UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Caracterização do viroma associado ao ácaro rajado ubíquo, *Tetranychus urticae*

Anderson Gonçalves de Sousa

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

2024

Anderson Gonçalves de Sousa

Caracterização do viroma associado ao ácaro rajado ubíquo, *Tetranychus urticae*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

Orientador: Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

2024

S725 Sousa, Anderson Gonçalves de.
Caracterização do viroma associado ao ácaro rajado ubíquo, Tetranychus urticae / Anderson Gonçalves de Sousa. – Ilhéus, BA: UESC, 2024.
48f.: il.

Orientador: Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGGBM
Inclui referências.

1. Ácaro de plantas. 2. Ácaros rajados. 3. Vírus – Identificação. 4. Transcriptômica 5. Sequenciamento de nucleotídeo. 6. Bioinformática. I. Título.

CDD 595.42

Anderson Gonçalves de Sousa

Caracterização do viroma associado ao ácaro rajado ubíquo, *Tetranychus urticae*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

Dr Rodrigo Araújo Lima Rodrigues (UFMG)

Dr Gonçalo Santos da Silva (UESC)

Dr Marcio Costa (UESC)

Dr. Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar (UESC - Orientador)

SUMÁRIO

RESUMO

DE SOUSA, Anderson Gonçalves, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Maio de 2024. Caracterização do viroma associado ao ácaro rajado ubíquo, *Tetranychus urticae.* Orientador: Dr Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar.

As pragas agrícolas podem causar danos diretos nos plantios como clorose, perda de vigor, desfolhamento e murchamento. Adicionalmente, podem levar a danos indiretos, como a transmissão de microrganismos patogênicos ao se alimentar dos tecidos das plantas. Todos esses danos afetam diretamente a produtividade e a qualidade das lavouras interferindo na produção agrícola. Dentre as pragas conhecidas de artrópodes, destacam-se os ácaros como uma das mais comuns e importantes na agricultura global. Existem muitas famílias de ácaros associadas a agricultura, entre elas a família *Tetranychidae* destaca-se como umas das mais importantes e conhecidas mundialmente. Essa família compreende mais de 1.300 espécies que parasitam em torno de 4.069 gêneros de plantas, sendo o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* ou Koch, o principal parasita desta espécie, estando presente em diversos gêneros de plantas no Brasil e no mundo, reportado em mais de 1600 plantas hospedeiras. Diante do exposto, o estudo tem como objetivo caracterizar o viroma do ácaro *Tetranychus urticae*. Com a finalidade de sistematizar o conhecimento acerca do viroma do ácaro rajado, foi realizada uma análise de metatranscriptômica com base em dados de sequenciamento de RNA depositados em bancos de dados públicos, utilizando diversas ferramentas de bioinformática na plataforma *Galaxy*, afim de explorar a diversidade de microrganismos associados ao *T. urticae,* focando particularmente no seu viroma. Posteriormente, foi realizada uma revisão sistemática para reunir informações e fornecer uma visão geral sobre o potencial do ácaro em carrear vírus de plantas, bem como sua distribuição mundialmente, e seus mecanismos de ação no desenvolvimento e propagação de doenças agrícolas. Para isso, foi utilizado um protocolo previamente estabelecido com critérios de inclusão e exclusão para os estudos. A pesquisa foi realizada usando bases de dados (*PubMed, Scopus, Web of Science* e *Google school*), afim de obter estudos que respondessem as questões norteadoras da revisão. Com o uso do software StArt foram selecionados 132 artigos relacionados a string de pesquisa. Após a fase de seleção, e de extração, apenas 60 estudos de um total de 132 foram aceitos, e utilizados na fase de sumarização dos dados. Essa abordagem revelou 20 sequências virais, incluindo 11 relacionadas a novos vírus. Através de análise filogenética, oito dessas sequências foram classificadas nas famílias virais *Nodaviridae, Kitaviridae, Phenuiviridae, Rhabdoviridae, Birnaviridae e Qinviridae,* enquanto três foram caracterizadas apenas no nível de ordem dentro de Picornavirales e Reovirales. As nove sequências virais restantes mostraram alta similaridade no nível de nucleotídeos com espécies virais conhecidas, provavelmente representando novas cepas de vírus previamente caracterizados. Notavelmente, incluem o conhecido *Bean common mosaicvirus* (BCMV) e o *Phaseolus vulgaris alphaendornavirus 1*, ambos com impactos significativos na agricultura de feijão. No total, nossos resultados expandem o viroma associado ao ácaro-praga ubíquo T. urticae e destacam seu papel potencial como transmissor de patógenos virais importantes para as plantas. Nossos dados enfatizam a importância da vigilância contínua de vírus para ajudar na preparação para futuras ameaças emergentes.

Palavras-chave: ácaro rajado; identificação viral; metatranscriptômica; sequenciamento, bioinformática.

ABSTRACT

DE SOUSA, Anderson Gonçalves, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, May de 2024. Characterization of the virome associated to the ubiquous two- spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Advisor: Dr Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar.

Agricultural pests can cause direct damage to crops such as chlorosis, loss of vigor, defoliation, and wilting. Additionally, they can lead to indirect damage, such as the transmission of pathogenic microorganisms while feeding on plant tissues. All these damages directly affect the productivity and quality of crops, interfering with agricultural production. Among the known arthropod pests, mites stand out as one of the most common and important in global agriculture. There are many families of mites associated with agriculture, among them the *Tetranychidae* family stands out as one of the most important and well-known worldwide. This family comprises more than 1,300 species that parasitize around 4,069 genera of plants, with the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* or Koch being the main parasite of this species, being present in various plant genera in Brazil and worldwide, reported in more than 1600 host plants. In view of the above, the study aims to characterize the virome of the *Tetranychus urticae* mite. In order to systematize the knowledge about the virome of the two-spotted spider mite, a metatranscriptomic analysis was performed based on RNA sequencing data deposited in public databases, using various bioinformatics tools on the Galaxy platform, aiming to explore the diversity of microorganisms associated with *T. urticae*, particularly focusing on its virome. Subsequently, a systematic review was conducted to gather information and provide an overview of the potential of the mite to carry plant viruses, as well as its worldwide distribution, and its mechanisms of action in the development and spread of agricultural diseases. For this purpose, a previously established protocol with inclusion and exclusion criteria for the studies was used. The research was conducted using databases (PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar) in order to obtain studies that addressed the guiding questions of the review. Using the StArt software, 132 articles related to the search string were selected. After the selection and extraction phase, only 60 studies out of a total of 132 were accepted and used in the data summarization phase. This approach revealed 20 viral sequences, including 11 related to novel viruses. Through phylogenetic analysis, eight of these sequences were classified within the viral families *Nodaviridae*, *Kitaviridae*, *Phenuiviridae*, *Rhabdoviridae*, *Birnaviridae*, and *Qinviridae*, while three were characterized only at the order level within Picornavirales and Reovirales. The remaining nine viral sequences showed high nucleotide-level similarity to known viral species, likely representing new strains of previously characterized viruses. Notably, these include the well-known *Bean common mosaic virus* (BCMV) and *Phaseolus vulgaris alphaendornavirus 1*, both of which have significant impacts on bean agriculture. Overall, our findings expand the virome associated with the ubiquitous pest mite *T. urticae* and highlight its potential role as a vector of important plant viral pathogens. Our data emphasize the importance of continuous virus surveillance to aid in preparedness for future emerging threats.

Keywords: two-spotted spider mite; viral identification; metatranscriptomics; sequencing, bioinformatics.

1. INTRODUCÃO

Os ácaros destacam-se como uma das pragas mais importantes nas culturas, sobretudo aqueles da família *Tetranychidae*, já descrita em mais de 4069 plantas hospedeiras (Migeon & Dorkeld, 2023). Dentre os principais sintomas das doença virais ligadas a está família estão o surgimento de clorose, perda de vigor, desfolhamento e murchamento das plantas, resultando em perdas na produção de importantes espécies cultivadas (Hoffmann et al. 2007). Sendo, portanto, a principal família representante das infecções agrícolas nas plantas cultivadas no Brasil e no mundo (Migeon; Nouguier; Dorkeld, 2010; Suh et al. 2006)

Algumas espécies da família *Tetranychidae* após a fase adulta e no alcance da alta densidade populacional da colônia, mostram um frequente padrão de migração, abandonando folhas muito danificadas e que não oferecem mais suporte para sobrevida da colônia (Andrade; Melville; Michelotto, 2016). Está prática amplifica os danos causados nas plantações, sobretudo porque a infestação propaga-se de forma mais rápida. Em contrapartida, os tetraniquídeos possuem dispersão lenta caminhando de planta a planta em uma única geração (Bing, 2023). Todavia, o processo de dispersão mais frequente dos ácaros tetraniquídeos dar-se pelo vento (Grbic et al. 2011)

Em sintonia, a espécie *Tetranychus urticae* tem se tornado a principal praga representante desta família, causando infecções em espécies de plantas no Brasil e em diversas regiões de outros países (Lourenção et al. 2000). Os aspectos biológicos dos ácaros são de grande interesse para o desenvolvimento de programas de controle, visto que a espécie já foi descrita em cerca de 1600 plantas hospedeiras (Migeon & Dorkeld, 2023)

A dinâmica populacional da espécie é afetada por diversos fatores como umidade, temperatura, fotoperíodo, hospedeiro, condição nutricional do hospedeiro, dentre outros (Pavela et al. 2017; Roggia, 2008). Aspectos populacionais do ácaro rajado, como ciclo biológico, parâmetros reprodutivos, populacionais, probabilidade de sobrevivência e fertilidade específica, têm sido estudados por diversos autores (Catalani et al. 2017; Sadeghi et al. 2016). O ciclo de vida do ácaro rajado varia de seis até doze dias, dependendo do hospedeiro (Oliveira, Martins, Zacarias, 2013)

A bioinformática, como campo interdisciplinar, possibilita a integração harmoniosa de diversos tipos de dados biológicos e assim, dinamiza o processo de detecção e análise de uma gama de informações (Zerbino et al. 2009). Essa integração oferece uma compreensão mais profunda dos processos biológicos, permitindo investigar mudanças significativas nas interações de um organismo, seja de mesma espécie ou diferente (Rhee; Dickerson; Xu, 2006)

A convergência entre bioinformática e técnicas de sequenciamento tem revolucionado a detecção de vírus e a descoberta de novos patógenos emergentes. O Sequenciamento de Nova Geração (SNG), aliado à bioinformática, proporciona uma abordagem ágil para analisar material genético viral em larga escala e sem necessidade de conhecimento prévio dos indivíduos presentes na amostra. Isso não apenas facilita a identificação de vírus conhecidos, mas também desempenha um papel crucial na detecção de novos agentes infecciosos, possibilitando uma resposta rápida e eficaz a surtos virais e fortalecendo a vigilância epidemiológica (Seto, 2010)

Este estudo teve como objetivo caracterizar o viroma associado ao ácaro rajado *Tetranychus urticae*. A análise de 30 bibliotecas de RNA-seq públicas derivadas de diversas localidades e sob diferentes condições de controle resultou na identificação de 20 sequências virais, incluindo 11 relacionadas a novos vírus. Assim, este trabalho representa um importante passo em desvendar o viroma do *T. urticae*, utilizando um grande amostral de projetos do NCBI selecionadas criteriosamente, destacando a necessidade de pesquisas adicionais para uma compreensão mais profunda de sua diversidade e do impacto da microbiota em sua composição. As perspectivas oferecidas por este trabalho podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no combate a essa praga devastadora e estabelecer bases sólidas para investigações futuras na interação ácaro- planta-vírus.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução as generalidades da espécie Tetranychus urticae

Dentre os artrópodes, os ácaros destacam-se como uma das pragas mais importantes nas culturas agrícolas, sobretudo aqueles da família *Tetranychidae*, os quais promovem o surgimento de clorose, perda de vigor, desfolhamento e murchamento das plantas, resultando em perdas na produção de diversas espécies (Hoffmann et al. 2007). Posto isto, os ácaros da família *Tetranychidae* também conhecidos como “ácaros de teia” são os principais representantes das infecções agrícolas nas plantas cultivadas (Migeon; Nouguier; Dorkeld, 2010; Sakunwaein; Chandrapatya; Baker, 2003b; Sarwar, 2020ª)

Os tetraniquídeos são haplo-diplóides, os machos sendo produzidos por partenogênese arrenótoca e as fêmeas através de reprodução sexuada. Algumas espécies apresentam partenogênese telítoca (Sadeghi, Shoushtari, Madani, 2016). O desenvolvimento da fase imatura pode dar-se em cerca de uma a duas semanas, e os adultos geralmente vivem cerca de um mês (Bryan et al. 2019). A fecundidade média varia entre poucas dezenas a mais de quase duas centenas de ovos por fêmea (Rezaie et al. 2014; Sarwar, 2015 e 2020a)

A familia causa significativos danos diretos e indiretos o que contribui significativamente para a rápida propagação de doenças entre diferentes culturas, ampliando ainda mais os prejuízos causados por essas pragas. Estima-se que esses danos anuais atinjam a expressiva cifra de aproximadamente US$ 520 bilhões, correspondendo a cerca de 18 a 20% de toda a produção cultivada global (Bryan et al. 2019; Sarwar, 2020a; Sundin et al. 2016)

A ampla gama de hospedeiros e a adaptabilidade a diferentes condições ambientais tornam os Tetraniquideos uma praga desafiadora de se controlar (Sundin et al. 2016). Estratégias integradas de manejo, como o uso agentes biológicos, práticas culturais e, quando necessário, pesticidas, tornam-se essenciais para mitigar os danos causados por esses ácaros em plantações em todo o mundo. Ainda é necessário mais estudos para compreender melhor a biologia e o comportamento dessas pragas com o intuito de desenvolver abordagens eficazes e sustentáveis de controle (Hashiro; Yasueda, 2022; Tudi et al. 2021)

Algumas espécies da família *Tetranychidae*, após a fase adulta e no alcance da alta densidade populacional da colônia, mostram um padrão de migração, tal qual abandonam folhas muito danificadas e que não oferecem mais suporte para sobrevida da colônia (Andrade; Melville; Michelotto, 2016). No entanto, os tetraniquídeos geralmente conseguem se dispersar apenas alguns metros caminhando de planta a planta em uma geração (Bing, 2023). Todavia, o processo de dispersão mais frequente dos ácaros tetraniquídeos dar-se pelo vento.

As células epidérmicas e parenquimatosas esvaziadas pela ação dos estiletes quelicerais dos tetraniquídeos são ocupadas por ar, resultando em pontuações translúcidas (Andrade; Melville; Michelotto, 2016). Notadamente, essas áreas darão origem a colorações prateadas ou verde-pálidas devido à remoção dos cloroplastos (Lourenção et al. 2000). Sob ataques mais intensos, a folha pode apresentar manchas cloróticas, de extensão variável, chegando a causar rasgadura e até queda da folha. O rompimento das células, a remoção de sua clorofila e a ação da saliva injetada pelos ácaros leva a disfunções nas folhas atacadas, como o aumento na taxa de transpiração, resultando em déficit hídrico e bloqueio da síntese de amido, o que acarreta o aumento da concentração de seus precursores, favoráveis ao desenvolvimento dos ácaros (Migeon & Dorkeld, 2006-2013)

Embora existam diversos métodos disponíveis para controlar infestações de ácaros, a aplicação de pesticidas permanece a abordagem mais comumente utilizada (Zhang et al. 2022). No entanto, os ácaros rajados demonstraram uma notável capacidade de desenvolver resistência à esses pesticidas, o que pode ser atribuído à sua taxa de reprodução rápida e ciclo de vida curto, é válido ressaltar que a resistência dar-se pelo uso incorreto nas lavouras (Grbic et al. 2011b)

Há crescentes evidências sugerindo uma correlação entre a resistência a acaricidas e a capacidade dos ácaros de infestar diferentes espécies de plantas. A resistência dos ácaros, incluindo o *Tetranychus urticae*, à acaricidas tornou-se uma preocupação significativa nas práticas agrícolas em todo o mundo (Adesanya et al. 2021). Essas pragas desenvolveram mecanismos que lhes permitem sobreviver à exposição a acaricidas, resultando em uma eficácia reduzida dos métodos de controle químico. A correlação entre resistência e capacidade de infestação é considerada associada à evolução de certos genes envolvidos no metabolismo (Zhang et al. 2022). À medida que os ácaros desenvolvem resistência a acaricidas, eles podem adquirir a capacidade de metabolizar os compostos liberados pelas plantas hospedeiras, o que lhes permite infestar uma variedade de espécies vegetais (Adesanya et al. 2021; Zhang et al. 2022). Essa adaptabilidade e resistência a acaricidas apresentam desafios significativos para agricultores e indústrias agrícolas, uma vez que se torna mais difícil controlar as populações de ácaros e limitar os danos às colheitas (Kong et al. 2019; Schlachter et al. 2019)

O ácaro rajado *Tetranychus urticae* é a principal praga representante da familia dos *Tetranychidae*, afetando direta ou indiretamente uma diversidade de espécies de plantas no Brasil e em diversas regiões de outros países (Lourenção et al. 2000). Os aspectos biológicos dos ácaros são de grande interesse para o desenvolvimento de programas de controle, visto que a espécie já foi descrita em mais de 1600 plantas hospedeiras (Migeon & Dorkeld 2006-2013)

O ácaro *Tetranychus urticae* conhecido popularmente como acaro rajado é uma praga polífaga (Grbic et al. 2011). Possui coloração avermelhada, dois pares de manchas escuras no dorso e é coberto por longas setas, os machos adultos possuem em torno de 0,25 mm de comprimento, enquanto as fêmeas adultas medem 0,46 mm, já os ovos possuem formato esférico; a postura geralmente, é realizada diretamente nas folhas, nas proximidades das nervuras ou sobre as teias que são tecidas pelos adultos (Pavela et al. 2017). Os indivíduos, geralmente, localizam-se na face abaxial das folhas (Marchler-Bauer et al. 2004)

Os danos causados são rapidamente percebidos devido à voracidade com que os ácaros da espécie se alimentam da planta (Bing, 2023). O *T. urticae* perfura as células do parênquima paliçádico do mesófilo foliar e, assim, injetam enzimas salivares que digerem elementos estruturais, sugando o conteúdo extravasado (Pavela et al. 2017). Cada ácaro tem capacidade de destruição de 18 a 22 células por minuto o que sugere os potenciais riscos que a infecção causada pela espécie provoca nas culturas (Moraes & Flechtmann, 2008)

A biologia populacional do ácaro rajado é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos, como umidade, temperatura, fotoperíodo, hospedeiro, condição nutricional do hospedeiro, dentre outros (Pavela et al. 2017; Roggia, 2008). Aspectos populacionais da espécie, como ciclo biológico, parâmetros reprodutivos, populacionais, probabilidade de sobrevivência e fertilidade específica, têm sido estudados por diversos autores (Catalani et al. 2017; Sadeghi et al. 2016). Na temperatura de 25ºC, esse ciclo fica em torno de 10 a 12 dias, enquanto que, em temperaturas próximas de 30ºC, com umidade relativa menor que 60%, esse tempo pode ser reduzido para sete dias (Oliveira, Martins, Zacarias, 2013)

