379 GLRaV6	YP 002364307 GLRaV10	YP 000642341 PMWaV1	YP 009666007 PMWaV3	QYB23659 MEaV1	QWK51503 MEaV2	Novel ampelo - 7G_Brazil-5	NP 891570 LChV2	YP 000798587 YaV1	

SUPPLEMENTARY MATERIAL VI

Table 8: Accession numbers and abbreviations of selected rhabdoviruses used for the phylogenetic reconstruction of nucleotide sequences.

Genus	Virus Name	Acronym	Acc. Numbers
<i>Alphanucleorhabdovirus</i>	agave tequilana virus 1	ATV1	NC_076970
	artemisia capillaris nucleorhabdovirus 1	ArtCaNV1	NC_077193
	taro vein chlorosis virus	TaVCV	NC_006942
	constricta yellow dwarf virus	CYDV	KY549567
	joa yellow blotch associated virus	JYBaV	NC_076913
	tomato alphanucleorhabdovirus 1	TARV1	OL472126
	maize mosaic virus	MMV	NC_005975
	eggplant mottled dwarf virus	EMDV	NC_025389
	morogoro maize-associated virus	MMaV	NC_055512
	rice yellow stunt virus	RYSV	NC_003746
	physostegia chlorotic mottle virus	PhCMoV	NC_055466
	peach virus 1	PeV1	NC_076448
	wheat yellow striate virus	WYSV	NC_055484
	potato yellow dwarf virus	PYDV	NC_016136
	xinjiang alphanucleorhabdovirus	XARV	MW897039
<i>Betanucleorhabdovirus</i>	maize Iranian mosaic virus	MIMV	NC_036390
	tomato betanucleorhabdovirus 1	TBRV1	OL472119
	asclepias syriaca virus 2	AscSyV2	NC_076972
	bacopa monnieri virus 2	BmV2	NC_076532
	tomato betanucleorhabdovirus 2	TBRV2	OL472114
	cardamom vein clearing virus	CdVCV	NC_076430
	cnidium virus 1	CnV1	NC_077151
	datura yellow vein virus	DYVV	NC_028231
	birds-foot trefoil-associated virus	BFTV	BK010826
	apple rootstock virus A	ApRVA	NC_076267
	alfalfa-associated nucleorhabdovirus	AaNV	NC_076024
	picris betanucleorhabdovirus 1	PBRV1	OL472117
	plectranthus aromaticus virus 1	PleArV1	NC_076973
	sonchus yellow net virus	SYNV	NC_001615
	rhododendron delavayi virus 1	RhoDeV1	NC_076974
<i>Gammanucleorhabdovirus</i>	blackcurrant-associated rhabdovirus	BCaRV	MF543022
	taraxacum betanucleorhabdovirus 1	TarBRV1	OL472118
	sowthistle yellow vein virus	SYVV	NC_076510
<i>Cytorhabdovirus</i>	zhuye pepper nucleorhabdovirus	ZPNRV	MH323437
	cereal chlorotic mottle virus	CCMoV	MW731536
	maize fine streak virus	MFSV	NC_005974
	cytorhabdovirus gramineae	NCMV	NC_002251
	lettuce necrotic yellows virus	LNyV	NC_007642
	lettuce yellow mottle virus	LYMoV	NC_011532
	persimmon virus A	PeVA	NC_018381
	alfalfa dwarf virus	ADV	NC_028237
	cytorhabdovirus hordei	BYSMV	NC_028244
	wuhan Insect virus 4	WuIV4	NC_031225
	wuhan Insect virus 5	WuIV5	NC_031227
	wuhan Insect virus 6	WuIV6	NC_031232
	tomato yellow mottle-associated virus	TYMaV	NC_034240
	colocasia bobone disease-associated virus	CBDaV	NC_034551
	rice stripe mosaic virus	RSMV	NC_040786
	maize yellow striate virus	MYSV	NC_055454
	cabbage cytorhabdovirus 1	CCyV1	NC_055479
	cytorhabdovirus caricae	PpVE	NC_055504
	yerba mate chlorosis-associated virus	YmCaV	NC_055505
	raspberry vein chlorosis virus	RVCV	NC_055529
	cytorhabdovirus fragariae	StrV1	NC_055567
	trichosanthes associated rhabdovirus 1	TrARV1	NC_076113
	cytorhabdovirus fragariarugosus	SCV	NC_076239
	trifolium pratense virus B	TpVB	NC_076289
	trifolium pratense virus A	TpVA	NC_076290
	yerba mate virus A	YmVA	NC_076472

