

Bento Gonçalves, RS / Outubro, 2025

Detecção e caracterização molecular parcial de vírus latentes em macieiras e identificação de um isolado brasileiro de luteovírus

Thor Vinícius Martins Fajardo⁽¹⁾ e Osmar Nickel⁽²⁾

⁽¹⁾ Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁽²⁾ Pesquisador aposentado, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, n° 515
Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS
www.embrapa.br/uva-e-vinho
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Henrique Pessoa dos Santos

Secretária-executiva

Renata Gava

Membros

Fernando José Hawerth,
Mauro Celso Zanús, Joelsio
José Lazzarotto, Jorge Tonietto,
Thor Vinícius Martins Fajardo,
Alessandra Russi, Edgardo
Aquiles Prado Perez, Fábio
Ribeiro dos Santos, Luciana
Elena Mendonça Prado, Michele
Belas Coutinho Pereira
e Rochelle Martins Alvorcem

Revisão de texto

Renata Gava

Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem

(CRB-10/1810)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Renata Gava

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

Resumo – Macieiras são afetadas por vários vírus que podem causar doenças importantes, principalmente devido à complexidade das infecções. Os objetivos do trabalho foram incrementar o diagnóstico de vírus latentes da macieira; promover a caracterização molecular parcial de isolados virais; avaliar a variabilidade genética viral e comprovar a ocorrência de uma variante genética viral e de um luteovírus em macieiras. Os vírus avaliados foram apple stem pitting virus (ASPV) e sua variante, apple green crinkle associated virus (AGCaV), apple stem grooving virus (ASGV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) e o apple luteovirus 1 (ALV-1), também avaliado por sequenciamento de alto rendimento (HTS). A incidência de vírus nas amostras avaliadas foi de 26,3% (ACLSV), 63,2% (ASGV), 57,9% (ASPV), 31,6% (ASPV/AGCaV) e uma amostra com ALV-1. Em relação ao tipo de infecção, foi observada ausência de infecção (cinco plantas), infecções simples (três) e múltiplas (11). Alguns fragmentos de DNA obtidos por RT-PCR foram sequenciados confirmando a especificidade das detecções. As identidades de nucleotídeos entre os vírus/variante estudados e vírus/isolados homólogos já caracterizados foram altas, chegando a 96,7% (ASPV variante AGCaV), 97,5% (ASPV), 98,9% (ASGV), 98,9% (ACLSV) e 99% (ALV-1). Para ALV-1, os *contigs* obtidos por HTS apresentaram altas identidades (até 98,6%) com outros isolados desse vírus. A presença de infecções virais múltiplas em macieiras assintomáticas foi demonstrada, bem como, pela primeira vez, a ocorrência da variante de ASPV, AGCaV, e a ocorrência do ALV-1 associados a acessos brasileiros de macieiras.

Termos para indexação: *Malus domestica*, AGCaV, ALV-1, sequenciamento de alto rendimento, diagnose, virose.

Detection and partial molecular characterization of latent viruses in apple trees and identification of a Brazilian luteovirus isolate

Abstract – Apple trees are affected by several viruses that can cause important diseases, mainly due to the complexity of infections. The aims of this study were to improve diagnosis of apple latent viruses; perform a partial molecular characterization of the isolates; evaluate viral genetic variability and

demonstrate the occurrence of a viral genetic variant and a luteovirus in apple trees. The viruses evaluated were apple stem pitting virus (ASPV) and its variant, apple green crinkle associated virus (AGCaV); apple stem grooving virus (ASGV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and apple luteovirus 1 (ALV-1), the latter also characterized by high-throughput sequencing (HTS). The incidence of viruses in the investigated samples was 26.3% (ACLSV), 63.2% (ASGV), 57.9% (ASPV), 31.6% (ASPV/AGCaV) and one sample for ALV-1. Regarding the infection type, healthy plants (five), single (three plants) and multiple infections (11 plants) were observed. Some amplicons obtained by RT-PCR were sequenced confirming the specificity of detections. Nucleotide identities between the studied viruses/variant and previously characterized homologous viruses/isolates were high, reaching up to 96.7% (ASPV variant AGCaV), 97.5% (ASPV), 98.9% (ASGV), 98.9% (ACLSV) and 99% (ALV-1). For ALV-1, the *contigs* obtained by HTS showed high identity (up to 98.6%) with other isolates of the virus. The presence of multiple viral infections in asymptomatic apple trees was demonstrated, as well as, for the first time, the occurrence of AGCaV, variant of ASPV, and also the occurrence of ALV-1 associated with Brazilian apple accessions.