A produção de teia é uma característica frequente entre os tetraniquídeos (Nafajabadi et al. 2011), atuando como proteção para os mais diversos predadores que se arriscam atacar a colônia (Catalani et al. 2017); impede que diferentes espécies se estabeleçam no mesmo espaço e assim, haja competição por alimento e abrigo (Mottaghinia, Razmjou, Nouri-Ganbalani; 2011); serve como proteção da ação da chuva, dificultando que gotículas atinjam a colônia e haja dispersão por fluxo continuo (Bernardi et al. 2010). A teia é ainda importante para facilitar o encontro da fêmea pelo macho e na dispersão dos ácaros pelas plantas (Catalani et al. 2017)

2.2. Interação Ácaro-Planta-Vírus

Durante a evolução das espécies, plantas e vírus desenvolveram mecanismos complementares de ataque e defesa que garantiram sucesso no processo de adaptação, colonização por ambiente favorável ao crescimento e alimento (Sul et al. 2006). O fenótipo de resistência ou de suscetibilidade das plantas à infecção por vírus irá depender do balanço entre estes mecanismos que são desenvolvidos por ambos os organismos (Zerbini et al. 2005)

Os vírus podem causar distintas modificações nas plantas, dentre as principais mudanças que ocorrem estão a interferência nos processos normais da célula, provocando profundas mudanças histológicas e citológicas (Fajardo et al. 2017); ocorre ainda a ruptura do balanço energético, alteração na síntese de proteínas, ácidos nucléicos e clorofila, além de alteração nas taxas respiratórias (Laimer et al. 2009)

A entrada do vírus nas células vegetais é um processo passivo, pois o vírus é introduzido via vetor biológico no caso de ácaros, ou via ferimentos, quando há um corte mecânico sobre a estrutura da planta (Wallingford et al. 2015). Desta forma, a compreensão dos patossistemas virais e crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, controle e tratamento (Fajardo et al. 2017) é sabido que estes apresentam maior complexidade quando comparados àqueles causados por outros agentes etiológicos, visto que há uma maior dificuldade em identificar precisamente os sintomas provocados. Esta complexidade aumenta ainda porque é resultante da interação existente entre o vírus, a planta hospedeira e o vetor (Pallás; Sánchez-Navarro; James, 2018)

Os vírus de plantas, tanto os de DNA como os de RNA, agem, basicamente, utilizando os mecanismos da planta para replicação do seu próprio ácido nucléico, interferindo desta forma nas vias biossintéticas da célula vegetal (Laimer et al. 2009) seja na transcrição do material genético ou na tradução do RNA mensageiro em proteínas, podendo levar à deficiência ou excesso de substâncias endógenas da planta, inclusive de hormônios, provocando desvios de desenvolvimento e de crescimento, em inúmeros casos até a morte do vegetal (Pallás; Sánchez-Navarro; James, 2018)

A entrada do vírus nos tecidos vegetais só é possível através de ferimentos por vetores que incluem um vasto grupo, que inclusive conta com os ácaros, danos mecânicos, ou pelo manuseio de plantas, pois estes patógenos não possuem enzimas e estruturas capazes de romper as barreiras naturais da planta, inclusive a epiderme (Mehle; Ravnikar, 2012)

Assim sendo, a maioria dos vírus de plantas são dependentes para sua sobrevivência da eficiente transmissão planta-a-planta por vetores específicos (Mehle; Ravnikar, 2012). Esta propagação assegura a sobrevivência do vírus, resultando muitas vezes na ocorrência da doença e a disseminação para toda a sua estrutura. Os primeiros estudos sobre transmissão de virus de plantas por vetores demonstraram que enquanto maior a complexidade do vetor, maiores são as probabilidades de sucesso na infecção (Romeiro, 2000)

Em estudos, Watson & Roberts (1939), buscaram exemplificar os mecanismos de interação virus-vetor que estão envolvidos na transmissão. Observou-se que este processo se dar por mecanismos regulatórios complexos. Ademais, foi levantado a hipótese de existir substâncias ou receptores específicos no vetor que poderiam afetar a estabilidade, retenção e a transmissão dos diferentes virus de plantas pelos seus vetores (Pallás; Sánchez-Navarro; James, 2018). A maioria dos virus são dependentes de vetores para sua propagação e os insetos são os mais comuns entre todos os vetores, sendo estes mecanismos altamente específicos (Mehle; Ravnikar, 2012)

Os virus utilizam dois processos para a invasão na planta, um é o movimento de célula-a-célula pelos plasmodesmos que envolve proteínas de movimento (MP) codificadas pelos virus e também de componentes codificados pelo hospedeiro (Agrios, 2005), e o outro é o transporte à longa distância que é realizada pelos tecidos vasculares do floema (Romwiro, 2000)

Como os vírus se movem célula-a-célula dentro da planta via plasmodesmos e codificam uma ou mais proteínas não estruturais, requerem para este movimento dentro de seus hospedeiros proteínas como a proteína capsidial (CP). É importante destacar que este movimento geralmente ocorre precocemente, antes do processo infeccioso, ocorrendo, por exemplo, em torno de cinco horas para o virus do mosaico do fumo *(Tobacco mosaic virus* - TMV*)* em *Nicotiana tabacum* (Laimer et al. 2009)

Estudos citopáticos com vários *luteovírus*, como o *Potato leafroll virus* (PLRV), mostraram partículas virais em elementos do tubo crivado maduro, células companheiras e parênquima celular do floema, mas não em outros tipos celulares (Fajardo et al. 2017) a limitação ao floema sugere que a restrição dos *luteovírus* os tecidos floemáticos são devido a uma falha no movimento do vírus e não à sua inabilidade de replicação (Fajardo et al. 2017)

Santos et al. (2003) estudaram a interação do *begomovírus* - *Tomato rugose mosaic virus* (TORMV) com o seu vetor, a mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B e determinaram os períodos de aquisição do vírus, de inoculação, de latência e retenção e transmissão à progênie. Para este experimento os autores utilizaram plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cultivar Santa Clara e cinco insetos por planta. Os mesmos verificaram um período de aquisição de 15 minutos, onde 6% dos tomateiros foram infectados e 65%, quando o período de aquisição foi estendido para 24 horas. O período de inoculação mínimo foi de 30 minutos registrando-se de 18% a 67% de infecção com 24 horas de inoculação. O período de latência foi de 16 horas após o vetor adquirir o vírus. Na detecção do vírus no vetor via PCR, os testes constataram o ToRMV em ninfas desenvolvidas em tomateiro infectado, em adultos com diferentes períodos de aquisição, mas não em ovos de fêmeas avirulíferas ovipositados em planta infectada (Fajardo et al. 2017)

2.3. Virus associados a Tetranychus urticae

Os ácaros são reconhecidos como importantes vetores na transmissão de vírus. Diversos exemplos destacam o papel deles na disseminação de infecções virais (Dhooria, 2016; Gisder et al. 2009). O ácaro *Varroa destructor*, que infesta abelhas, foi associado como vetor do *Deformed wing virus* (DWV) e do *Kashmir bee virus* (KBV), causando um enorme dano às populações de abelha (Giacobino et al. 2016). Outro exemplo, é o ácaro eriofídeo, *Wheat curl mite* (WCM, *Aceria tosichella*), amplamente conhecido por transmitir os *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), *Triticum mosaic virus* (TriMV), *High Plains wheat mosaic virus* (HPWMoV), and *Brome streak mosaic virus* (BrSMV), que infectam plantas de trigo (*Triticum aestivum L.*) e representam grande ameaça à sua produção (Nachappa; Haley; Pearce, 2021). Além disso, *Trombiculidae*, comumente conhecidos como ácaros-de-trombiculideos, foram identificados como vetores do *Hantann virus* (Hantavírus: *Bunyaviridae*), que é transmitido para mamíferos susceptíveis (Yu; Tesh, 2014)

Alguns vírus já foram descritos na literatura estando associados ao ácaro *Tetranychus urticae*. Embora não sejam vetores eficazes de patógenos que afetam seres humanos ou animais, eles podem abrigar e transmitir vírus que afetam plantas e assim, comprometer as lavouras. Ademais, possuem abundância nas infecções agrícolas e aumentam significativamente o potencial da espécie de ser vetor de infecções persistentes que podem levar a prejuízos significativos as plantações de culturas que alimentam o mundo (Grbi´c et al. 2011)

Dentre os agentes já descritos associados ao *T. urticae* temos o vírus do mosaico do feijão-americano (*Bean yellow mosaic virus* - BYMV). É um vírus fitopatogênico do gênero *Potyvirus* e da família *Potyviridae* (Grbi´c et al. 2011). Formado por uma fita monopartite de RNA de fita simples de sentido positivo, sendo uma partícula filamentosa que mede cerca de 750 nm de comprimento. O BYMV foi relatado pela primeira vez no início de 1900 no nordeste dos Estados Unidos, no qual estava infectando ervilhas de jardim *(Pisum sativum).* Atualmente, acredita-se que o vírus esteja distribuído em todo o mundo (Matsuda et al. 2018)

Em vista disso, o *Tetranychus urticae* alimentando-se das plantas e carreando o agente viral pode transmitir o BYMV as lavouras de feijão (Grbi´c et al. 2011). Como produto desta infecção ocorre o mosaico amarelo nas folhas das plantas de feijão ocasionado malformação e manchamento foliar. Este vírus faz dois tipos de inclusões virais, agregados laminados e uma inclusão nuclear que são características visíveis para o diagnóstico (Zélé; Weill; Magalhães, 2018)

O *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), ou Vírus do Mosaico do Pepino é amplamente estudado é já foi descrito associado ao *T. urticae*, visto que afeta uma ampla variedade de plantas hospedeiras, incluindo o pepino, mas também muitas outras culturas vegetais, plantas ornamentais e ervas orgânicas (Matsuda et al. 2018).

O CMV é um membro do gênero Cucumovirus, da família *Bromoviridae*. O vírus do mosaico do pepino é transmitido principalmente por ácaros e também pode ser transmitido por sementes, contato direto com plantas infectadas e ferramentas agrícolas contaminadas (Zélé; Weill; Magalhães, 2018). Ele causa uma série de sintomas nas plantas, incluindo mosaico nas folhas, deformações, enrugamento, murcha e outros distúrbios no crescimento nos vegetais. Isso pode resultar em perdas significativas na produção de culturas (Santos-Matos et al. 2017)

A pesquisa sobre o CMV é extensa devido ao seu impacto econômico nas culturas agrícolas. Muitos estudos se concentram na identificação de diferentes cepas do vírus, métodos de detecção, estrutura viral, epidemiologia, controle de ácaros transmissores e medidas de manejo para prevenir a propagação do vírus em culturas agrícolas (Santos- Matos et al. 2017). Desta forma, os ácaros *Tetranychus urticae* podem transmitir o CMV de planta em planta enquanto se alimentam (Grbi´c et al. 2011)

O vírus do mosaico do tomate, ou *Tomato mosaic virus* (ToMV), é um vírus que afeta as plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e algumas outras plantas pertencentes à família *Solanaceae* (Santos-Matos et al. 2017). Ele é conhecido por causar vários sintomas em tomateiros e pode ter um impacto significativo na produção de tomates. Desta forma, há relatos na literatura que associam o ToMV as infeções com *T. urticae* (Matsuda et al. 2018)

O ToMV pertence à família *Virgaviridae* e ao gênero *Tobamovírus*. Sua transmissão ocorre principalmente por contato direto, como através do contato com ferramentas agrícolas, mãos de pessoas infectadas ou pragas que se alimentam das plantas.

A infecção por ToMV pode resultar em sintomas como mosaico nas folhas (manchas claras e escuras), enrugamento das folhas, deformação dos frutos e redução na produção (Santos-Matos et al. 2017)

É importante notar que os ácaros da espécie *Tetranychus urticae* não são vetores tão eficazes na transmissão de vírus de plantas. No entanto, sua capacidade de se alimentar de uma ampla gama de plantas e sua presença em cultivos agrícolas podem contribuir para a disseminação futura de vírus em áreas agrícolas. O controle desses ácaros é uma consideração importante na gestão de doenças virais em plantas.

2.4. Importância dos estudos de vírus e viromas

Os vírus não são considerados organismos vivos porque são inertes fora das células (Chao et al. 2005). No entanto, quando ocorre a penetração em uma célula hospedeira, seu material genético sequestra o aparato enzimático da célula, dando ínicio a replicação viral. Os vírus não possuem um aparato enzimático fora da célula, necessitando, assim, da maquinária celular para completar o seu ciclo replicativo, o que o torna um parasita intracelular obrigatório. Apesar da baixa complexidade estrutural, podem causar grandes danos a célula hospedeira, mesmo apresentando morfologicamente apenas o material genético, um capsídeo e, em alguns vírus, um envelope (Domingo et al. 1996)

Algumas propriedades distinguem os vírus de outros microrganismos. A primeira está relacionada ao seu tamanho, o qual pode variar de 10 a 300 nm (Gaïa; Forterre; From, 2023). Dessa forma, são considerados os menores microrganismos existentes, podendo ser visualizados apenas através da microscopia eletrônica. Para fins de comparação, lembramos que as bactérias e as hemácias possuem, em média, 10 a 15 vezes o tamanho dos vírus (Domingo et al. 1996)

A segunda propriedade se refere ao genoma viral, que pode ser DNA ou RNA, com exceção do *Mimivírus* (família: *Mimiviridae*), o qual apresenta em seu genoma os dois ácidos nucleicos (DNA e RNA), descoberto em 2003, por pesquisadores da Universidade Méditerranée, em Marseille, França (Madigan; Martinko; Paker, 2004)

O ácido nucleico contém os genes responsáveis pelas informações genéticas para a codificação de proteínas com composição química bem definida, capazes de induzir respostas imunológicas específica esta especificidade torna-se uma das principais características virais. O mecanismo de replicação viral favorece as frequentes mutações, burlando, assim, o sistema de defesa de vertebrados e invertebrados (Molina, 2015)

As propriedades físico-químicas dos vírus os tornam capazes de infectar o organismo através de receptores de membrana específicos, presentes nas células hospedeiras. O fato de o vírus apresentar tropismo celular vai influenciar no tipo e na intensidade da infecção (Molina, 2015). Segundo Baltimore, ao considerar a síntese do RNA mensageiro do vírus e a replicação do genoma viral, podemos agrupar os vírus em sete grupos distintas, mostradas na **Figura 1.**

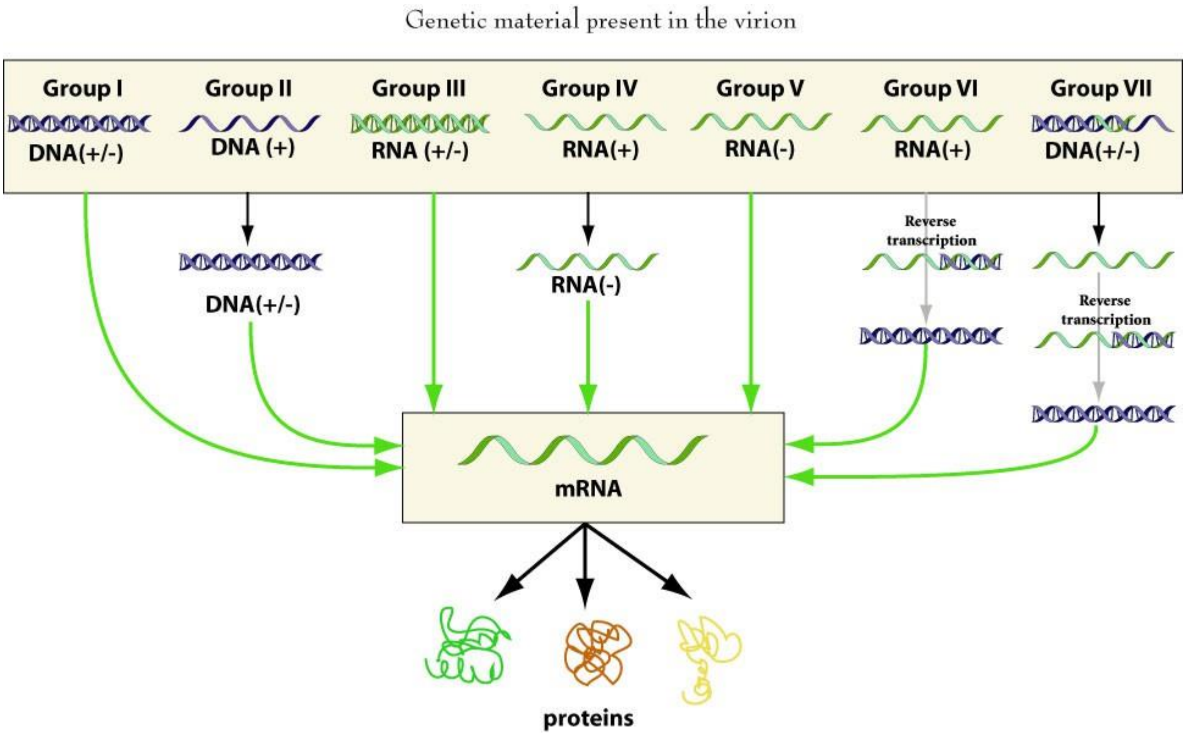

Figura 1. Classificação viral segundo Baltimore, baseada na síntese do mRNA viral e na replicação do genoma viral. (Fonte: ViralZone – www.viralzone.org). De acordo com a classificação de Baltimore, o grupo I compreende os vírus de DNA de fita dupla, citando como exemplo os *Adenovírus, Herpesvírus, Poxvírus e Rinovírus*. No grupo II estão os vírus de DNA de fita simples seja de polaridade positiva ou negativa, como por exemplo os *Parvovírus e Densovírus*. No grupo III estão os vírus de RNA de fita dupla que compreendem as famílias *Reoviridae e Birnaviridae* por exemplo. No grupo IV se encontram os vírus de RNA de fita simples positiva, como os vírus das famílias *Picornaviridae, Nodaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Potyviridae e Togaviridae.* O grupo V compreende os vírus de RNA de fita simples negativa, como os vírus das famílias *Bunyaviridae e Rhabdoviridae.* O grupo VI contém os vírus de RNA de fita simples que apresentam intermediário de DNA codificado através de transcriptase reversa, como por exemplo os *Retrovírus*. No grupo VII, classificado mais recentemente, estão contidos os vírus de DNA de fita simples que tem intermediário de RNA, como exemplo dos *Hepadnavirus*. Como característica comum, os vírus têm ou transcrevem, em algum momento da replicação viral, sequências de RNA que posteriormente vão ser traduzidas em proteína pela maquinaria celular.