	bacopa monnieri virus 1	BmV1	NC_076531
	paper mulberry mosaic associated virus	PMuMaV	NC_076864
	cucurbit cytorhabdovirus 1	CuCV1	NC_076898
	rose virus R	RVR	NC_076909
	chrysanthemum yellow dwarf virus	CYDaV	NC_076914
	bemisia tabaci-associated virus 1	BeTaV1	NC_076976
	gymnadenia densiflora virus 1	GymDenV1	NC_076978
	kenyan potato cytorhabdovirus	KePCyV	NC_077047
	actinidia cytorhabdovirus JS27	AcVD	NC_077105
<i>Dichorhavirus</i>	dichorhavirus orchidaceae RNA 2	OFV	NC_009609
	coffee ringspot virus RNA 2	CoRSV	NC_038755
	clerodendrum chlorotic spot virus RNA2	ClCSV	NC_043649
	citrus leprosis virus N RNA 2	CiLVN	NC_052231
	citrus chlorotic spot virus RNA 2	CiCSV	NC_055209
<i>Varicosavirus</i>	varicosavirus lactucae RNA 1	LBVaV	NC_011558
	morning glory varicosavirus RNA 1	MGVV	NC_079053
	zostera-associated varicosavirus 1 RNA 1	ZaVV1	NC_079126
	vitis varicosavirus RNA 2	VVV	NC_079129

SUPPLEMENTARY MATERIAL VII

Table 9: Accession numbers of cassava common mosaic virus sequences used in the SDT analysis.

Isolate	Country	Nucleotide (nt)	Protein (aa)				
		Genome	ORF1	TGB1	TGB2	TGB3	CP
Refseq	Brazil	NC_001658	NP_042695	NP_042696	NP_042697	NP_042698	NP_042699
JB017_ApX	USA	OM927720	UXW87888	UXW87889	UXW87890	UXW87891	UXW87892
BR	Brazil	MT279196	QTG40716	QTG40717	QTG40718	QTG40719	QTG40720
Hainan-CM	China	MW175326	QYL30857	QYL30858	QYL30859	QYL30860	QYL30861
LG	China	MT038420	QOD42276	QOD42277	QOD42278	QOD42279	QOD42280
Chinese	China	MN428639	QJS39010	QJS39011	QJS39012	QJS39013	QJS39014
Hainan-DZ	China	MN243731	QIA16090	QIA16091	QIA16092	QIA16093	QIA16094
Mcol22_1	Colombia	KT002435	ANC97804	QKG28050	QKG28051	QKG28052	QKG28053
Arg127_1	Argentina	KT002439	ANC97808	QKG28054	QKG28055	QKG28056	QKG28057

Table 10: SDT percentage nucleotide identity between ORF1 sequences from CsCMV isolates.

Arg127_1	100.001									
LG	89.201	100.001								
7E CsCMV	89.901	93.301	100.001							
JB017_ApX	89.501	93.701	96.001	100.001						
Hainan-CM	89.401	93.701	95.401	98.401	100.001					
BR	89.401	93.301	95.001	95.001	94.701	100.001				
Refseq	88.501	88.201	88.601	88.401	88.201	88.501	100.001			
Mcol22_1	88.901	88.801	88.901	88.801	88.501	88.801	98.501	100.001		
Hainan-DZ	88.701	88.601	88.401	88.301	88.201	88.701	90.101	90.401	100.001	
Chinese	88.701	88.601	88.401	88.301	88.201	88.701	90.401	90.701	98.901	100.001
	Arg127_1	LG	7E CsCMV	JB017_ApX	Hainan-CM	BR	Refseq	Mcol22_1	Hainan-DZ	Chinese

Table 11: SDT percentage amino acid identity between ORF1-encoded proteins from CsCMV isolates.