Index terms: *Malus domestica*, AGCaV, ALV-1, high-throughput sequencing, diagnosis, viruses.

Introdução

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma das principais frutíferas de clima temperado cultivada no mundo e apresenta grande importância econômica para a atividade frutícola de muitos países. A produção brasileira de maçãs, 1.183.794 toneladas de maçãs, cultivadas em 33.358 ha, em 2023 (IBGE, 2023), coloca o país em posição de destaque entre os produtores mundiais; avançou nas últimas décadas representando atualmente um segmento relevante da atividade agrícola do país. É a frutífera de clima temperado mais importante no Brasil, com 96% da produção concentrada nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Uma série de fatores bióticos e abióticos afeta o desenvolvimento e a produção de frutos de qualidade na cultura da macieira e, dentre os fatores bióticos, os vírus merecem destaque (Araújo et al., 2016).

Infecções virais no material propagativo de macieiras na região sul do Brasil são relativamente comuns e ocorrem geralmente como infecções virais múltiplas e, em muitos casos, em conjunto

com outras alterações de natureza infecciosa não totalmente esclarecidas (Nickel; Fajardo, 2021). Mais de 26 vírus e viroides foram relatados infectando macieiras, pereiras e marmeleiros em todo o mundo. Dentre os principais vírus dessa cultura, pelo impacto potencial que podem provocar e pela ampla incidência mundial, destacam-se o vírus das caneluras do tronco da macieira (apple stem pitting virus, ASPV), classificado na espécie *Foveavirus mali*, gênero *Foveavirus*; o vírus do acanalamento do tronco da macieira (apple stem grooving virus, ASGV), classificado na espécie *Capillovirus mali*, gênero *Capillovirus* e o vírus da mancha clorótica da folha da macieira (apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV), classificado na espécie *Trichovirus mali*, gênero *Trichovirus*; as três espécies pertencentes à família *Betaflexiviridae* (Manzoor et al., 2025).

Embora esses vírus normalmente não causem sintomas perceptíveis na maioria das cultivares, as viroses podem reduzir o vigor das plantas, a produção e a produtividade, a qualidade dos frutos e a longevidade dos pomares, além de tornar as macieiras mais suscetíveis a outros patógenos (Guerra et al., 2012). Em termos epidemiológicos, esses vírus caracterizam-se por não possuírem vetores conhecidos, sendo sua disseminação baseada na propagação vegetativa do material infectado. Este tipo de propagação promove o acúmulo de patógenos sistêmicos, tais como os vírus, favorecendo a manutenção, a multiplicação e a disseminação desse tipo de patógenos (Araújo et al., 2016). Infecções virais múltiplas podem resultar em efeitos negativos mais pronunciados em relação a reduções no rendimento e na qualidade da produção, diminuição do vigor da planta, declínio de macieiras e comprometimento da sobrevivência das plantas. Macieiras infectadas por vírus podem apresentar uma gama de sintomas, incluindo descoloração das folhas, frutos deformados e com rachaduras diversas (por exemplo, na forma de estrelas), depressões longitudinais nos troncos e galhos, e distúrbios na casca (floema dos troncos). ASPV, ASGV e ACLSV afetam o sistema vascular (tecido floemático), em particular, em infecções mistas e em cultivares copa de macieiras enxertadas em porta-enxertos sensíveis, comprometendo o desenvolvimento das plantas (Vats et al., 2024; Pedrelli et al., 2025).

Plantas infectadas por vírus sofrem complexas alterações fisiológicas e bioquímicas que resultam em efeitos negativos no desempenho agrônomo da hospedeira. Demonstrou-se que mais de uma centena de genes são regulados positiva ou negativamente em macieiras infectadas pelo ASGV (Chen

et al., 2014), sem que sintomas sejam necessariamente perceptíveis.

Em estudos que utilizaram sequenciamento de alto rendimento (HTS), foram diagnosticados três novos vírus de macieiras no Brasil, o apple rubbery wood virus (ARWV) 1 e 2 e o citrus concave gum-associated virus (CCGaV), cujas espécies pertencem à família *Phenuiviridae*, além do viroide apple hammerhead viroid (AHVd) (espécie *Pelamoviroid malleusmali*) (Nickel et al., 2020; 2023). ARWV-1 e -2 foram associados à doença conhecida por lenho mole (*rubbery wood*) da macieira (Rott et al., 2018) e o CCGaV foi relatado estar envolvido em declínio de macieiras nos Estados Unidos da América (EUA) (Wright et al., 2018; 2020). Esses vírus, constatados na região de pomicultura no sul do Brasil, foram relacionados a declínios de macieiras que ocorrem em várias regiões do mundo. Além desses patógenos, nesses estudos, os autores suspeitaram da presença de uma variante genética do ASPV, apple green crinkle associated virus (AGCaV), e do apple luteovirus 1, ALV-1 (espécie *Luteovirus mali*, gênero *Luteovirus*, família *Tombusviridae*) (Nickel; Fajardo, 2021), nas amostras analisadas, indicando a necessidade de estudos adicionais.