O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) aprimora constantemente as normas de classificação viral, estabelecendo critérios de seleção e agrupamento quanto as suas propriedades e características. O mais importante de todo esse princípio é que os vírus podem ser agrupados de acordo com as suas propriedades físico, químicas e biológicas, assim como as das células que infectam. Dessa forma, os vírus podem ser agrupados de acordo com o tipo de ácido nucleico, simetria do capsídeo, presença ou ausência do envelope, tamanho e sensibilidade as substancias químicas (Litter et al. 2005)

Quanto ao genoma dos vírus, estes podem ser constituídos por fita simples (ss) ou dupla (ds), linear ou circular, de polaridade positiva ou negativa (Murray et al. 2007). As diferentes características do ácido nucléico conduzirão a variadas estratégias de replicação. Alguns são capazes de realizar recombinações genéticas e montagens incorretas de partículas virais, podendo produzir vírus provenientes de diferentes ancestrais (Litter et al. 2005)

O espectro de hospedeiros de um vírus consiste na variedade de células hospedeiras que o vírus pode infectar. Podemos utilizar o termo tropismo viral para identificar as células alvo principais. Dessa forma, existem espécies de plantas que tendem a sofrer maiores problemas quanto a infestação de pragas devido a afinidade do microrganismo com as suas células (Murray et al. 2007)

Os vírus podem ser classificados em vários tipos morfológicos diferentes, com base na arquitetura do capsídeo. Os vírus podem ser helicoidais, poliédricos, envelopados, complexos (Murray et al. 2007). Segundo a arte gráfica de Raphael dos Santos Stephens a estrutura viral está caracterizada conforme mostrada na **Figura 2.**

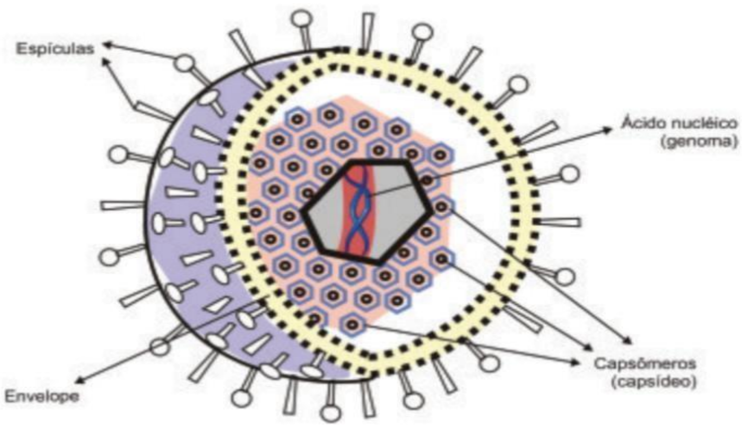

Figura 2. Estrutura viral Adaptação e arte gráfica por Raphael dos Santos Stephens.

Notadamente o termo viroma refere-se ao conjunto de vírus que são frequentemente investigados e descritos por método de sequenciamento metagenômico de ácidos nucléicos virais (Kuhn, 2022). Ao passo que são associados a um ecossistema, organismo ou hábitat, possuindo diversidade biológica o que lhe confere adaptações especificas (Santos-Matos et al. 2017)

Desta forma, o estudo dos viromas se torna importante uma vez que há diversidade viral em todos os ambientes, ao passo que são os agentes infecciosos mais abundantes na terra (Gubala, 2008). De toda forma, compreender essa diversidade é fundamental para a pesquisa em biologia, ecologia e genômica viral, tendo em vista a resolução de impactos na sociedade. Nota-se que muitos vírus são patogênicos para seres humanos e animais, causando graves doenças. Estudar os vírus pode ajudar a identificar novos patógenos e entender melhor como eles evoluem e se distribuem (Kuhn, 2022)

2.5. A bioinformática como ferramenta ouro à identificação de vírus

No início do ano de 2005, houve uma revolução na tecnologia de sequenciamento, que quebrou a hegemonia de quase trinta anos da abordagem Sanger. Esse marco foi impulsionado pela emergência dos sequenciadores de próxima geração, os quais introduziram uma metodologia alternativa, utilizando o próprio DNA alvo para gerar uma diversidade de fragmentos (Zerbino et al. 2009). Cada fragmento é ligado a sequências sintéticas de DNA por meio de adaptadores específicos para cada plataforma. Esses adaptadores, contendo sequências universais, são empregados pela enzima polimerase para amplificar os fragmentos em um único estágio, diferentemente da abordagem Sanger, que separa os processos de amplificação e detecção (Vincent et al. 2017)

Além da baixa eficiência, a técnica de sequenciamento pelo método Sanger exige que o DNA amplificado esteja em alta concentração para obter bons resultados (Warren et al. 2007) e forneça apenas um único padrão de sinal, conhecido como eletroferograma, para cada sequência gerada. Essas características são específicas da tecnologia de nova geração, que permitem a realização do sequenciamento com concentrações de DNA mais baixas e a geração de milhões de sinais simultaneamente para a mesma sequência (Morganti et al. 2019)

A taxa de erro no sequenciamento de nova geração que no início era mais elevada do que a do método Sanger, foi sendo diminuída juntamente com o aprimoramento das plataformas e atualmente não pode mais ser apontada como uma crítica às novas tecnologias (Bryant, Wong, Mockler et al. 2009; Morganti et al. 2019). Desta forma, uma das principais vantagens do sequenciamento de nova geração ainda não foi mencionada está ligada diretamente ao custo. Após o investimento inicial com um novo equipamento o custo por megabase é inferior a $ 0.10 com a possibilidade de sequenciamentos completos de genomas em um período inferior a uma semana (Murray et al. 2021)

Entretanto, o custo inicial e a necessidade de novos equipamentos inicialmente limitaram a adoção generalizada desse método pelos cientistas. Mesmo diante da comparação favorável com o método Sanger, onde plataformas de nova geração, como o sequenciador 454, podiam gerar o equivalente a 50 sequenciadores modelo 3730XL da Applied Biosystems com apenas um sexto do custo, a adoção inicial foi moderada (Morganti et al. 2019; Vincent et al. 2017)

O desenvolvimento de plataformas de sequenciamento de ácidos nucleicos gerou um volume astronômico de dados (“big data”) desde sua popularização (Pettersson; Lundeberg; Ahmadian, 2009). A necessidade de analisar e interpretar estes dados fez nascer a bioinformática - uma ciência capaz de explorar essa infinidade de dados através de ferramentas computacionais de limites imensuráveis (Luscombe; Greenbaum; Gerstein, 2001)

Os dados biológicos são gerados de diversas maneiras e em formatos distintos. Ademais, os dados de ácidos nucléicos são gerados por método de sequenciamento, e os dados de proteínas são obtidos por métodos analíticos como a espectrometria de massas, e interações gênicas ou proteicas por experimentos como duplo-híbrido de leveduras (Hernandez; Francois; Farinelli, 2008; Greene et al. 2014; Schmidt; Hildebrandt, 2017)

Uma das formas de lidar com estes grandes volumes de dados é a partir da implementação de algoritmos, que são séries de instruções para execução de tarefas, como cálculos matemáticos, processamento de dados, e automação de processos (Zerbino et al. 2009). Algoritmos na análise de sequências permitem a montagem e anotação de genomas, identificação de similaridades entre organismos e suas implicações evolutivas. Além disso, algoritmos são usados na construção de modelos tridimensionais de RNAs e proteínas a partir de sequências (Greene et al. 2014; Schmidt; Hildebrandt, 2017)

A bioinformática, como campo interdisciplinar, possibilita a integração harmoniosa de diversos tipos de dados biológicos, incluindo sequências de DNA, estruturas de peptídeos, informações sobre vias metabólicas e sinalização celular (Zerbino et al. 2009). Essa integração oferece uma compreensão mais profunda dos processos biológicos, permitindo investigar mudanças na expressão gênica, a localização precisa de proteínas e suas interações com genes e outras proteínas. Além disso, a bioinformática capacita a análise de como o repertório completo de metabólitos contribui para a regulação e funcionamento de um tecido específico (Rhee; Dickerson; Xu, 2006)

A convergência entre bioinformática e técnicas de sequenciamento tem revolucionado a detecção de vírus e a descoberta de novos patógenos emergentes. O Sequenciamento de Nova Geração (SNG), aliado à bioinformática, proporciona uma abordagem ágil para analisar material genético viral em larga escala. Isso não apenas facilita a identificação de vírus conhecidos, mas também desempenha um papel crucial na detecção de novos agentes infecciosos, possibilitando uma resposta rápida e eficaz a surtos virais e fortalecendo a vigilância epidemiológica (Seto, 2010)

viruses

MDPI

Article

CHARACTERIZATION OF THE VIROME ASSOCIATED WITH THE UBIQUITOUSTWO-SPOTTED SPIDER MITE, *TETRANYCHUS URTICAE*

Lucas Yago Melo Ferreira [†], **Anderson Gonçalves de Sousa** [1,†], **Joannan Lima Silva** [1,†], **João Pedro Nunes Santos** [1], **David Gabriel do Nascimento Souza** [1], **Lixsy Celeste Bernardez Orellana** [1], **Sabrina Ferreira de Santana** [1], **Lara Beatriz Correia Moreira de Vasconcelos** [1], **Anibal Ramadan Oliveira** [2] **and Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar** [3,*]

[1] Center of Biotechnology and Genetics, Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz, Ilhéus 45662-900, Brazil; lucasmelobiomed@gmail.com (L.Y.M.F.); andersonbio93@gmail.com (A.G.d.S.); jlsilva.bio@uesc.br (J.L.S.); jpnsantos.bio@uesc.br (J.P.N.S.); davidgabriel-ns@hotmail.com (D.G.d.N.S.); lixsy09@gmail.com (L.C.B.O.); sabrinabiotec2@gmail.com (S.F.d.S.); laraseixas99@gmail.com (L.B.C.M.d.V.)

[2] Laboratory of Entomology, Department of Biological Science, State University of Santa Cruz, Ilhéus 45662-900, Brazil; aoliveira@uesc.br

[3] Postgraduate Program in Computational Modeling in Science and Technology, Department of Engineeringand Computing, State University of Santa Cruz (UESC), Ilhéus 45662-900, Brazil

* Correspondence: ericgdp@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Agricultural pests can cause direct damage to crops, including chlorosis, loss of vigor, defoliation, and wilting. In addition, they can also indirectly damage plants, such as by transmitting pathogenic micro-organisms while feeding on plant tissues, affecting the productivity and quality of crops and interfering with agricultural production. Among the known arthropod pests, mites are highly prevalent in global agriculture, particularly those from the Tetranychidae family. The two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, is especially notorious, infesting about 1600 plant species and causing significant agricultural losses. Despite its impact on agriculture, the virome of *T. urticae* is poorly characterized in the literature. This lack of knowledge is concerning, as these mites could potentially transmit plant-infecting viral pathogens, compromising food security and complicating integrated pest management efforts. Our study aimed to characterize the virome of the mite *T. urticae* by taking advantage of publicly available RNA deep sequencing libraries. A total of 30 libraries were selected, covering a wide range of geographic and sampling conditions. The library selection step included selecting 1 control library from each project in the NCBI SRA database (16 in total), in addition to the 14 unique libraries from a project containing field-collected mites. The analysis was conducted using an integrated de novo virus discovery bioinformatics pipeline developed by our group. This approach revealed 20 viral sequences, including 11 related to new viruses. Through phylogenetic analysis, eight of these were classified into the *Nodaviridae*, *Kitaviridae*, *Phenuiviridae*, *Rhabdoviridae*, *Birnaviridae*, and *Qinviridae* viral families, while three were characterized only at the order level within Picornavirales and Reovirales. The remaining nine viral sequences showed high similarity at the nucleotide level with known viral species, likely representing new strains of previously characterized viruses. Notably, these include the known *Bean common mosaic virus* (BCMV) and *Phaseolus vulgaris alphaendornavirus* 1, both of which have significant impacts on bean agriculture. Altogether, our results expand the virome associated with the ubiquitous mite pest *T. urticae* and highlight its potential role as a transmitter of important plant pathogens. Our data emphasize the importance of continuous virus surveillance for help in the preparedness of future emerging threats.

Keywords: two-spotted spider mite; virome characterization; metatranscriptomics; RNA-seq

check for updates

Citation: Ferreira, L.Y.M.; de Sousa, A.G.; Silva, J.L.; Santos, J.P.N.; Souza, D.G.d.N.; Orellana, L.C.B.; de Santana, S.F.; de Vasconcelos, L.B.C.M.; Oliveira, A.R.; Aguiar, E.R.G.R. Characterization of the Virome Associated with the Ubiquitous Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. *Viruses* **2024**, *16*, 1532. https://doi.org/10.3390/v16101532

Academic Editor: Eugene V. Ryabov

Received: 3 September 2024
Revised: 24 September 2024
Accepted: 25 September 2024
Published: 27 September 2024

1. Introduction

Arthropods are a major agricultural pest, causing approximately 470 billion USD in crop production losses annually worldwide [1]. Among arthropods, mites (Arachnida: Acari) cause significant direct and indirect damage to cultivated plants, with some species contributing significantly to the rapid spread of diseases among different crops [2]. The family *Tetranychidae*, also known as the spider mite, stands out as one of the most significant pests affecting crops worldwide, as it induces chlorosis, loss of vigor, defoliation, and wilting of plants, and is considered a primary pest of several cultivated plants [3].

Tetranychid mites infest more than 4000 plant species, comprising a wide variety of commonly known and widely distributed classes [3,4]. While many of these mites are agricultural pests, only a few species within this family have been confirmed as carriers of plant viruses. For instance, the mite *Petrobia latens* has been identified as a vector for *Barley Yellow Mosaic Virus* (BaYSMV), primarily transmitted by *Polymyxa graminis* [5,6]. Likewise, *Tetranychus urticae* has been occasionally associated with the transmission of *Potato virus Y* (PVY), which is mainly vectored by aphids [7,8]. Additionally, *T. urticae* is known to vector several other viruses, including *Tobacco ringspot virus* (TRSV, primarily vectored by nematodes) [9], *Tobacco mosaic virus* (TMV, primarily transmitted mechanically) [10], *Southern bean mosaic virus* (SBMV, primarily vectored by beetles) [11], and *Cotton leaf curl virus* (CLCuV, primarily transmitted by whiteflies) [12]. Although *T. urticae* can acquire, carry, and excrete viruses during feeding, its ability to efficiently transmit these viruses is still poorly understood [13–16].

The two-spotted spider mite (*T. urticae*) is a major pest of various plant species worldwide [17–22], and several studies have investigated this mite for its biological cycle, reproductive parameters, population dynamics, survival probability, and specific fertility [23,24]. Understanding this aspects is crucial for the development of control strategies, especially as this species has been reported to affect about 1590 host plants [25]. However, the diversity of viruses infecting this significant crop pest, along with the plant pathogenic viruses it might carry, remains poorly characterized.

Here, we investigate the viral diversity of *T. urticae* by analyzing 30 publicly available RNA deep sequencing libraries. Our findings reveal a considerable diversity of new viruses and the presence of a known plant pathogenic virus, underscoring the importance of virus surveillance in spider mites, as their infestations can impact agriculture, thus posing a threat for human food security.

2. Materials and Methods

2.1. Acquisition of RNA Libraries

For this study, we conducted a comprehensive analysis to characterize the virome of the two-spotted spider mite *T. urticae*, using RNA-seq libraries available in the Sequence Read Archive (SRA) public database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). We selected a total of 30 libraries, covering a wide range of sampling conditions and geographical locations. This selection included one library of mites from a controlled laboratory environment from each RNA deep sequencing project available for *T. urticae* in the NCBI, in addition to fourteen libraries from the only two distinct projects containing field-collected mites. All 30 libraries underwent virus discovery pipeline analysis (Figure S1). Overall, these libraries were collected from *T. urticae* on different host plants, as well as field-collected mites on plants such as eggplant and bean. An overview of the libraries used can be found in Supplementary Table S1.

2.2. Identification of Endogenous Viral Elements

To distinguish between potential endogenous viral elements (EVEs) and exogenous virus species present in *T. urticae*, we screened its genome (GCF_000239435.1), which had been downloaded from the NCBI genome database. The identification process involved six steps: predicting open reading frames (ORFs), aligning sequences with a viral protein database, using Python for filtering and categorization, manually curating to remove unwanted sequences, clustering with CD-HIT (version 4.8.1) [26] to eliminate redundancy, and conducting a final alignment for validation. This pipeline methodology was previously detailed in Aguiar et al. (2020) [27]. An overview of the identified EVEs can be found in Supplementary Table S2.

2.3. Transcriptome Assembly

The analysis of public RNA-seq libraries was conducted using various bioinformatics tools, essentially following the protocol previously published by our group [28] (Figure S2). Briefly, raw reads were subjected to quality assessment using FastQC (version 0.74 + galaxy0) [29] to ensure data reliability. Subsequently, Trimmomatic (Galaxy Version 0.38.1) [30] was employed to remove low-quality reads (Phred < 20) and adapter sequences. To align the trimmed reads to the *T. urticae* genome (GCF_000239435.1), Bowtie2 (version 2.5.0 + galaxy0) [31] with default settings was used, enabling the identification and removal of host-related reads. The remaining unaligned reads were then subjected to the assembly process, utilizing SPAdes (version 3.15.4 + galaxy1) [32] with default settings.

2.4. Identification of Viral Sequences

To identify potential virus-derived contigs, a sequence similarity search was conducted using Diamond (2.0.15 + galaxy0) [33] in BlastX mode with an e-value threshold of 1×10^{-5}, utilizing the NCBI Viral RefSeq database (release 218) as a reference. These analyses were performed on the Galaxy Australia platform [34].

2.5. Manual Curation of Viral Genomes

We removed retrotransposon-related contigs using an in-house Python script that processes the output from DIAMOND by first removing any sequences with "transposon", "retroviral", or "retrovirus" in the taxon name. Afterward, this script classifies all remaining sequences using the most updated ICTV master species list and the NCBI taxonomy through an API written in Python. The curated assembled contigs were filtered based on a minimum threshold of 1500 nucleotides. Subsequently, the non-redundant filtered sequences underwent manual analysis through BlastN and BlastX searches on the NCBI's online platform. Contigs with hits showing coverage and identity greater than 90% were considered to be known virus species. Sequences with coverage greater than 20% and e-values lower than 1×10^{-3} for proteins and 1×10^{-5} for nucleotides were further analyzed. The ORFfinder software [35] was employed to predict ORFs within the sequences, while InterProscan [36] and CD-Search [37] were used to identify the presence of viral conserved domains. Contigs that lacked conserved domains similar to their best hits were excluded for further analyses. A summary of the similarity search results obtained at the nucleotide and amino acid levels for each viral sequence can be found in Supplementary Table S3.