Arg127_1	100.000									
Hainan-DZ	97.200	100.000								
Chinese	97.500	99.700	100.000							
LG	96.500	97.000	97.300	100.000						
BR	96.900	98.100	98.300	97.700	100.000					
JB017_ApX	97.300	98.100	98.400	97.700	99.200	100.000				
Hainan-CM	97.400	98.100	98.400	97.900	99.100	99.400	100.000			
7E CsCMV	97.400	97.900	98.200	97.600	99.000	99.400	99.400	100.000		
Mcol22_1	96.800	97.800	98.100	96.300	97.500	97.600	97.600	97.600	100.000	
Refseq	95.700	96.600	96.900	95.200	96.400	96.500	96.500	96.500	98.100	100.000
	Arg127_1	Hainan-DZ	Chinese	LG	BR	JB017_ApX	Hainan-CM	7E CsCMV	Mcol22_1	Refseq

Table 15: SDT percentage amino acid identity between TGB2-encoded proteins from CsCMV isolates.

Arg127_1	100.000									
7E CsCMV	96.400	100.000								
Hainan-CM	95.500	97.300	100.000							
JB017_ApX	95.500	97.300	100.000	100.000						
LG	94.500	94.500	94.500	94.500	100.000					
BR	96.400	96.400	96.400	96.400	96.400	100.000				
Refseq	97.300	95.500	95.500	95.500	94.500	96.400	100.000			
Mcol22_1	95.500	94.500	94.500	94.500	93.600	95.500	98.200	100.000		
Hainan-DZ	95.500	95.500	94.500	94.500	93.600	95.500	96.400	95.500	100.000	
Chinese	94.500	94.500	94.500	94.500	94.500	96.400	96.400	95.500	99.100	100.000
	Arg127_1	7E CsCMV	Hainan-CM	JB017_ApX	LG	BR	Refseq	Mcol22_1	Hainan-DZ	Chinese

Table 16: SDT percentage nucleotide identity between TGB3 sequences from CsCMV isolates.

LG	100.000									
7E CsCMV	95.100	100.000								
Arg127_1	94.100	95.100	100.000							
BR	95.100	96.200	95.500	100.000						
Refseq	92.700	94.100	93.800	94.400	100.000					
Mcol22_1	92.700	94.100	93.800	94.400	99.300	100.000				
JB017_ApX	94.400	96.500	95.500	96.900	95.500	95.500	100.000			
Hainan-CM	94.800	96.200	95.100	96.500	96.200	96.500	99.000	100.000		
Hainan-DZ	93.800	94.800	94.100	94.400	93.400	93.800	93.400	94.400	100.000	
Chinese	94.100	94.400	93.800	94.800	93.800	94.100	94.400	95.500	99.000	100.000
	LG	7E CsCMV	Arg127_1	BR	Refseq	Mcol22_1	JB017_ApX	Hainan-CM	Hainan-DZ	Chinese

Table 17: SDT percentage amino acid identity between TGB3-encoded proteins from CsCMV isolates.

BR	100.000									
7E CsCMV	97.900	100.000								
LG	95.800	97.900	100.000							
Arg127_1	94.700	95.800	93.700	100.000						
JB017_ApX	96.800	98.900	96.800	96.800	100.000					
Hainan-CM	97.900	98.900	96.800	96.800	97.900	100.000				
Refseq	94.700	95.800	93.700	92.600	94.700	95.800	100.000			
Mcol22_1	94.700	95.800	93.700	93.700	94.700	96.800	98.900	100.000		
Hainan-DZ	91.600	92.600	90.500	90.500	91.600	93.700	90.500	91.600	100.000	
Chinese	91.600	92.600	90.500	90.500	91.600	93.700	90.500	91.600	100.000	100.000
	BR	7E CsCMV	LG	Arg127_1	JB017_ApX	Hainan-CM	Refseq	Mcol22_1	Hainan-DZ	Chinese

Table 18: SDT percentage nucleotide identity between CP sequences from CsCMV isolates.