Propagadas vegetativamente sobre porta-enxertos, para acelerar a entrada em produção, as macieiras facilitam a transmissão de vírus por mudas formadas a partir de plantas infectadas, perpetuando e disseminando as infecções, principalmente quando essas são latentes (Barba et al., 2015). Este cenário resulta de uma seleção descuidada do material propagativo e, em especial, sem o apoio de testes diagnósticos. Estudos já demonstraram a relevância de investimentos na obtenção de material propagativo sadio para a sustentabilidade da atividade frutícola (Fuchs et al., 2021). O método de controle de vírus de plantas mais eficaz é o uso de material de propagação sadio, livre de vírus detectáveis e conhecidos. Os procedimentos mais utilizados para a eliminação de vírus de plantas incluem a termoterapia (Wang et al., 2018), a quimioterapia (Nickel; Fajardo, 2016) e a crioterapia ou combinações desses métodos com o cultivo de meristemas dos quais podem ser regeneradas plantas livres de vírus (Nickel; Fajardo, 2009). Para tornar as medidas de controle dos vírus da macieira mais efetivas, é fundamental identificar com precisão as plantas infectadas, conhecer aspectos relativos à transmissão, disseminação e incidência do vírus, bem como a variabilidade viral na hospedeira (Xiao et al., 2022).

A variabilidade genética de isolados dos vírus ASPV, ASGV e ACLSV foi relatada anteriormente

em diferentes regiões, incluindo o Brasil (Souza et al., 2017; Nickel et al., 2018; Mathioudakis et al., 2021; Bougard et al., 2025). Isso pode ter implicações sobre as propriedades biológicas, epidemiologia, sintomatologia, transmissão e detecção desses vírus, e destaca a importância dos estudos de variabilidade viral no contexto do emprego de testes diagnósticos adequados à detecção de diferentes vírus, isolados ou variantes. Apesar dos trabalhos existentes, a identificação e a caracterização molecular de isolados e variantes dos vírus latentes da macieira no país ainda podem ser consideradas insuficientes, sobretudo pela dinâmica das populações virais. Assim, os objetivos do trabalho foram incrementar a precisão do diagnóstico de vírus latentes da macieira; promover a caracterização molecular parcial de isolados desses vírus; avaliar a variabilidade genética; e comprovar a ocorrência de uma variante genética viral e de um luteovírus em macieiras.

Material e métodos

Detecção e caracterização molecular parcial de vírus latentes em macieiras

Amostras analisadas

Dezenove acessos de macieiras presentes em uma coleção da Embrapa Uva e Vinho, com as plantas mantidas em vasos de 3 a 5 L, foram indexados para três dos principais vírus que infectam essa cultura: ASPV e apple green crinkle associated virus (AGCaV), reconhecido como uma variante do ASPV (James et al., 2013; Li et al., 2020), além do ASGV e do ACLSV. As plantas indexadas representavam algumas das principais cultivares comerciais de macieiras e foram originalmente coletadas em pomares comerciais dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e, a partir de então, mantidas sob condições controladas em telado na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). Detalhamento das amostras indexadas é apresentado na Tabela 1. As plantas foram avaliadas visualmente quanto à presença de sintomas foliares semelhantes a viroses e não manifestavam sintomas perceptíveis.

Indexação por RT-PCR e caracterização molecular dos vírus latentes

As extrações de RNA total das 19 amostras de macieiras (Tabela 1), além dos respectivos controles sadios e positivos, foram realizadas empregando-se o protocolo de adsorção em sílica (Rott; Jelkmann, 2001) a partir de 1 g de casca verde dos ramos. Todas as amostras foram indexadas por RT-PCR

Tabela 1. Descrição das amostras analisadas e resultados obtidos para a detecção dos diferentes vírus e variante viral em macieiras por RT-PCR.