2.6. Phylogenetic Analysis

Sequences showing similarity to genes encoding RNA polymerase or polyproteins were used for constructing phylogenetic trees. Additionally, protein sequences representing specific families, such as *Dicistroviridae*, *Nodaviridae*, *Virgaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Phenuiviridae*, *Birnaviridae*, *Qinviridae* and others within the orders Picornavirales and Reovirales, were included based on proximity and references from the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). For each set of sequences, a global alignment was performed using the MAFFT online platform [38] to ensure accurate sequence alignment. Subsequently, the IQ-TREE version 2.0.3 program [39] was used on a local server to generate a maximum likelihood phylogenetic tree, with 1000 bootstrap replicates to assess the robustness of the tree topology. The phylogenetic tree was then edited using Inkscape version 1.4.4 [40].

2.7. Transcriptional Activity of Viral Sequences

The transcriptional activity of virus-derived sequences was assessed using the Salmon software (version 0.14.1) [41]. For comparison with viral abundance, the host mitochondrial ribosomal protein L13 (rpl13) and nuclear calmodulin-1 (calmodulin) genes were selected as endogenous and standard references, respectively. An overview of the transcriptional activity of the viral sequences used in this analysis can be found in Supplementary Table S4.

3. Results

3.1. Characterization of Endogenous Viral Elements

The study of endogenous viral elements (EVEs) integrated into the *T. urticae* genome revealed two distinct sequences, 1032 nt and 1239 nt in length, which were identified through similarity searches using blastX. These EVEs showed significant similarities to nucleocapsid and nucleoprotein from elements within *Rhabdoviridae* family (see Supplemen- tary Table S2 for details). Interestingly, both sequences showed large ORFs and presented the conserved domain Rhabdo_ncapsid, which could mislead the identification of exoge- nous viral sequences. Therefore, these sequences were used as negative controls for the identification of putative exogenous sequences.

3.2. Virome Characterization

Metatranscriptomic analysis revealed a wide spectrum of viral sequences, leading us to conduct a more detailed investigation of the samples to determine the presence of exoge- nous viruses. Therefore, we performed comprehensive sequence similarity searches against non-redundant nucleotide and protein databases of NCBI. This analysis identified several putative viral sequences, including positive single-stranded RNA viruses (ssRNA+), nega- tive single-stranded RNA viruses (ssRNA−), and double-stranded RNA viruses (dsRNA) (Figure 1A and Supplementary Table S3).

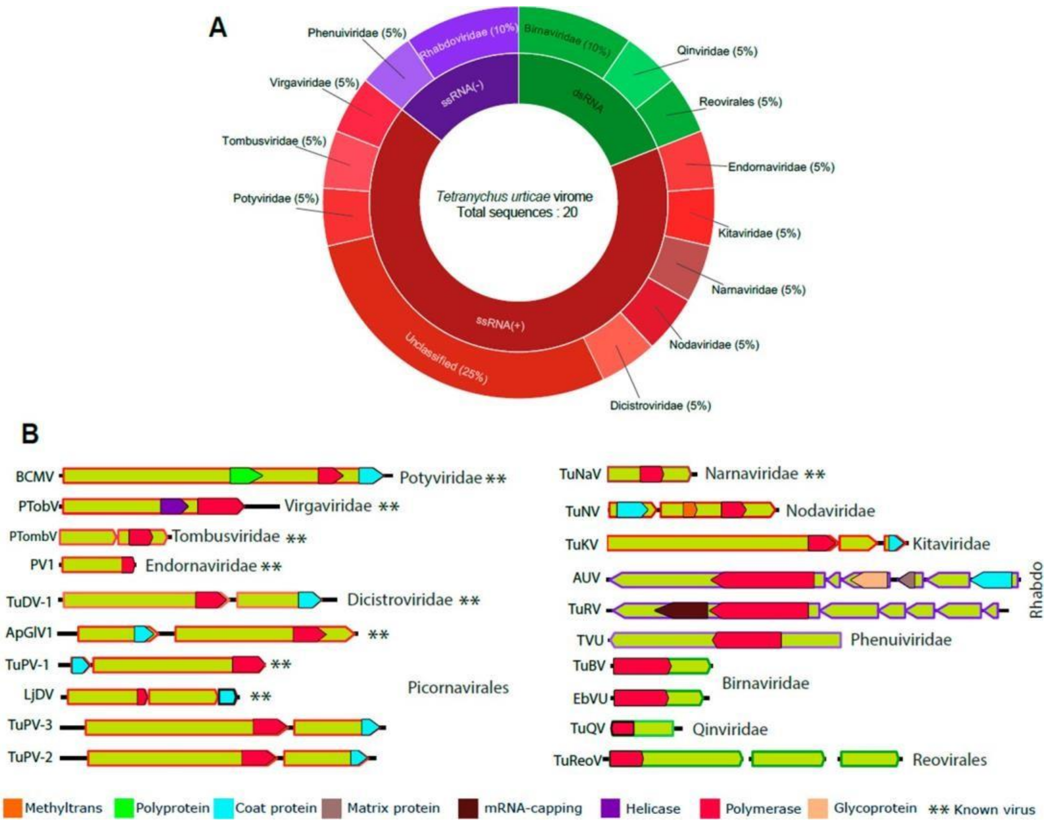

Figure 1. Diversity and genomic characterization of *Tetranychus urticae*-associated viruses. (**A**) Sunburst plot representing the viral diversity (20 sequences) characterized in *T. urticae*. The inner ring represents the viral genome composition, followed by the representation of the viral taxons to which the sequences belong. In total, 20 sequences were found, including Picornavirales: 5; *Dicistroviridae*: 1; *Potyviridae*: 1; *Virgaviridae*: 1; *Tombusviridae*: 1; *Endornaviridae*: 1; *Narnaviridae*: 1; *Nodaviridae*: 1; *Kitaviridae*: 1; *Rhabdoviridae*:

2; *Phenuiviridae*: 1; *Birnaviridae*: 2; *Qinviridae*: 1; and Reovirales: 1. (**B**) Genomic characteristics and conserved domains of the identified viral sequences. The sequence length is determined by the line extension, while the open reading frames (ORFs) are represented by the green box and conserved domains in different colors according to its putative function. The identified viruses include the following: *Bean common mosaic virus* (BCMV), Plant-associated tobamo-like virus 1 (PTobV), Plant-associated tombus-like virus 2 (PTombV), *Phaseolus vulgaris alphaendornavirus 1* (PV1), *Aphis glycines virus 1* (ApGlV1), *Ljubljana dicistrovirus 1* (LjDV), Tetranychus urticae picorna-like virus 1-3 (TuPV-1-3), Tetranychus urticae dicistro-like virus 1 (TuDV-1), Tetranychus urticae-associated narnavirus (TuNaV), Tetranychus urticae noda-like virus (TuNV), Tetranychus urticae kita-like virus (TuKV), Tetranychus urticae rhabdo-like virus (TuRV), Alphapaprhavirus urticae (AUV), Tetranychus urticae birnavirus (TuBV), Entomobirnavirus urticae (EbVU), Tetranychus urticae qin-like virus (TuQV) and Tetranychus urticae reo-like virus (TuReoV). Previously characterized viral species are indicated by (**).

At the family level, the ssRNA (+) genomes included representatives from the families *Tobamoviridae*, *Tombusviridae*, *Potyviridae*, *Dicistroviridae*, *Narnaviridae*, *Nodaviridae*, *Kitaviridae*, and others within the order Picornavirales. For the ssRNA(−) genomes, elements from the families *Rhabdoviridae* and *Phenuiviridae* were observed. The dsRNA viral viruses identified are related to elements from *Birnaviridae* and *Qinviridae* families and the Reovirales order (Figure 1A and Supplementary Table S3).

3.2.1 Characterization of Known Viruses

Nine of the assembled contigs showed sequence similarity to previously characterized viral species of greater than 90% at both the nucleotide and amino acid levels. The first contig, 10,013 nt long, presented a complete polyprotein ORF of 9609 nt. This ORF displayed the same domains as the potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV), its closest hit. The domains included ps-ssRNAv_Potyviridae_RdRp, the Poty_coat superfamily, and the Poty_PP superfamily (Figures 1B and S3). Accordingly, this sequence was identified as a strain of the BCMV. The second contig, 6603 nt long, is related to an unclassified tobamovirus, encoding to a large ORF of 5436 nt and presenting the same domains as its closest match, Plant-associated tobamo-like virus 1 (PTobV), including the Virgaviridae_RdRp and Helicase domains (Figure S3). The third contig, 3348 nt long, contained two ORFs of 1686 and 1458 nt, and displayed the same domains as its closest hit, Plant associated tombus-like virus 2 (PTombV), including the Tombusviridae_RdRp domain (Figures 1B and S3).

A narnavirus-related contig, 2704 nucleotides in length, showed over 90% nucleotide identity with its closest match, the Tetranychus urticae-associated narnavirus. This contig contains a 2487-nucleotide ORF that encodes only the ps-ssRNAv_Narnaviridae_RdRp domain (Figures 1B and S3). Another contig displayed a high nucleotide identity of 99.82% to *Phaseolus vulgaris alphaendornavirus* 1 (PV1). This contig, 1623 nucleotides long, contains an incomplete 1503-nucleotide ORF and features the Endornaviridae_RdRp domain (Figures 1B and S3).

The remaining four contigs, ranging from 2704 to 9009 nucleotides in length, showed over 90% nucleotide identity to known picornaviruses, including Tetranychus urticae-associated dicistrovirus 1 (TuDV-1), Tetranychus urticae-associated picorna-like virus 1 and (TuPV-1), Aphis glycines virus 1 (ApGlV1), and Ljubljana dicistrovirus 1 (LjDV) (Figures 1B and S3). All contigs contained two complete ORFs, featuring the ps-ssRNAv-Picornavirales and coat protein domains (Figures 1B and S3). These viruses were subsequently classified as new strains of their closest matches and were not included in the phylogenetic analysis.

3.2.2 Characterization of Novel Viruses

Order Picornavirales

Two assembled contigs showed amino acid-level similarities with members of the order Picornavirales. The contigs, 9495 and 9770 nt long, represented complete coding sequences (two ORFs) according to the closest viral species. The larger ORF displayed conserved polymerase domains, whereas the second ORF displayed conserved capsid-related domains typical of picornaviruses. These contigs had the same conserved domains as their closest viruses, as detailed in Figures 1B and S3. The polymerases were subjected to phylogenetic analysis, and the two contigs clustered within unclassified Picornavirales viruses (Figure 2). They were subsequently named Tetranychus urticae picorna-like virus 2 (TuPV-2) and Tetranychus urticae picorna-like virus 3 (TuPV-3).

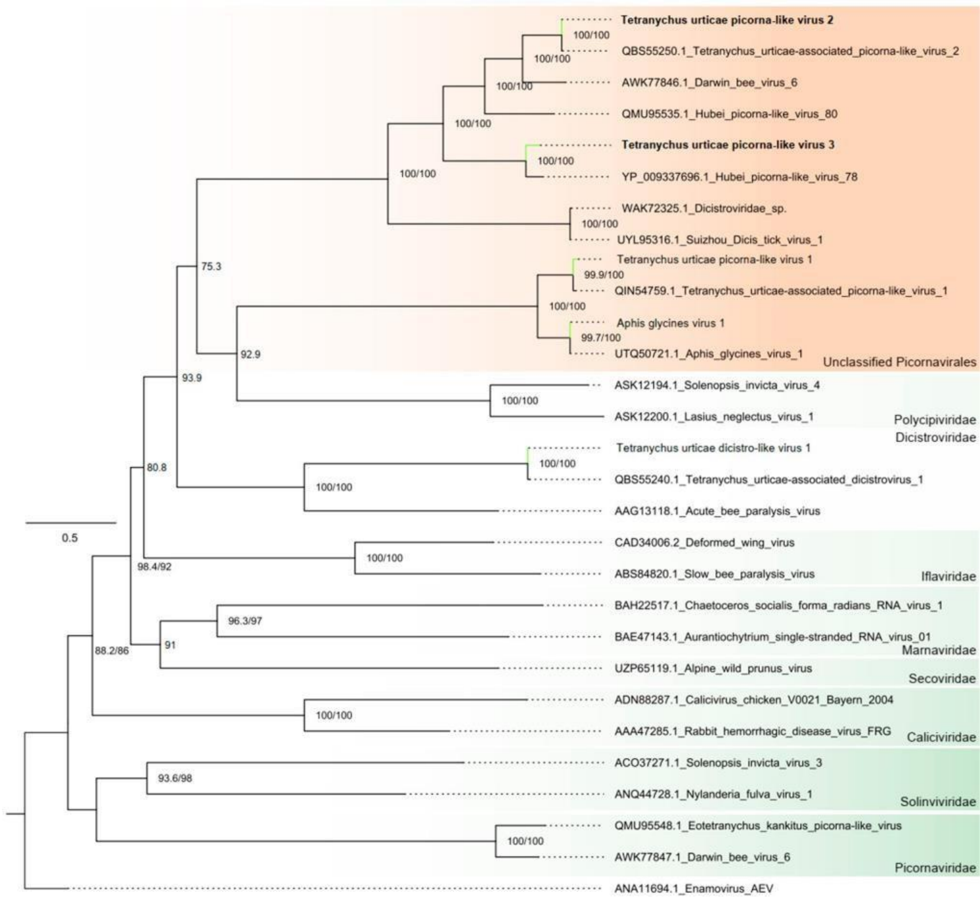

Figure 2. Phylogenetic reconstruction of assembled sequences related to the Picornavirales order: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+F+R4 evolutionary model and 1000 bootstrap pseudoreplicates. To root the tree, one sequence of ssRNA+ Enamovirus from the *Solemoviridae* family was used as outgroup.

Nodaviridae

One assembled contig showed amino acid-level similarity with members of the *Nodaviridae* family. Spanning 5091 nt, the sequence presented two complete ORFs. The first, 3435 nt long, displayed three conserved domains: RNA-directed RNA polymerase catalytic domain (IPR007094), RNA-directed RNA polymerase C-terminal domain (IPR001205), and Nodavirus methyltransferase domain (IPR043647), overlapping the homologous DNA/RNA polymerase superfamily (IPR043502). The second ORF, 1410 nt long, showed only one homologous superfamily, viral coat protein subunit (IPR029053) (Figures 1B and S3). Phylogenetic analysis grouped the assembled sequence with unclassified elements from the *Nodaviridae* family. Therefore, this sequence was named Tetranychus urticae noda-like virus TuNV (Figure 3).

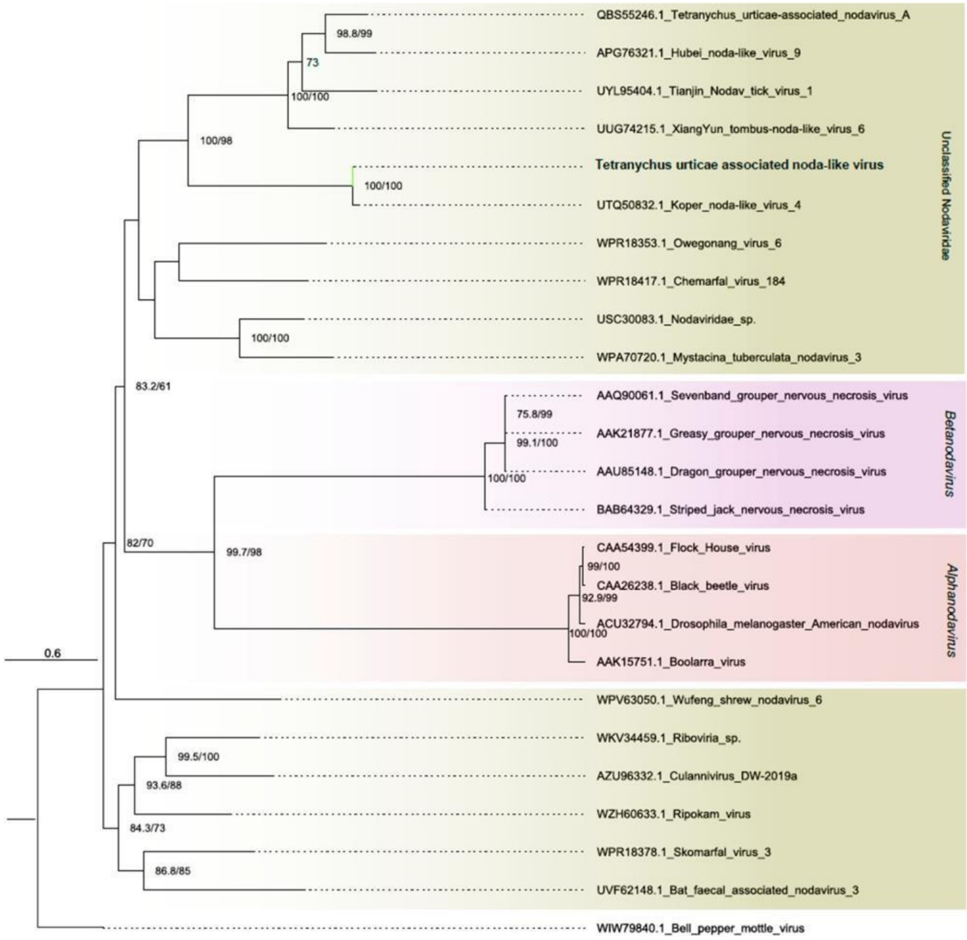

Figure 3. Phylogenetic analysis of nodavirus-related sequence: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+F+I+G4 evolutionary model and 1000 bootstrap pseudoreplicates. To root the tree, sequence of ssRNA+ *Bell pepper mottle virus* from the *Virgaviridae* family was used as outgroup.

Kitaviridae

One assembled contig was related to members of the *Kitaviridae* family. The contig, spanning 9052 nt, exhibited three complete and large ORFs. The first of these, which was 6963 nt long, showed two conserved domains: RNA-dependent RNA polymerase alsuviricetes (IPR001788) and RNA-directed RNA polymerase catalytic domain (IPR007094), overlaid with the homologous DNA/RNA polymerase superfamily (IPR043502). The second, with a length of 1134 nt, encodes to coat protein domains, while the third did not present conserved domains (Figures 1B and S3). Phylogenetic analysis showed that this sequence clustered with unclassified kitaviruses (Figure 4). Accordingly, this virus was named Tetranychus urticae kita-like virus (TuKV).