Arg127_1	100.000									
LG	92.200	100.000								
Hainan-CM	89.900	93.300	100.000							
JB017_ApX	89.700	93.300	98.600	100.000						
7E CsCMV	90.000	93.900	96.500	96.700	100.000					
BR	90.600	92.800	93.900	93.600	94.300	100.000				
Chinese	89.700	88.400	89.000	88.400	89.700	89.100	100.000			
Hainan-DZ	89.700	88.600	89.100	88.600	89.600	89.300	98.700	100.000		
Mcol22_1	90.000	88.100	88.400	88.300	88.400	89.100	91.900	91.700	100.000	
Refseq	90.400	88.600	88.800	88.700	88.800	89.000	92.300	92.200	99.300	100.000
	Arg127_1	LG	Hainan-CM	JB017_ApX	7E CsCMV	BR	Chinese	Hainan-DZ	Mcol22_1	Refseq

Table 19: SDT percentage amino acid identity between CP-encoded proteins from CsCMV isolates.

Arg127_1	100.000									
Hainan-CM	96.900	100.000								
7E CsCMV	98.300	98.700	100.000							
LG	97.800	98.300	99.600	100.000						
BR	97.400	97.800	99.100	98.700	100.000					
JB017_ApX	97.400	97.800	99.100	98.700	98.300	100.000				
Refseq	98.300	98.300	98.300	97.800	97.400	97.400	100.000			
Mcol22_1	97.400	97.400	97.400	96.900	96.500	96.500	99.100	100.000		
Hainan-DZ	96.500	96.100	96.100	95.600	95.200	95.200	97.400	96.500	100.000	
Chinese	96.500	96.500	96.500	96.100	95.600	95.600	97.800	96.900	98.700	100.000
	Arg127_1	Hainan-CM	7E CsCMV	LG	BR	JB017_ApX	Refseq	Mcol22_1	Hainan-DZ	Chinese

SUPPLEMENTARY MATERIAL VIII

Table 20 – Primer design, characteristics and parameters.

Primer characteristics					
Parameter					
Product size, bp	500-900				
Primer length, bp	18–25 (optimal 20)				
T _m °C	57–63 (optimal 60)				
%GC	40–60 (optimal 50)				
GC clamp	3				
Max poly-X	4				
Max dimer T _m °C	40				
Max T _m difference °C	1				
Primer (5' – 3')	T _m (°C)	Virus	Size of RT-PCR products (bp)		
>primer-torrado1F TCCAGTGGATGAAATTGTGGGAC	57.3	CsTLV 1	593		
>torrado1-seq3R ATACTTCTTGGGAGTGCACGT	56.2				
>rhaddo-2333F ATGACACAGGAGACACTTCAAGG	56.7	nucleorhabdovirus	579		
>rhabdo-2912R CATGTATACCCCACTGCCTGTAA	56.4				
>ampelo1-12767R TCGTACATATTGTGAGGGTTAGA	52.9	ampelovirus 1	583		
>ampelo1-12184F AACAATGTGGTCCTAGATTGTC	53				
>ampelo3-11930F AAAAGTTTCGATCCCCAAGCTTG	56.1	ampelovirus 3	554		
>ampelo3-12484R ATGTTATGCAACCCACCACTACT	56.4				
Primer from literature (5'- 3')	T _m (°C)	Virus	Size of RT-PCR products (bp)	Reference	
>primer-torrado1-1F AATTTGTGAGTCAGCCAACGTG	56.2	CsTLV 2 RNA 1	2427	Albuquerque <i>et al.</i> , (2022) ⁱ	
>primer-torrado2R AGCATCCTGACAGCCAACCTAA	58.5				
>Primer-torrado-2-5 F TGATCATGATCTGGGCTCTGCG	59.2	CsTLV 2 RNA 2	1359		
>primer-torrado-2-6 R CCACAAGGCGCTAGTAATGT	55				

ⁱ ALBUQUERQUE, G. R.; BOARI, A. J.; OLIVEIRA, E. J.; MARGARIA, P.; WINTER, S.; and BLAWID, R. **Diversidade viral em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.** 2022. 122 p. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2022.