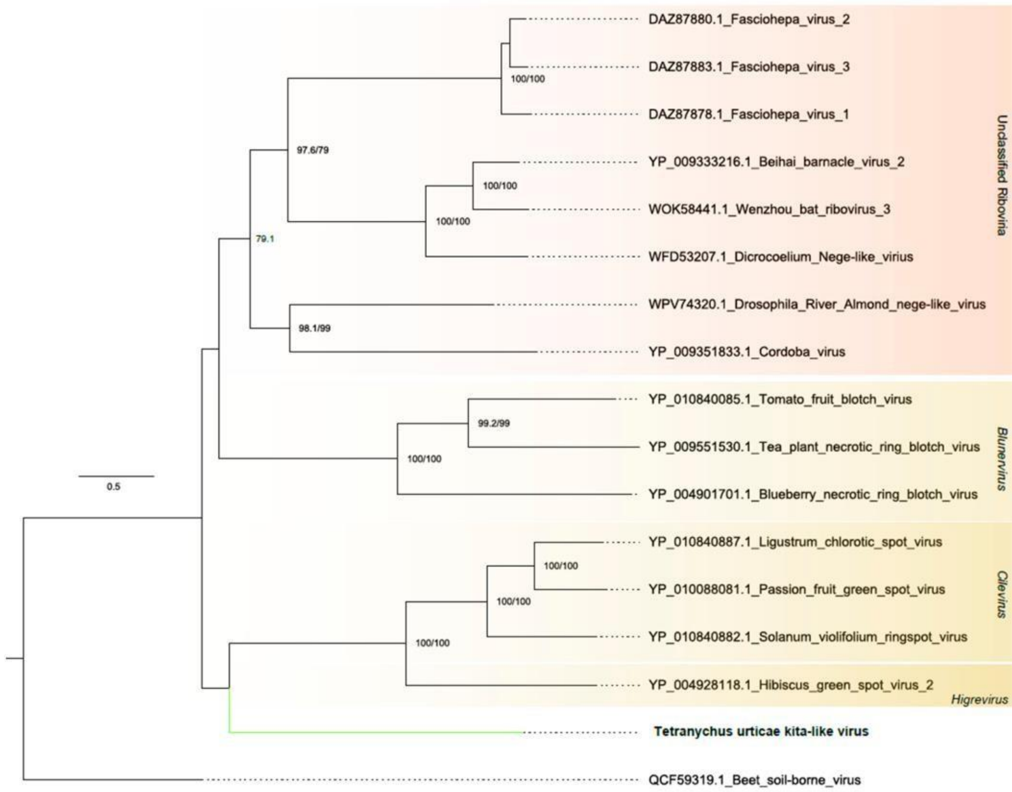

Figure 4. Phylogenetic analysis of kitavirus-related sequence: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+F+R5 evolutionary model and 1000 bootstrap pseudoreplicates. To root the tree, one sequence of ssRNA+ *Middelburg virus* from the *Togaviridae* family was used as outgroup.

Rhabdoviridae

Two assembled contigs showed similarity at the amino acid level with members of the *Rhabdoviridae* family (Figures 1 and S3). The first contig, 12,459 nt long, primarily consisted of five large ORFs ranging from 753 to 6474 nt. It exhibited conserved Rhabdovirus-related domains, including the Mononeg_RNA_pol superfamily, the Rhabdo_glycop superfamily, the Rhabdo_ncap superfamily, and the Vesiculo_matrix superfamily (Figure 1B). The genomic structure of the viruses resembled the known virus, Vesicular stomatitis New Jersey virus (Figure S3). Use of the RdRp, phylogenetic analysis indicated that the virus is closely related to unclassified *Rhabdoviridae* viruses (Figure 5).

The second contig, 12,072 nt long, encodes to five large ORFs ranging from 813 to 6213 nt. Similar to the previous sequence, this contig presented Rhabdovirus-related conserved domains, such as the Mononeg_RNA_pol superfamily, the Mononeg_mRNAcap superfamily, the paramyx_RNAcap superfamily, and the Rhabdo_ncap_2 superfamily (Figure 1B). Phylogenetic analysis grouped the virus within a group of unclassified *Rhabdoviridae* viruses (Figure 5). These new viruses were named as Tetranychus urticae rhabdo-like virus (TuRV) and Alphapaprhavirus urticae (AUV).

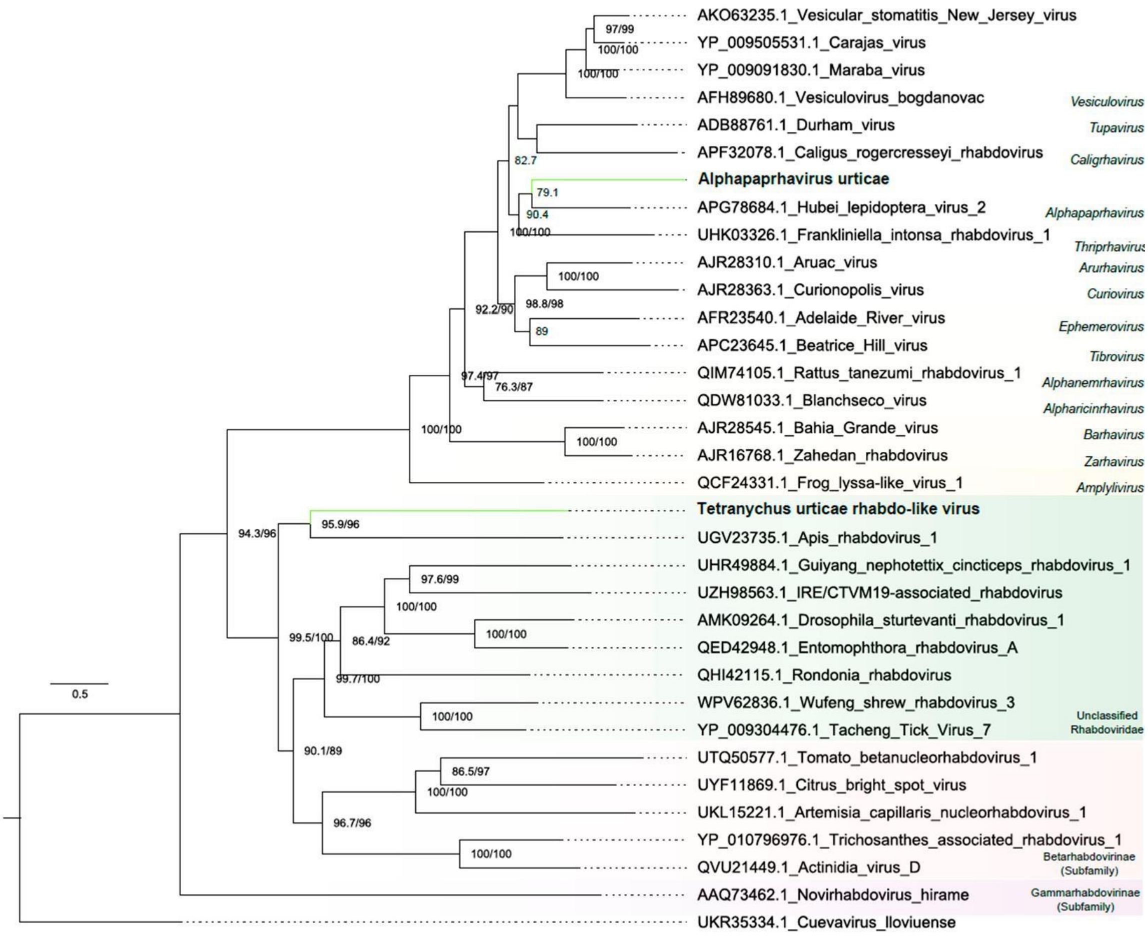

Figure 5. Phylogenetic analysis of rhabdoviral sequences: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+F+R7 evolutionary model and 1000 bootstrap pseudoreplicates. To root the tree, one sequence of *Cuevavirus lloviuense* from the *Filoviridae* family was used as outgroup.

Phenuiviridae

We identified one contig related to members of the *Phenuiviridae* family (Figures 1B and S3). This family is composed of negative stranded three-segmented viruses encoding the pro- teins L, which encodes the viral RNA polymerase; glycoproteins; and the proteins S, M and nucleocapsid (N) [42]. However, in this analysis, we only found the segment linked to RdRp. The contig, 7514 nt long, exhibited a complete ORF of 7440 nt encoding to RNA- directed RNA polymerase, negative-strand RNA virus (IPR007099), RNA-directed RNA polymerase L, N-terminal (IPR029124), and RNA-dependent RNA polymerase, bunyaviral (IPR007322) domains. Phylogenetic analysis revealed that the assembled viral sequence clustered with elements classified in the Tanzavirus genus within the *Phenuiviridae* family (Figure 6). This viral sequence was named Tanzavirus urticae (TVU).

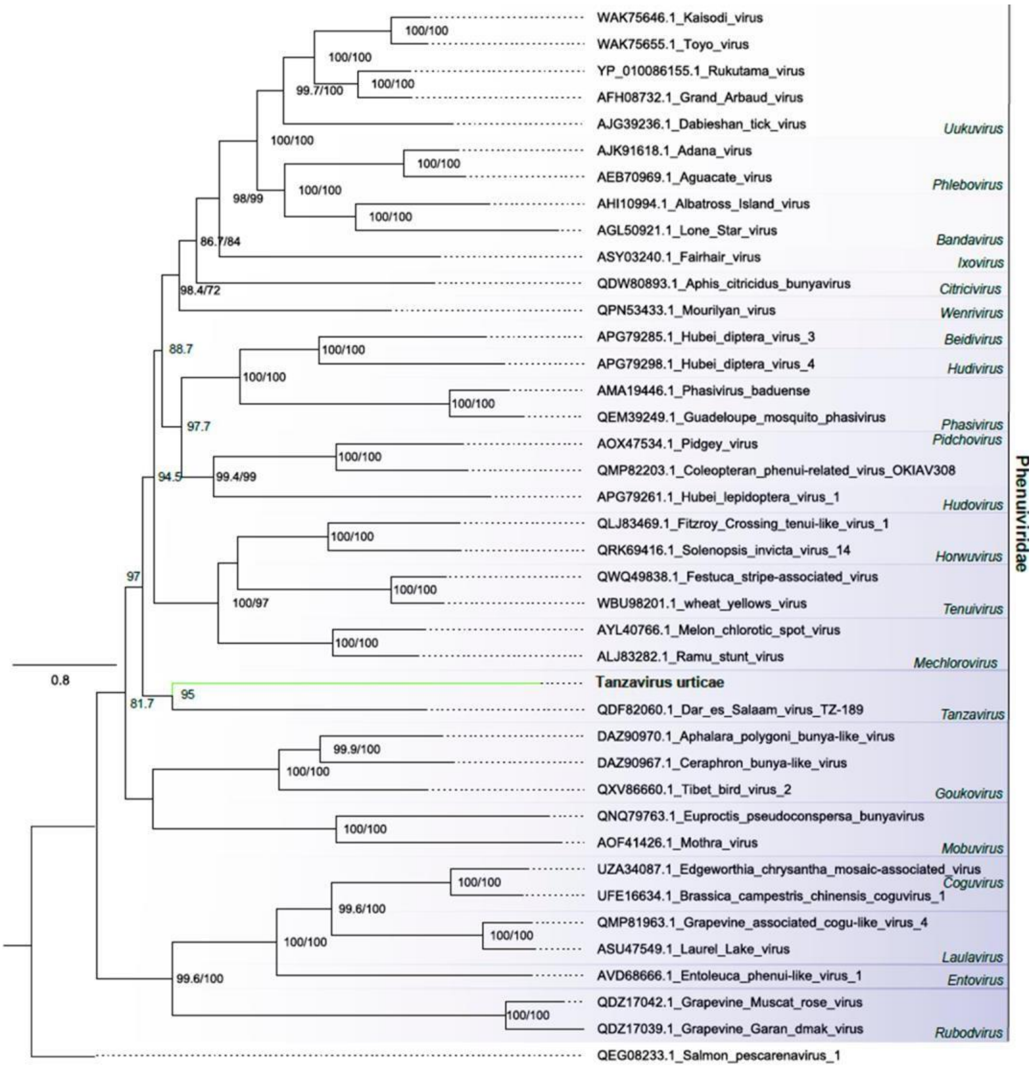

Figure 6. Phylogenetic analysis of the phenuivirus-related sequence: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+F+R6 evolutionary model and 1000 bootstrap pseudoreplicates. To root the tree, one sequence of Salmon pescarenavirus 1 from the *Arenaviridae* family was used as outgroup.

Birnaviridae

Two contigs, one 3061 and the other 2950 nt long, were found to be related to mem- bers of the *Birnaviridae* family, which are composed of two genomic segments: Segment A, encoding five to six proteins and Segment B, encoding the RdRp [43]. Unfortunately, we only identified the RdRp segment (Segment B) for both putative viruses. The two contigs contained complete ORFs of 2892 nt and 2646 nt, respectively. They displayed the Birna_RdRp_palm superfamily conserved domains, resembling their closest matches, *Drosophila melanogaster birnavirus* and Tetranychus urticae-associated entomobirnavirus (Figures 1B and S3). In phylogenetic analysis, one viral sequence clustered with unclassified members of the *Birnaviridae* family, while the other grouped with viruses within the Entomobirnavirus genus (Figure 7). Accordingly, they were named Tetranychus urticae-associated birnavirus (TuBV) and Entomobirnavirus urticae (EbVU).

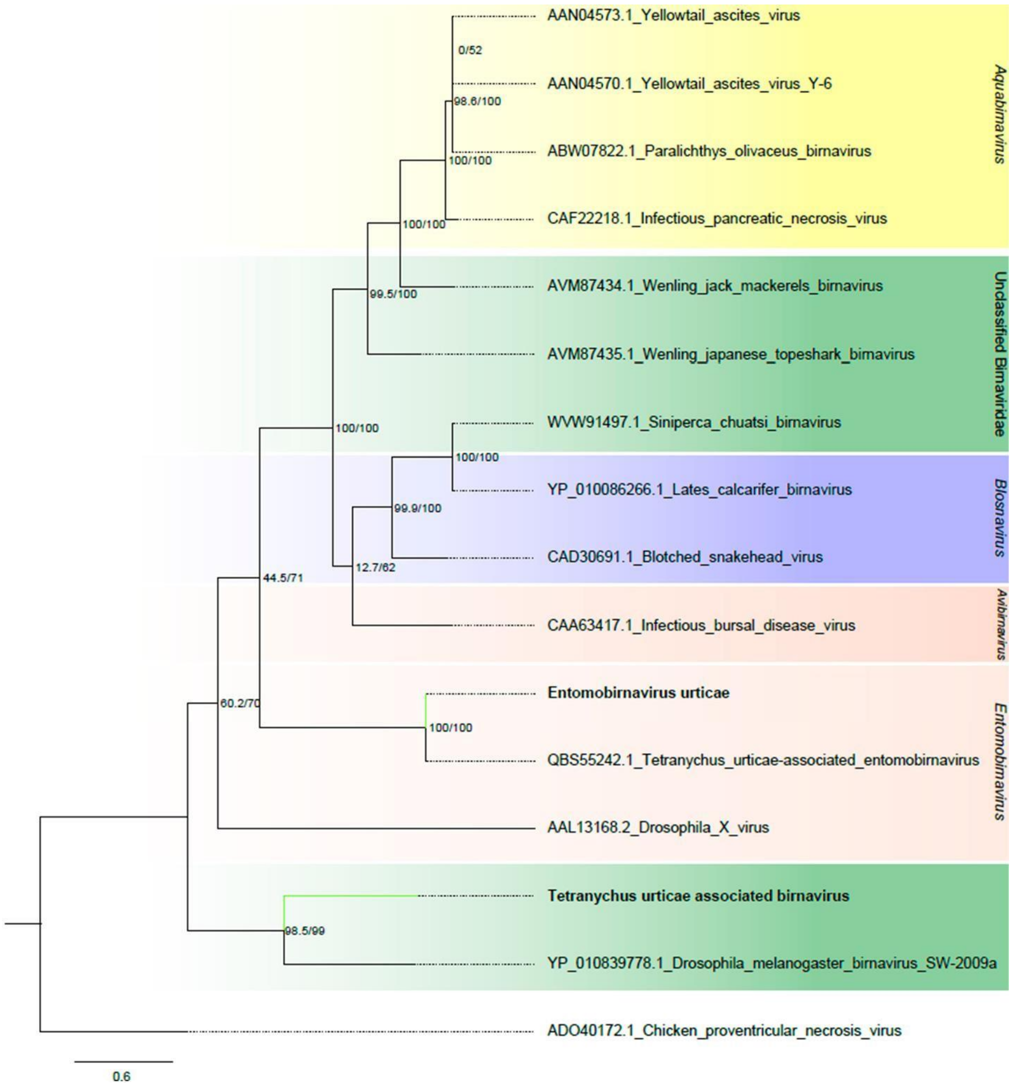

Figure 7. Phylogenetic analysis of birnavirus-related sequences: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+I+G4 evolutionary model and 1000 boot- strap pseudoreplicates. To root the tree, one sequence of *Chicken proventricular necrosis virus,* an unclassified birnavirus, was used as outgroup.

Qinviridae

One of the assembled contigs showed sequence similarity at the amino acid level with viruses within the *Qinviridae* family. The contig, 2163 nt long, contained an incomplete ORF of 1875 nt, encoding to a Mononeg_RNA_pol superfamily domain (Figures 1B and S3). Phylogenetic analysis indicated that the sequence clustered with unclassified *Qinviridae* viruses (Figure 8). The viral species was named Tetranychus urticae-associated qin-like virus (TuQV).

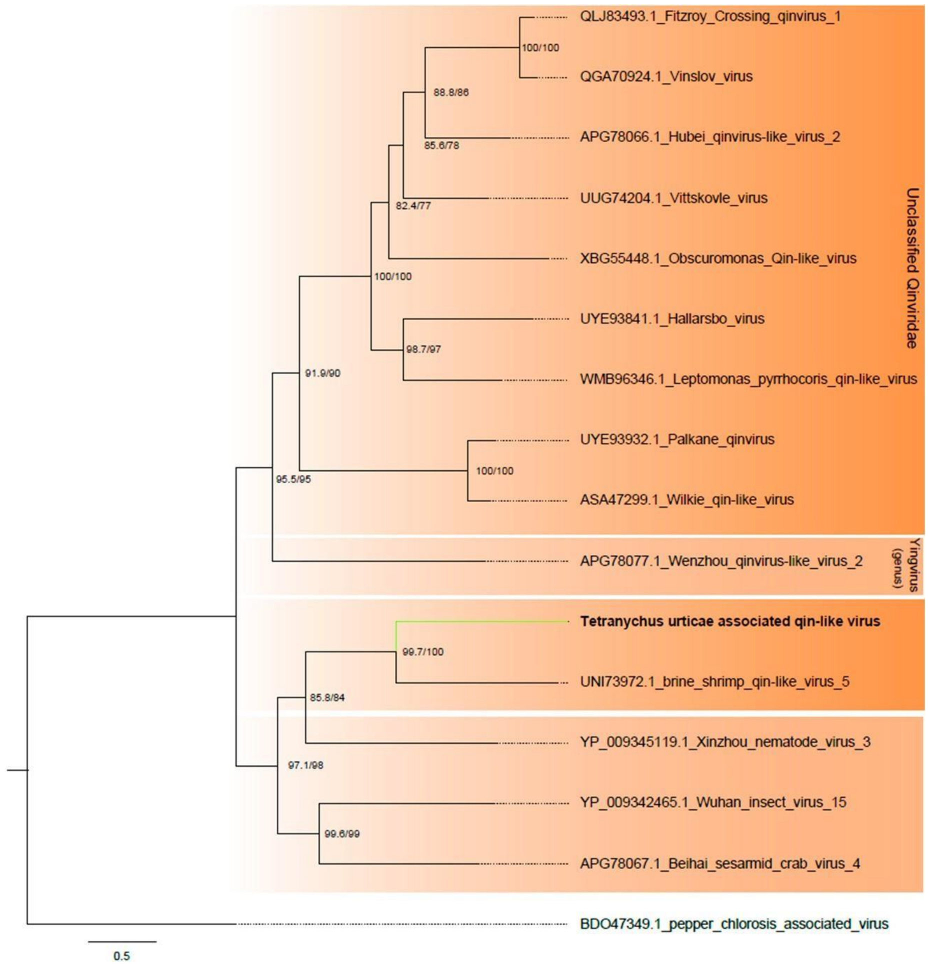

Figure 8. Phylogenetic analysis of the qin virus-related sequence: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+F+R4 evolutionary model and 1000 boot- strap pseudoreplicates. To root the tree, one sequence of pepper chlorosis-associated virus from the family *Aspiviridae* was used as outgroup.

Reovirales

The last three contigs were related to viruses within the Reovirales order, which consists of nonenveloped viruses with dsRNA genomes comprising 9–12 segments [44]. However, in this analysis we detected only three complete segments. One segment was 4194 nt long and contained a complete ORF of 3969 nt that exhibited the RdRP-N (IPR054006) domain. The other two segments displayed sequence similarity to hypothetical protein and NTP-binding domain proteins of reoviruses, but did not contain conserved domains, similar to their best hits (Figures 1B and S3). Phylogenetic analysis based on the RdRp protein grouped the sequence with unclassified Reovirales viruses (Figure 9). The putative virus was named Tetranychus urticae-associated reo-like virus (TuRV).

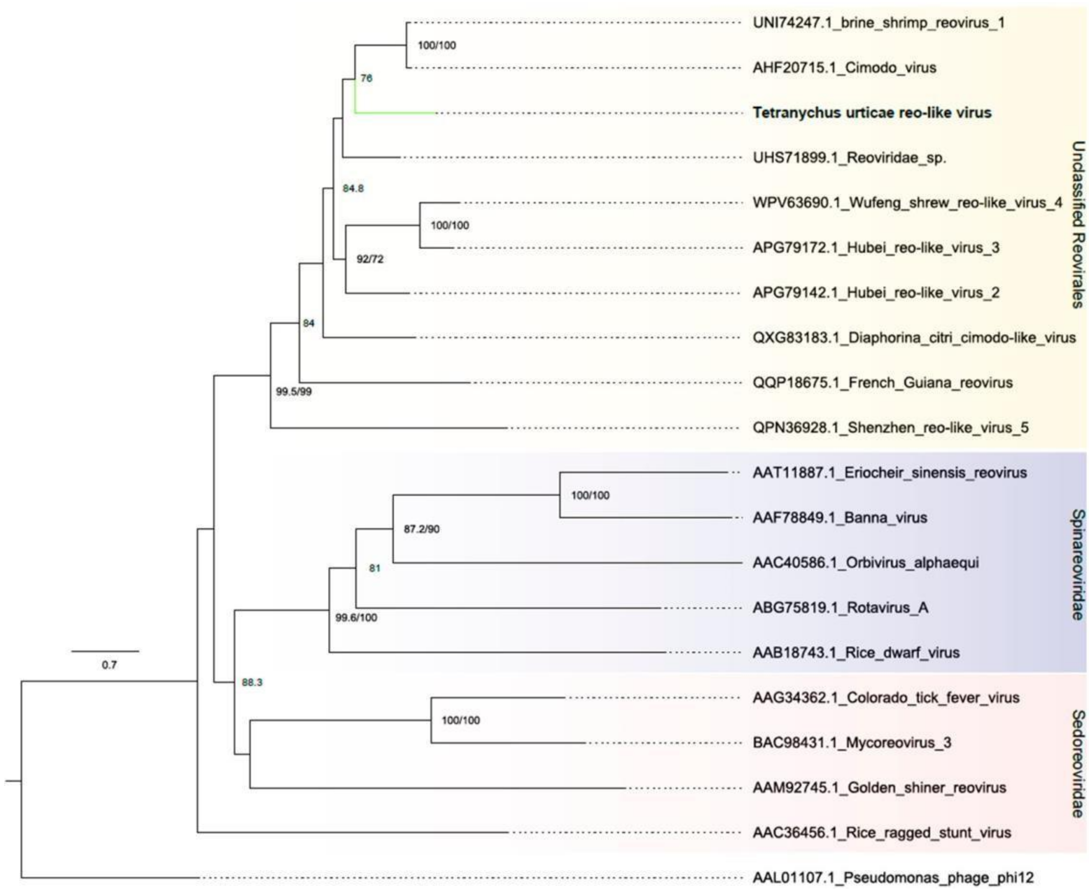

Figure 9. Phylogenetic analysis of reovirus-related sequence: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using full-length amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was generated using IQ-TREE with the LG+F+R5 evolutionary model and 1000 bootstrap pseudoreplicates. To root the tree, one sequence of *Pseudomonas phage phi12* from the *Cystoviridae* family was used as an outgroup.

3.3. Transcriptional Activity and Widespread of Viral Sequences

After characterizing the putative new viral sequences, we determined their transcriptional activity by quantifying the viral transcripts alongside constitutive host marker genes. Most of the examined sequences exhibited transcriptional activity with equal or higher abundance than the constitutive genes. Notably, all sequences displayed transcriptional activity in at least two distinct libraries, except for TuQV and AUV. The first virus was only detected in a field-collected sample from the United Kingdom, while AUV was only found in a sample from controlled environment population from Belgium (Figure 10).

The TuDV-1, TuKV, TuPV-1, and Ljubljana viruses showed abundances 10–20 times higher than the constitutive genes, while the TuNaV, TuNV, and TuQV viruses showed RNA levels lower than the host calmodulin and rpl13 genes. It is important to note that the TuKV, TuDV-1, TuRV, ApGlV1 and TuPV-3 viruses showed transcriptional activity in distinct libraries from different projects, locations, and sample conditions, which indicates that they are likely components of the *T. urticae* resident virome (Figure 10).

After evaluating the abundance of *T. urticae*-associated viruses, we analyzed the RNA coverage profile for the identified BCMV and PV1 viral sequences, due to their agricultural importance. Our findings reveal that both viruses displayed coverage from both genomic and antigenomic strands along their entire length (Figure S4). Two Belgian samples exhib- ited the highest viral species diversity in the study, both in field and laboratory populations. In contrast, the samples with the least viral diversity were from field populations in Greece and laboratory populations in China and Belgium (Figure 10).

Regarding the viral sequence distribution, a higher number of viral sequences were found within libraries from mite control populations, while libraries from mite field populations contained fewer viral sequences. Despite this subtle difference, the viruses present in both populations depicted a similar abundance (Figure 10).

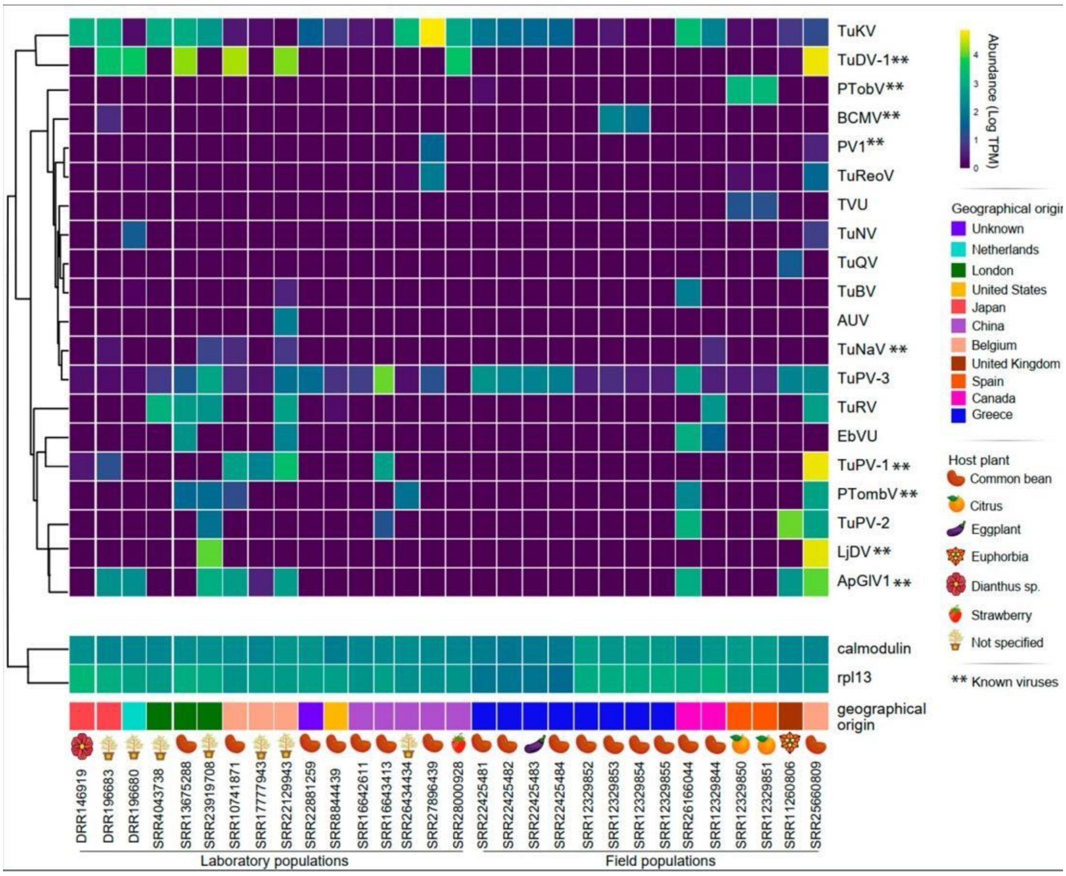

Figure 10. Assessment of the transcriptional activity of *Tetranychus urticae*-associated viruses. Heatmap representing the transcriptional activity of identified viral sequences in *T. urticae*-derived samples. The color spectrum reflects transcription levels, ranging from high (yellow) to low (blue). The heatmap employs row clusterization based on Pearson correlation to group sequences with similar profiles. The abundance was normalized by transcripts per million (TPM) and plotted in log10 scale. Samples are separated by laboratory populations and field populations with respect to geographical location and the host plant from which mites were collected.

4. Discussion

Metatranscriptomics has become an important scientific approach aimed at unraveling the complex ecosystems that drive life on the planet, significantly contributing to the current understanding of the interaction between micro-organisms and their hosts. Considering the study of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, an important agricultural pest, the metatranscriptomic analysis of RNA-seq data obtained from 30 publicly available libraries in the NCBI shed light on the virome of this mite in different countries, plant hosts and under various conditions. Surprisingly, the viral diversity that was found encompasses a wide variety of RNA viruses, including families often associated with plant pathogenesis.

As a result of this approach, and with regard to the known viral species from plant-infecting viral families, three unclassified virus members of the *Virgaviridae*, *Tombusviridae* and *Endornaviridae* families were identified, along with the potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV), which is a major bean pathogen that can cause up to 80% yield loss. These viral families assume significant importance due to their diversified impact on a variety of economically valuable crops, including beans, tomatoes, peanuts, cucumbers, peas, and several others [45–48].

Expanding on the topic, the common bean, the host of BCMV [49] and PV1 [50], is among the best-known legume crops in human nutrition, with more than 300 million people worldwide dependent on them as a primary source of dietary protein. In 2015, the estimated harvested area of bean crops was 27 million hectares, producing nearly 29 million tons of dry beans [51,52]. BCMV-infected beans can experience yield losses of up to 80% [53]. Crops such as beans, potatoes, tomatoes, cucumbers, peanuts, and others are highly susceptible to diseases caused by viruses [45,48,54]. The most significant symptom of virus infections in these plants is the yellowing of leaves or the mosaic pattern of light and dark green shades, along with wilting, fruit drying, and plant death [55]. It is also important to note that viruses within the *Potyviridae*, BCMV viral family have been reported to be transmitted by mites [7,56,57]. PV1 is a persistent virus [50]. Unlike acute viral infections that typically cause pronounced symptoms and can be lethal to the host [58], persistent viruses like PV1 establish long-term associations with their hosts [59]. The complete effects of PV1 on its host are not fully elucidated, but some studies suggest that PV1 may have potential beneficial effects and has been associated with improved seed germination and increased seed weight, which could confer an advantage to infected plants in terms of reproductive success and competitive ability [60]. Additionally, persistent endornaviruses have not been reported to be transmitted horizontally [59,61].

Regarding the known mite-borne viral species, TuPV-1 is emerging as a candidate because it is part of the resident virome of *T. urticae*. The detection of TuPV-1 in distinct *T. urticae* populations from geographically separate locations further supports the hypothesis that this virus is consistently associated with this species [55]. However, the current data are insufficient to conclusively define its position as a resident virus, and further investigation is necessary to clarify the potential evolutionary relationships among this virus and mites.

Among the newly identified viral species, some were classified within the Picornavirales order. These viruses typically possess monocistronic genomes, containing a single open reading frame that encodes a large polyprotein. However, the *Dicistroviridae* family is an exception; its RNA genome is dicistronic, featuring two non-overlapping ORFs separated by an intergenic untranslated region (IGR). The first ORF encodes replication proteins, while the second ORF encodes structural proteins. These characteristics were also observed in the TuPV-2 and TuPV-3 viruses identified in this study. Notably, viruses in the Picornavirales order are primarily known for their affinity with invertebrates (*Dicistroviridae* and *Iflaviridae*), vertebrates and plants (*Secoviridae* and *Picornaviridae*) and algae (*Marnaviridae*). This unique characteristic has sparked interest in the potential of some families in terms of their application to the development of biological control strategies aimed at managing populations of insect pests [62].

TuNV is similar to members of the *Nodaviridae*, which is a family of small, non-enveloped viruses with bipartite genomes of ssRNA (+). The virions are non-enveloped and have a spherical shape. The genome consists of two molecules of ssRNA (+), RNA1 and RNA2. RNA1 encodes protein A, an RNA-dependent RNA polymerase, while RNA2 encodes protein α, the precursor of the capsid protein. Alphanodaviruses infect insects, while betanodaviruses are pathogens of fish [63,64].

The viruses of the *Kitaviridae* family are characterized by their ssRNA (+), typically ranging in size from 6 to 8 kb. These genomes are organized so as to encode a replication-associated protein and a coat protein. It is known that crops infected by this virus tend to develop non-systemic diseases where only locally infected tissues show atypical chlorotic and/or necrotic lesions [65,66], which affect the aesthetics of the product and consequently its sale. In the virome of *T. urticae* (Acari, Tetranychidae), our results show the presence of a new virus with transcriptional activity, belonging to the *Kitaviridae* family, which has not yet been classified, and which has been named Tetranychus urticae kita-like virus (TuKV), in mites that were collected in the field and in the laboratory. This result is relevant because the viruses of the *Kitaviridae* family that infect plants of economic importance, such as citrus, tomato, passion fruit, tea and blueberry, are transmitted by eriophid mites and some species of mites of the genus Brevipalpus (Acari, Tenuipalpidae) in a persistent way, which means that once a mite acquires the virus, it can transmit it for the rest of its life [67,68].

Tetranychus urticae- rhabdo-like virus (TuRV) and Alphapaprhavirus urticae (AUV) were classified into the *Rhabdoviridae* family, which ecologically consists of a diverse group of viruses that infect terrestrial and aquatic vertebrates, invertebrates, and plants. They include many pathogens of importance to public health, agriculture, and fisheries [69]. Additionally, they primarily contain non-segmented negative-sense single-stranded RNA (ssRNA −) genomes, with lengths ranging 11–16 kb. The basic genome organization shared by all rhabdoviruses includes five canonical genes encoding (3′ to 5′) the nucleoprotein (or nucleocapsid protein, N), the phosphoprotein (P), the matrix protein (M), the glycoprotein (G), and the large protein (L, RNA-dependent RNA polymerase) [69]. Studies that have included host genome mass sequencing have revealed the integration of rhabdovirus-like elements into the genomes of some arthropods and plants, suggesting an ancient evolutionary origin and a long-standing association of rhabdoviruses with their hosts [70]. Indeed, these findings correlate with the endogenous and exogenous rhabdoviruses' viral sequences found in *T. urticae*.

The *Phenuiviridae* family harbors viruses that infect three kingdoms of host organisms: animals, plants, and fungi, which is rare among known viral families [71]. Multiple phenuiviruses are highly pathogenic to humans, animals, or plants [63]. They impose heavy global burdens on human health, the livestock industry, and agriculture. Phenuiviruses are characterized by their segmented (ssRNA−) genome. This genome is organized into three distinct segments, each with specific functions. Segment L encodes the RdRp and is about 6.4 kb in length. Segment M encodes the glycoprotein and is about 3.2 kb in length. Lastly, segment S encodes the nucleocapsid protein and is about 1.7 kb in length [42]. Our Tanzavirus urticae virus shares similar structural and genetic characteristics with *Phenuiviridae*.

Birnaviridae and *Qinviridae* are two distinct families of non-enveloped, bi-segmented double-stranded RNA viruses that typically infect invertebrates [43,72]. The order Reovirales, on the other hand, encompasses a wider variety of viruses with more diverse genome structures ranging from 9 to 12 segments. This segmented nature, a hallmark of Reovirales, allows for genetic reassortment during co-infection, potentially leading to the emergence of new viral strains [73]. The Tetranychus urticae-associated birnavirus, Entomobirnavirus urticae, Tetranychus urticae qin-like virus and Tetranychus urticae reo-like virus viruses found in our study share the same characteristics as the *Birnaviridae* and *Qinviridae* families, and the Reovirales order.

We meticulously investigated the transcriptional activity of various sequences and, interestingly, all viruses displayed signs of transcriptional activity. Except for TuQV and TuRV-2, found only in one library, each sequence was identified in a minimum of two libraries, with the TuDV-1, TuKV, TuPV-1 viruses being the most frequently detected. On the other hand, TuNV, TuQV and NVU were the least widespread, found in just two libraries. Additionally, both BCMV and PV1 displayed high coverage on their genome and antigenome. This observation suggests that active viral replication is occurring within the mite, as single-stranded viruses produce a complementary strand in order to replicate [74]. The viral diversity of laboratory and field-collected mites did not show a clear difference. Interestingly, Belgian-derived samples in both conditions displayed similar outcomes in terms of the number of viral species. However, none of these viruses were found exclusively in Belgian samples; they were also widespread in samples from other countries. Conversely, two field-collected samples from Greece displayed only one viral species, TuPV-3, which, along with TuKV, is one of the most widespread viruses.

Overall, five viruses in this study were characterized within viral families known to infect plants, including *Potyviridae* [54], *Virgaviridae* [45], *Tombusviridae* [57], *Endornaviri- dae* [50], and *Kitaviridae* [75]. Mite transmission of viruses within these families has been reported [76–79], highlighting the importance of studying *T. urticae* as a potential phy- topathogen transmitter. For instance, the presence of *Bean common mosaic virus* in *T. urticae* emphasizes the potential impact on bean agriculture, as the BCMV is known to cause severe yield losses and quality reduction in bean crops. The transmission of these viruses by *T. urticae* could exacerbate the challenges faced by farmers in managing viral diseases in beans, potentially leading to severe yield losses and quality reduction. Conversely, it could also improve crop quality production, which is a crucial source of dietary protein for millions of people worldwide.

The two-spotted spider mite, *T. urticae*, is a significant agricultural pest, feeding on about 1600 plant species and causing substantial economic losses to several crops. Our study explored the virome of *T. urticae*. Interestingly, the analysis of 14 libraries from field mite projects, compared with 16 libraries from other diverse projects, did not reveal significant differences. This observation may be attributed to variations in the geographical locations from which the control samples were obtained. This study reveals the potential plant pathogenic viral diversity associated with *T. urticae* and highlights the potential for this mite pest to transmit viral infections into various crops [80].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/v16101532/s1, Figure S1: *T. urticae* RNA-seq libraries acquisition flowchart; Figure S2: *Tetranychus urticae* virome characterization pipeline; Figure S3: Genome characteristics and conserved structures of characterized known viral sequences; Figure S4: RNA density plot; Table S1: Table summarizing essential information for all utilized libraries; Table S2: Table summarizing the outcomes of EVE characterization analyses; Table S3: Table summarizing the outcomes of BLASTN and BLASTX alignments for viral contigs, including details such as alignment subjects, percentage identity, and E-values; Table S4: Table presenting the transcripts per million TPM values.

Author Contributions: Conceptualization, E.R.G.R.A. and A.R.O.; methodology, A.G.d.S. and L.Y.M.F.; software, A.G.d.S., L.Y.M.F. and J.L.S.; validation, A.G.d.S., L.Y.M.F. and E.R.G.R.A.; formal analysis, A.G.d.S., L.Y.M.F. and E.R.G.R.A.; investigation, A.G.d.S., L.Y.M.F., S.F.d.S., J.L.S. and D.G.d.N.S.; data curation, A.G.d.S., L.Y.M.F., S.F.d.S. and J.P.N.S.; writing original draft preparation, A.G.d.S., L.Y.M.F. and E.R.G.R.A.; writing review and editing, A.G.d.S., L.Y.M.F., L.C.B.O., L.B.C.M.d.V. and E.R.G.R.A.; visualization, L.Y.M.F. and E.R.G.R.A.; supervision, E.R.G.R.A.; project administration, E.R.G.R.A.; funding acquisition, E.R.G.R.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES- (Brazil), financial code 001, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) which provided scholarships for students of the Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) at the Universidade Estadual de Santa Cruz. E.R.G.R.A. is a research fellow from CNPq.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The assembled sequences are currently under deposit at NCBI nucleotide database under submission ID: 2844176 and are also available at the Supplementary Table S3.

Acknowledgments: We thank the all the members of Virus Bioinformatics Laboratory–UESC for the fruitful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sharma, S.; Kooner, R.; Arora, R. Insect Pests and Crop Losses. In *Breeding Insect Resistant Crops for Sustainable Agriculture*; Arora, R., Sandhu, S., Eds.; Springer: Singapore, 2017; pp. 45–66, ISBN 978-981-10-6055-7.
2. Drabo, E.; Waongo, A.; Traoré, F.; Sanon, A.; Auger, P. First Discovery of *Tetranychus* Truncatus in Africa and New Records of Spider Mites (Prostigmata, *Tetranychidae*) in Burkina Faso. *Acarologia* **2023**, *63*, 969–977. [CrossRef]
3. Migeon, A.; Nouguier, E.; Dorkeld, F. Spider Mites Web: A Comprehensive Database for the *Tetranychidae*. In *Trends in Acarology*; Sabelis, M.W., Bruin, J., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2010; pp. 557–560, ISBN 978-90-481-9836-8.

4. Sakunwarin, S.; Chandrapatya, A.; Baker, G. Biology and Life Table of the Cassava Mite, *Tetranychus* Truncatus Ehara (Acari: *Tetranychidae*). *Syst. Appl. Acarol.* **2003**, *8*, 13. [CrossRef]
5. Smidansky, E.D.; Carroll, T.W. Factors Influencing the Outcome of Barley Yellow Streak Mosaic Virus-Brown Wheat Mite-Barley Interactions. *Plant Dis.* **1996**, *80*, 186–193. [CrossRef]
6. Adams, M.J.; Swaby, A.G.; Jones, P. Confirmation of the Transmission of Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) by the Fungus *Polymyxa graminis*. *Ann. Appl. Biol.* **1988**, *112*, 133–141. [CrossRef]
7. Schulz, J.T. *Tetranychus* Telarius (L.), New Vector of Virus Y. In *Plant Disease Reporter*; Bureau of Plant Industry, U.S. Dept. of Agriculture: Washington, DC, USA, 1963; pp. 594–596.
8. Gray, S.M.; Power, A.G. Anthropogenic Influences on Emergence of Vector-Borne Plant Viruses: The Persistent Problem of Potato Virus Y. *Curr. Opin. Virol.* **2018**, *33*, 177–183. [CrossRef]
9. Yang, J.; Fang, D.; Shen, J.; Chen, X.; Gao, F. Molecular Characterization of Tobacco Ringspot Virus from Iris Ensata. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *158*, 805–809. [CrossRef]
10. Heinlein, M. The Spread of Tobacco Mosaic Virus Infection: Insights into the Cellular Mechanism of RNA Transport. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2002**, *59*, 58–82. [CrossRef]
11. Kopek, J.A.; Scott, H.A. Southern Bean Mosaic Virus in Mexican Bean Beetle and Bean Leaf Beetle Regurgitants. *J. Gen. Virol.* **1983**, *64*, 1601–1605. [CrossRef]
12. Briddon, R.W.; Markham, P.G. Cotton Leaf Curl Virus Disease. *Virus Res.* **2000**, *71*, 151–159. [CrossRef]
13. Granillo, C. Tobacco and Tomato Ringspot Viruses and Their Relationships with *Tetranychus* Urticae. *Phytopathology* **1973**, *64*, 494–499. [CrossRef]
14. Naing, H. Know More about Spider Mites (Acari: *Tetranychidae*) in Myanmar. In Proceedings of the Eighth Agricultural Research Conference in Commemoration of the 90th Anniversary of Yezin Agricultural University, Nay Pyi Taw, Myanmar, 23–24 December 2014; pp. 122–133.
15. Sarwar, M. Mite (*Acari acarina*) Vectors Involved in Transmission of Plant Viruses. In *Applied Plant Virology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 257–273, ISBN 978-0-12-818654-1.
16. Hoy, M.A. *Agricultural Acarology: Introduction to Integrated Mite Management*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2011.
17. Roggia, S.; Guedes, J.V.C.; Kuss, R.C.R.; Arnemann, J.A.; Návia, D. Spider Mites Associated to Soybean in Rio Grande Do Sul, Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.* **2008**, *43*, 295–301. [CrossRef]
18. Mitina, G.V.; Tulaeva, I.A.; Malysh, S.M.; Tokarev, Y.S. Molecular Genetic Analysis of Resistance-Associated Mutations in the Experimental Lines of Spider Mite *Tetranychus Urticae* Koch, Selected for Resistance to Bifenthrin and Abamectin. *Int. J. Acarol.* **2021**, *47*, 721–725. [CrossRef]
19. Ghongade, D.S.; Sood, A.K. Economic Injury Level for *Tetranychus* Urticae Koch on Parthenocarpic Cucumber under Protected Environment in North-Western Indian Himalayas. *Phytoparasitica* **2021**, *49*, 893–905. [CrossRef]
20. Assouguem, A.; Kara, M.; Mechchate, H.; Korkmaz, Y.B.; Benmessaoud, S.; Ramzi, A.; Abdullah, K.R.; Noman, O.M.; Farah, A.; Lazraq, A. Current Situation of *Tetranychus* Urticae (Acari: *Tetranychidae*) in Northern Africa: The Sustainable Control Methods and Priorities for Future Research. *Sustainability* **2022**, *14*, 2395. [CrossRef]
21. Short, B.D.; Janisiewicz, W.; Takeda, F.; Leskey, T.C. UV-C Irradiation as a Management Tool for *Tetranychus Urticae* on Strawberries. *Pest. Manag. Sci.* **2018**, *74*, 2419–2423. [CrossRef]
22. Attia, S.; Grissa, K.L.; Lognay, G.; Bitume, E.; Hance, T.; Mailleux, A.C. A Review of the Major Biological Approaches to Control the Worldwide Pest *Tetranychus* Urticae (Acari: *Tetranychidae*) with Special Reference to Natural Pesticides: Biological Approaches to Control *Tetranychus* Urticae. *J. Pest. Sci.* **2013**, *86*, 361–386. [CrossRef]
23. Sadeghi, E.; Shoushtari, R.V.; Madani, H. The Influence of *Tetranychus* Urticae Koch (Acari: *Tetranychidae*) Life Table and Reproductive Parameters by Applying Si on Bean at Library Condition. *Adv. Entomol.* **2016**, *4*, 260–267. [CrossRef]
24. Adesanya, A.W.; Lavine, M.D.; Moural, T.W.; Lavine, L.C.; Zhu, F.; Walsh, D.B. Mechanisms and Management of Acaricide Resistance for *Tetranychus* Urticae in Agroecosystems. *J. Pest. Sci.* **2021**, *94*, 639–663. [CrossRef]
25. Migeon, A.; Navajas, M. Homage to Dr Jean Gutierrez (1936–2023). *Acarologia* **2023**, *63*, 454–463. [CrossRef]
26. Li, W.; Godzik, A. Cd-Hit: A Fast Program for Clustering and Comparing Large Sets of Protein or Nucleotide Sequences. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1658–1659. [CrossRef]
27. Aguiar, E.R.G.R.; De Almeida, J.P.P.; Queiroz, L.R.; Oliveira, L.S.; Olmo, R.P.; De Faria, I.J.D.S.; Imler, J.-L.; Gruber, A.; Matthews, B.J.; Marques, J.T. A Single Unidirectional piRNA Cluster Similar to the *Flamenco* Locus Is the Major Source of EVE-Derived Transcription and Small RNAs in *Aedes Aegypti* Mosquitoes. *RNA* **2020**, *26*, 581–594. [CrossRef] [PubMed]
28. Espinal, R.B.A.; de Santana, S.F.; Santos, V.C.; Lizardo, G.N.R.; Silva, R.J.S.; Corrêa, R.X.; Loguercio, L.L.; Góes-Neto, A.; Pirovani, C.P.; Fonseca, P.L.C.; et al. Uncovering a Complex Virome Associated with the Cacao Pathogens Ceratocystis Cacaofunesta and Ceratocystis Fimbriata. *Pathogens* **2023**, *12*, 287. [CrossRef]
29. Wingett, S.W.; Andrews, S. FastQ Screen: A Tool for Multi-Genome Mapping and Quality Control. *F1000Res* **2018**, *7*, 1338. [CrossRef]
30. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [CrossRef]
31. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [CrossRef] [PubMed]

32. Prjibelski, A.D.; Vasilinetc, I.; Bankevich, A.; Gurevich, A.; Krivosheeva, T.; Nurk, S.; Pham, S.; Korobeynikov, A.; Lapidus, A.; Pevzner, P.A. ExSPAnder: A Universal Repeat Resolver for DNA Fragment Assembly. *Bioinformatics* **2014**, *30*, i293–i301. [CrossRef] [PubMed]
33. Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D.H. Fast and Sensitive Protein Alignment Using DIAMOND. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 59–60. [CrossRef]
34. Afgan, E.; Baker, D.; Batut, B.; van den Beek, M.; Bouvier, D.; Cech, M.; Chilton, J.; Clements, D.; Coraor, N.; Grüning, B.A.; et al. The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses: 2018 Update. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W537–W544. [CrossRef]
35. Rombel, I.T.; Sykes, K.F.; Rayner, S.; Johnston, S.A. ORF-FINDER: A Vector for High-Throughput Gene Identification. *Gene* **2002**, *282*, 33–41. [CrossRef]
36. Blum, M.; Chang, H.-Y.; Chuguransky, S.; Grego, T.; Kandasaamy, S.; Mitchell, A.; Nuka, G.; Paysan-Lafosse, T.; Qureshi, M.; Raj, S.; et al. The InterPro Protein Families and Domains Database: 20 Years On. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D344–D354. [CrossRef]
37. Marchler-Bauer, A.; Bryant, S.H. CD-Search: Protein Domain Annotations on the Fly. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W327–W331. [CrossRef] [PubMed]
38. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [CrossRef]
39. Nguyen, L.-T.; Schmidt, H.A.; Von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274. [CrossRef] [PubMed]
40. Miller, M.A.; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, USA, 14 November 2010; IEEE: New Orleans, LA, USA; pp. 1–8.
41. Patro, R.; Duggal, G.; Love, M.I.; Irizarry, R.A.; Kingsford, C. Salmon Provides Fast and Bias-Aware Quantification of Transcript Expression. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 417–419. [CrossRef]
42. Yadav, P.D.; Nyayanit, D.A.; Shete, A.M.; Jain, S.; Majumdar, T.P.; Chaubal, G.Y.; Shil, P.; Kore, P.M.; Mourya, D.T. Complete Genome Sequencing of Kaisodi Virus Isolated from Ticks in India Belonging to Phlebovirus Genus, Family Phenuiviridae. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2019**, *10*, 23–33. [CrossRef]
43. Delmas, B.; Attoui, H.; Ghosh, S.; Malik, Y.S.; Mundt, E.; Vakharia, V.N. ICTV Report Consortium ICTV Virus Taxonomy Profile: Birnaviridae. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 5–6. [CrossRef] [PubMed]
44. Zhang, X.; Wen, F. Recent Advances in Reovirales Viruses Reverse Genetics Research. *Virus Res.* **2022**, *321*, 198911. [CrossRef]
45. Adams, M.J.; Adkins, S.; Bragard, C.; Gilmer, D.; Li, D.; MacFarlane, S.A.; Wong, S.-M.; Melcher, U.; Ratti, C.; Ryu, K.H.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Virgaviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 1999–2000. [CrossRef]
46. Zhao, F.; Baek, D.; Igori, D.; Bae, J.Y.; Kim, S.-M.; Ra, J.-E.; Do Park, K.; Lee, B.C.; Moon, J.S. Complete Genome Sequence of Rice Virus A, a New Member of the Family Tombusviridae. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 3247–3250. [CrossRef]
47. Mrkvová, M.; Achs, A.; Alaxin, P.; Šubr, Z.; Predajnˇa, L.; Zetochová, E.; Hauptvogel, P.; Šoltys, K.; Candresse, T.; Glasa, M. *Phaseolus vulgaris* Alphaendornavirus-1 Is Frequent in Bean Germplasm in Slovakia and Shows Low Molecular Variability. *Acta Virol.* **2023**, *67*, 11484. [CrossRef]
48. Mavricˇ, I.; Šuštar-Vozlicˇ, J. Virus Diseases and Resistance to Bean Common Mosaic and Bean Common Mosaic Necrosis Potyvirus in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Agric. Slov.* **2004**, *83*, 181–190. [CrossRef]
49. Tang, M.; Feng, X. Bean Common Mosaic Disease: Etiology, Resistance Resource, and Future Prospects. *Agronomy* **2022**, *13*, 58. [CrossRef]
50. Brine, T.J.; Crawshaw, S.; Murphy, A.M.; Pate, A.E.; Carr, J.P.; Wamonje, F.O. Identification and Characterization of *Phaseolus vulgaris* Endornavirus 1, 2 and 3 in Common Bean Cultivars of East Africa. *Virus Genes* **2023**, *59*, 741–751. [CrossRef] [PubMed]
51. De Ron, A.M.; Papa, R.; Bitocchi, E.; González, A.M.; Debouck, D.G.; Brick, M.A.; Fourie, D.; Marsolais, F.; Beaver, J.; Geffroy, V.; et al. Common Bean. In *Grain Legumes*; De Ron, A.M., Ed.; Handbook of Plant Breeding; Springer: New York, NY, USA, 2015; Volume 10, pp. 1–36, ISBN 978-1-4939-2796-8.
52. Asgharipour, M.R.; Shahgholi, H.; Campbell, D.E.; Khamari, I.; Ghadiri, A. Comparison of the Sustainability of Bean Production Systems Based on Emergy and Economic Analyses. *Env. Monit. Assess.* **2019**, *191*, 2. [CrossRef]
53. Makkouk, K.; Pappu, H.; Kumari, S.G. Virus Diseases of Peas, Beans, and Faba Bean in the Mediterranean Region. In *Advances in Virus Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 84, pp. 367–402, ISBN 978-0-12-394314-9.
54. Karasev, A.V.; Gray, S.M. Continuous and Emerging Challenges of *Potato Virus Y* in Potato. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2013**, *51*, 571–586. [CrossRef]
55. François, S.; Mutuel, D.; Duncan, A.B.; Rodrigues, L.R.; Danzelle, C.; Lefevre, S.; Santos, I.; Frayssinet, M.; Fernandez, E.; Filloux, D.; et al. A New Prevalent Densovirus Discovered in Acari. Insight from Metagenomics in Viral Communities Associated with Two-Spotted Mite (*Tetranychus* Urticae) Populations. *Viruses* **2019**, *11*, 233. [CrossRef]
56. Sánchez-Sánchez, H.; Henry, M.; Cárdenas-Soriano, E.; Alvizo-Villasana, H.F. Identification of *Wheat Streak Mosaic Virus* and Its Vector *Aceria Tosichella* in Mexico. *Plant Dis.* **2001**, *85*, 13–17. [CrossRef]
57. Webster, D.E.; Forster, R.L.S.; Sinclair, L.; Guy, P.L. Distribution of Ryegrass Mosaic Virus in New Zealand Perennial Ryegrass Pastures as Determined by ELISA and RT-PCR. *N. Z. J. Agric. Res.* **1996**, *39*, 405–412. [CrossRef]

58. Torrance, L.; Talianksy, M.E. Potato Virus Y Emergence and Evolution from the Andes of South America to Become a Major Destructive Pathogen of Potato and Other Solanaceous Crops Worldwide. *Viruses* **2020**, *12*, 1430. [CrossRef]
59. Fukuhara, T. Endornaviruses: Persistent dsRNA Viruses with Symbiotic Properties in Diverse Eukaryotes. *Virus Genes* **2019**, *55*, 165–173. [CrossRef]
60. Khankhum, S.; Valverde, R.A. Physiological Traits of Endornavirus-Infected and Endornavirus-Free Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Cv Black Turtle Soup. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 1051–1056. [CrossRef] [PubMed]
61. Dahan, J.; Orellana, G.E.; Lee, J.; Karasev, A.V. Grapevine Endophyte Endornavirus and Two New Endornaviruses Found Associated with Grapevines (*Vitis vinifera* L.) in Idaho, USA. *Viruses* **2023**, *15*, 1347. [CrossRef] [PubMed]
62. Bonning, B.C. The Dicistroviridae: An Emerging Family of Invertebrate Viruses. *Virol. Sin.* **2009**, *24*, 415–427. [CrossRef]
63. Sahul Hameed, A.S.; Ninawe, A.S.; Nakai, T.; Chi, S.C.; Johnson, K.L. Ictv Report Consortium, null ICTV Virus Taxonomy Profile: Nodaviridae. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 3–4. [CrossRef]
64. Ho, K.L.; Gabrielsen, M.; Beh, P.L.; Kueh, C.L.; Thong, Q.X.; Streetley, J.; Tan, W.S.; Bhella, D. Structure of the Macrobrachium Rosenbergii Nodavirus: A New Genus within the Nodaviridae? *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e3000038. [CrossRef]
65. Freitas-Astúa, J.; Ramos-González, P.L.; Arena, G.D.; Tassi, A.D.; Kitajima, E.W. Brevipalpus-Transmitted Viruses: Parallelism beyond a Common Vector or Convergent Evolution of Distantly Related Pathogens? *Curr. Opin. Virol.* **2018**, *33*, 66–73. [CrossRef]
66. Marques, J.P.R.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J.; Appezzato-da-Glória, B. Comparative Morpho-Anatomical Studies of the Lesions Caused by Citrus Leprosis Virus on Sweet Orange. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2010**, *82*, 501–511. [CrossRef]
67. Ramos-González, P.L.; Dias Arena, G.; Tassi, A.D.; Chabi-Jesus, C.; Watanabe Kitajima, E.; Freitas-Astúa, J. Kitaviruses: A Window to Atypical Plant Viruses Causing Nonsystemic Diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2023**, *61*, 97–118. [CrossRef] [PubMed]
68. De Lillo, E.; Freitas-Astúa, J.; Kitajima, E.W.; Ramos-González, P.L.; Simoni, S.; Tassi, A.D.; Valenzano, D. Phytophagous Mites Transmitting Plant Viruses: Update and Perspectives. *Entomologia* **2021**, *41*, 439–462. [CrossRef]
69. Walker, P.J.; Blasdell, K.R.; Calisher, C.H.; Dietzgen, R.G.; Kondo, H.; Kurath, G.; Longdon, B.; Stone, D.M.; Tesh, R.B.; Tordo, N.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae: This Article Is Part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles Collection. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 447–448. [CrossRef]
70. Wallau, G.L. RNA Virus EVEs in Insect Genomes. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2022**, *49*, 42–47. [CrossRef] [PubMed]
71. Sun, M.; Ji, Y.; Li, G.; Shao, J.; Chen, R.; Gong, H.; Chen, S.; Chen, J. Highly Adaptive *Phenuiviridae* with Biomedical Importance in Multiple Fields. *J. Med. Virol.* **2022**, *94*, 2388–2401. [CrossRef] [PubMed]
72. Wolf, Y.I.; Koonin, E.V.; Krupovic, M.; Kuhn, J.H. ICTV Virus Taxonomy Profile: Qinviridae 2023. *J. Gen. Virol.* **2023**, *104*. [CrossRef]
73. Zhang, Q.; Gao, Y.; Baker, M.L.; Liu, S.; Jia, X.; Xu, H.; He, J.; Kaelber, J.T.; Weng, S.; Jiang, W. The Structure of a 12-Segmented dsRNA Reovirus: New Insights into Capsid Stabilization and Organization. *PLoS Pathog.* **2023**, *19*, e1011341. [CrossRef] [PubMed]
74. Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U.; Schätzl, H. Viruses with Single-Stranded, Positive-Sense RNA Genomes. In *Molecular Virology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 185–349, ISBN 978-3-642-20717-4.
75. Kitajima, E.W.; Rezende, J.A.M.; Rodrigues, J.C.V. Passion Fruit Green Spot Virus Vectored by Brevipalpus Phoenicis (Acari: *Tenuipalpidae*) on Passion Fruit in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* **2003**, *30*, 225–231. [CrossRef]
76. Tassi, A.D.; Ramos-González, P.L.; Sinico, T.E.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. Circulative Transmission of Cileviruses in Brevipalpus Mites May Involve the Paracellular Movement of Virions. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 836743. [CrossRef]
77. Pleshakova, T.I.; Kakareka, N.N.; Sapotskiy, M.V.; Ledneva, V.A.; Shchelkanov, M.Y. Variety of viruses affecting cereals in the far east. In Proceedings of the North-East Asia Biodiversity: Abstract Book of the 1st International Conference, Vladivostok, Russia, 17–21 September 2018.
78. Bertazzon, N.; Rahali, M.; Angelini, E.; Crespan, M.; Migliaro, D. First Report of *Grapevine Pinot Gris Virus* Infecting Grapevine in Algeria. *Plant Dis.* **2021**, *105*, 234. [CrossRef]
79. Choi, I.-R.; French, R.; Hein, G.L.; Stenger, D.C. Fully Biologically Active In Vitro Transcripts of the Eriophyid Mite-Transmitted Wheat Streak Mosaic Tritimovirus. *Phytopathology* **1999**, *89*, 1182–1185. [CrossRef]
80. Adams, M.J.; Antoniw, J.F.; Bar-Joseph, M.; Brunt, A.A.; Candresse, T.; Foster, G.D.; Martelli, G.P.; Milne, R.G.; Zavriev, S.K.; Fauquet, C.M. The New Plant Virus Family Flexiviridae and Assessment of Molecular Criteria for Species Demarcation. *Arch. Virol.* **2004**, *149*, 1045–1060. [CrossRef]

3. CONCLUSÃO

Nossa investigação sobre a caracterização do viroma do ácaro *Tetranychus urticae* representa um avanço significativo na compreensão da ecologia viral deste importante fitófago. Ao mapear e identificar os vírus associados a essa espécie, conseguimos lançar luz sobre a complexidade das interações entre os ácaros rajados, os vírus que os infectam, suas plantas hospedeiras e os fatores ambientais que influenciam essas dinâmicas intrinsecas.

Nosso estudo foi o primeiro em caracterizar o viroma do *T. urticae* com um amostral tão complexo de 30 bibliotecas de RNA-seq disponível no banco de dados público. Notavelmente, os insights obtidos neste projeto têm implicações profundas para o manejo integrado de pragas agrícolas. Ao compreender melhor a diversidade viral presente nos ácaros rajados, pode-se desenvolver estratégias de controle mais eficazes e direcionadas, visando reduzir os danos às culturas e minimizar o uso de pesticidas, promovendo assim práticas agrícolas mais sustentáveis. A análise metatranscriptômica revelou a presença de 20 sequências virais, incluindo 11 relacionadas a novos vírus. Demos enfoque aos vírus identificados que pertencem a famílias associadas a espécies fitopatogênicas, junto com os vírus conhecidos, ressaltando o potencial impacto desses ácaros na saúde das plantas de cultivo.

Além disso, exploramos a análise das 14 bibliotecas do projeto que envolve ácaros de campo, em comparação com as 16 bibliotecas controle de outros projetos diversos, o que não revelou significativas diferenças neste estudo. Observou-se que as bibliotecas de ácaros de campo têm uma contribuição limitada quando se trata de caracterização de novos vírus. Intrinsicamente, nota-se que neste projeto que compunha as bibliotecas com ácaros de campo a utilização de pesticidas no qual desempenham um papel vital na agricultura moderna, ajudando a proteger as culturas de uma miríade de pragas, incluindo insetos, fungos e ácaros pode ter influenciado na escassez viral. No entanto, sugerimos que está lacuna de nossa análise seja investigada com estudos mais abrangentes para explorar a eficácia e os efeitos colaterais potenciais desses pesticidas sobre os vírus que afetam as culturas.

Essas descobertas não apenas fornecem uma base para o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes para lidar com ácaros rajados em culturas agrícolas, mas também ressaltam a importância da consideração de fatores ambientais e de associações com outros microrganismos na dinâmica viral da espécie, visto que temos uma diversidade viral complexa quando a busca e caracterização do viroma do *T. urticae* foi realizada.

À medida que avançamos na compreensão desses microorganismos, novas oportunidades surgem para aprimorar a sustentabilidade e a resiliência das práticas agrícolas, contribuindo assim para a segurança alimentar e a saúde dos ecossistemas agrícolas. Este estudo marca um passo significativo na caracterização do viroma de *T. urticae* utilizando um amostral tão diversificado, incentivando investigações futuras para desvendar ainda mais os complexos mecanismos que regem a interação entre ácaros aranha, vírus, plantas e fatores ambientais.

REFERENCIAS COMPLEMENTARES

Adams, M. J. et al. **The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation.** *Archives of Virology,* v. 149, n. 8, p. 1672– 1672, ago. 2004.

Agrios, G. N. **Plant Pathology.** 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 952.

Andrews S. **FASTQC: Uma ferramenta de controle de qualidade para dados de sequência de alto rendimento**. EMBRAPA. 2010.

Andrade, D. J.; Melville, C. C.; Michelotto, M. D. **Manual prático sobre ácaros do amendoim no Brasil.** Jaboticabal: Funep. p. 1-14, 2016.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. **Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data.** Bioinformatics. 2014;30(15):2114–20.

Hoffmann, A.; Botton, M.; Freire, J. de M. Braghini, L. C.; Vargas, L.; Calegario, F. F.; Ferla, N. J.; Pinent, S. M. J. **Produção de morangos no sistema semihidropônico. Circular Técnica.** 62, EMBRAPA, 62p. 2007.

Bing, X. et al. **Wolbachia manipulates reproduction of spider mites by influencing herbivore salivary proteins.** Pest Management Science, v. 79, n. 1, p. 315–323, jan. 2023.

Black, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas.** 4ª. Ed. Guanabara Koogan, 2002.
Bryant DW Jr, Wong WK, Mockler TC. **QSRA: a qualityvalue guided de novo short read assembler.** *BMC Bioinformatics* 2009; 10:69.

Chao, J. A., J. H. Lee, B. R. Chapados, E. W. Debler, A. **Schneemann and J. R. Williamson (2005). "Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2**." Nat Struct Mol Biol 12(11): 952-957.

Chaisson MJ, Brinza D, Pevzner PA. **De novo fragment assembly with short mate- paired reads: does the read length matter?** Genome Res 2009; 19:336–46.

De Clercq, E. **Antiviral drugs in current clinical use.** J. Clin. Virol., v. 30, p.115- 133, 2004.

Domingo, E., C. Escarmis, N. Sevilla, A. Moya, S. F. Elena, J. Quer, I. S. Novella and J. J. Holland (1996). "**Basic concepts in RNA virus evolution."** FASEB J 10(8): 859-864.

Fajardo, T. V. M.; Silva, F. N.; Eiras, M.; Nickel, O. **High-throughput sequencing applied for the identification of viruses infecting grapevines in Brazil and genetic variability analysis.** Tropical Plant Pathology, v. 42, n. 4, p. 250-260, 201.

Gaïa, M.; Forterre, P. From Mimivirus to Mirusvirus: The Quest for Hidden Giants. Viruses 2023, 15, 1758. https://doi.org/10.3390/ v15081758

Gubala, A.J. et al**. Genomic characterisation of Wongabel virus reveals novel genes within the Rhabdoviridae.** Virology, 376; v. 1, n. 20, p. 13-23, 2008.

Grbić, M. et al. **The genome of Tetranychus urticae reveals herbivorous pest adaptations.** Nature, v. 479, n. 7374, p. 487–492, 2011.

Grbi´c, M.; Van Leeuwen, T.; Clark, R.M.; Rombauts, S.; Rouzé, P.; Grbi´c, V.; Osborne, E.J.; Dermauw, W.; Ngoc, P.C.T.; Ortego, F.; et al. **The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations.** Nature 2011, 479, 487–492. [CrossRef] [Pubmed].

Hernandez D, Franc¸ois P, Farinelli L, et al. **De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer.** Genome Res 2008; 18:802–9.

Kuhn, R. J. et al. **Structure of Dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion.** Cell, v. 108, p. 717-725, 2002.

Laimer, M.; Lemaire, O.; Herrbach, E.; Goldschmidt, V.; Minafra, A.; Bianco, P.; Wetzel, T. **Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe:** A review. *Journal of Plant Pathology*, v. 91, n. 1, p. 7-23, 2009.

Litter, E.; Oberg, B. **Achievements and challenges in antiviral drugs**. Antiviral Chem. Chemother, v.16, p.155-168, 2005.

Lourenção, A. L.; Moraes, G. J.; Passos, F. A.; Ambrosano, G. M. B.; Silva, L. V. F. **Resistência de morangueiros a Tetranychus urticae Koch (*Acari: Tetranychidae*).** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 29, n. 2, p. 339-346, 2000.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Paker, J. **Microbiologia de Brock.** 10ª ed. São Paulo: Printece Hall do Brasil, 2004.

Marchler-bauer, A.; Bryant, S. H. **CD-Search: protein domain annotations on the fly.** Nucleic Acids Research, v. 32, n. Web Server, p. W327–W331, 1 jul. 2004.

Matsuda, T.; Kozaki, T.; Ishii, K.; Gotoh, T. **Phylogeny of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) inferred from RNA-Seq data.** *PLoS ONE* 2018, 13, e0203136. [CrossRef] [PubMed]

Mehle, N.; Ravnikar, M. **Plant viruses in aqueous environment - Survival, water mediated transmission and detection.** Water Research, v. 46, n. 16, p. 4902-4917, 2012.

Migeon, A.; Dorkeld, F. 2006-2023. **Spider Mites Web: a comprehensive database for Tetranychida**e [Internet]—Available from: http://www. montpellier. inra. fr/CBGP/spmweb. Last accessed on August, 2023. Moraes, G. J. D. & C. H. W. F. Manual de Acarologia. [s.l: s.n.].

Molina, J.-M. et al. **On-demand preexposure prophylaxis in men at high risk for HIV-1 Infection.** The New England Journal of medicine, 373: 2.237-2.246, 2015.

Moraes, G. J.; Flechtmann, C. H. W. **Manual de acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil.** Ribeirão Preto: Holos, 2008. 288 p.

Mottaghinia, L.; Razmjou, J.; Nouri-ganbalani, G.; Rafieedastjerdi, H. **Antibiosis and antixenosis of six commonly produced potato cultivars to the green peach aphid,**

Myzus persicae Sulzer (Hemiptera: Aphididae). Neotropical Entomoology, v. 40, n. 3, p. 380-386, 2011.

Murray, P. R.; Rosehthal, K.S.; Pfaller, M.A. **Medical Microbiology.** 9. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.

Nafajabadi, S. S. M.; Shoushtari, R. V.; Zamani, A. A.; Arbabi, M.; Farazman, H. **Effect of Nitrogen Fertilization on Tetranychus urticae Koch (*Acari: Tetranychidae*) Populations on Common Bean Cultivars.** Journal of Scientific Research, v. 8, n. 5, p. 990-998, 2011.

Niu, J. et al. **Three novel RNA viruses in the *spider mite Tetranychus urticae* and their possible interactions with the host RNA interference response.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 166, p. 107228, 2019.

Oliveira, A. C. S. de; Martins, S. G. F.; Zacarias, M. S. **An individual-based model for the interaction of the *mite Tetranychus urticae* (Koch, 1836) with its predator Neoseiulus californicus (McGregor, 1954) (*Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae*).** Ecological Modelling, v. 255, p. 11- 20, 2013.

Pallás, V.; Sánchez-navarro, J. A.; James, D. **Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids.** Frontiers in Microbiology, v. 9, article 2087, 2018.

Pavela, R.; Murugan, K.; Canale A.; Beneli, G. **Saponaria officinalis-synthesized silver nanocrystals as effective biopesticides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae* Koch.** Industrial Crops and Products, v. 97, p. 338-344, 2017.

Rezaie, R.; Karimi, J.; Abbasipour, H.; Askarianzadeh A. **Sublethal effects of essential oil of Cinnamomum zeylanicum Blume on life expectancy (ex) and agespecific fertility (mx) of two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (*Acari: Tetranychidae*).** Archives of Phytopathology and Plant Protection, v. 47, n. 8, p. 900-905, 2014.

Roggia, S. **Spider mites associated to soybean in Rio Grande do Sul, Brazil.** Ed. 43. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2008. p. 295–301.

Romeiro, R. S. **PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos.** Phytopathologica, v. 26, p.177-184, 2000.

Santos-Matos, G.; Wybouw, N.; Martins, N.E.; Zélé, F.; Riga, M.; Leitão, A.B.; Vontas, J.; Grbi´c, M.; Van Leeuwen, T.; Magalhães, S.; et al. ***Tetranychus urticae* mites do not mount an induced immune response against bacteria.** Proceedings. *Biol. Sci*. 2017, 284, 20170401. [CrossRef] [PubMed].

Sadeghi, E.; Shoushtari, R.V.; Madani, H. **The influence of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) life table and reproductive parameters by applying Si on Bean at library condition.** *Advances in Entomology*, v. 4, n. 05, p. 260, 2016.

Suh, E., Koh, S. H.; Lee, J. H.; Shin, K. L.; CHO, K. **Evaluation of resistance pattern to fenpyroximate and pyridaben in Tetranychus urticae collected from greenhouses and apple orchards using lethal concentration slope relationship.** Experimental and Applied

Acarology, v. 38, p. 151– 165, 2006.

Vacante, V. **The handbook of mites of economic plants: identification, bio-ecology and control.** [s.l.] Cabi, 2016.

Wallingford, A. K.; Fuchs, M.F.; Martinson, T.; Hesler, S.; Loeb, G. M. **Slowing the spread of grapevine leafroll-associated viruses in commercial vineyards with insecticide control of the vector, Pseudococcus maritimus (Hemiptera: Pseudococcidae).** *Journal of Insect Science*, v. 15, n. 1, article 112, 2015.

Warren RL, Sutton GG, Jones SJ, Holt RA. **Assembling millions of short DNA sequences using SSAKE.** Bioinformatics 2007; 23:500–1.

Zerbino DR, McEwen GK, Margulies EH, Birney E. **Pebble and rock band: heuristic resolution of repeats and scaffolding in the velvet short-read de novo assembler.** *PLoS One* 2009;4: e8407.

Zerbini Junior, F. M.; Carvalho, M. G. de; Maciel-Zambolim, E. **Introdução à Virologia Vegetal.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 145 p.

Zélé, F.; Weill, M.; Magalhães, S. **Identification of spider-mite species and their endosymbionts using multiplex PCR**. Exp. *Appl. Acarol*. 2018, 74, 123–138. [CrossRef] [PubMed].