Amostra	Cultivar de macieira	Código da amostra	ACLSV (358 pb)	ASGV (524 pb)	ASPV (366 pb)	ASPV (AGCaV) (273 pb)	ALV-1 (601 pb)
1	Mishima	M185	+	+	+	+	-
2	Fuji	M024	-	-	+	+(1)	-
3	Royal Gala	M053	-	+	-	-	-
4	Royal Gala	M015	+(1)	+	+(1)	+(1)	-
5	Fuji Suprema	M170	-	-	-	-	-
6	Fuji Suprema	M095	-	-	-	-	-
7	Royal Gala	M145	-	-	-	-	-
8	Maruba	M121	-	-	-	-	-
9	Fuji Suprema	M2274	+	+	+	-	-
10	Royal Gala	M012	+(1)	+	+	+(1)	-
11	Fuji Suprema	M2276	-	+	+	-	-
12	Fuji Suprema	M2277	-	+	+	-	-
13	Royal Gala	M2278	-	-	-	-	-
14	Maruba	M122	-	+	-	-	-
15	Fuji Suprema	M2280	-	+	+	-	-
16	Monalisa	M286	-	+(1)	+(1)	-	-
17	Maxi Gala	M2282	-	+(1)	+	-	-
18	Fuji More	M182	-	-	-	+	-
19	Braeburn	M061	+	+	+	+	+(1)
Total			5/19 (26,3%)	12/19 (63,2%)	11/19 (57,9%)	6/19 (31,6%)	1/19⁽²⁾

⁽¹⁾ Fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR (*amplicons*) e sequenciados para caracterização viral.

⁽²⁾ No total foram indexadas 50 amostras para ALV-1.

-: amostra sadia ou amplificação negativa em RT-PCR.

+: amostra infectada ou amplificação positiva em RT-PCR.

convencional (*end-point* PCR) com um par de iniciadores (*primers*) desenhados para os seguintes vírus, ASPV/AGCaV: CY57f / CY61r (273 pares de bases, pb), ASPV: ASPV 8869f / ASPV 9211r (366 pb), ASGV: ASGV 5873f / ASGV 6396r (524 pb) e ACLSV: ACLSV 6875f (A53f) / ACLSV 7233r (A52r) (358 pb), conforme detalhamento que consta da Tabela 2. Na reação para a síntese do cDNA, utilizaram-se a enzima transcriptase reversa M-MLV e 4 µL (cerca de 400 ng) do RNA total, incubando-se a reação a 37 °C por 1 hora. Após, realizou-se a PCR com a enzima *Taq* DNA polimerase do tipo *Hot Start*, seguindo-se as recomendações do fabricante. O ciclo de amplificação foi composto pela desnaturação inicial (94 °C/15 minutos), 35 ciclos (94 °C/50

segundos, 50 °C/50 segundos e 72 °C/50 segundos) e uma extensão final (72 °C/10 min). Os produtos da RT-PCR foram analisados em géis de agarose 1,5% (*p/v*) preparados em tampão TRIS-Borato-EDTA (TBE) pH 8,0, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz UV-B (280–315 nm). Os fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR, correspondentes aos tamanhos esperados, indicam a detecção dos vírus.

A caracterização viral parcial por meio da comparação entre sequências de nucleotídeos foi realizada com dois ou três isolados de cada vírus, sendo que alguns dos fragmentos de DNA obtidos foram sequenciados e analisados para determinar a variabilidade viral (Tabela 3).

Tabela 2. Iniciadores de RT-PCR (primers) utilizados para detectar os vírus de macieira.

Vírus/tamanho do fragmento amplificado	Código do iniciador ⁽¹⁾	Sequência	Posição do iniciador (nt) ⁽¹⁾ no genoma viral de referência	Referência
ASPV (273 nt)	CY57f ⁽²⁾	5'GACCTTGGCCTGTTTTTCAGC3'	5781-5800 (AGCaV: KT835289)	Morelli et al. (2017)
	CY61r ⁽³⁾	5'GCAATGAGGTCTGGAGGGAG3'	6034-6053	
ASPV (366 nt)	ASPV 8869f	5'ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA3'	8899-8921 (ASPV: NC_003462)	Menzel et al. (2002)
	ASPV 9211r	5'TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA3'	9237-9264	
ASGV (524 nt)	ASGV 5873f	5'CCCGCTGTTGGATTGATACACCTC3'	5871-5895 (ASGV: NC_001749)	MacKenzie et al. (1997)
	ASGV 6396r	5'CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT3'	6373-6394	
ACLSV (358 nt)	ACLSV 6875f (A53f)	5'GGCAACCCTGGAACAGA3'	6876-6892 (ACLSV: NC_001409)	Candresse et al. (1995)
	ACLSV 7233r (A52r)	5'CAGACCCTTATTGAAGTCGAA3'	7213-7233	
ALV-1 (443 nt)	ALV-1 F1	5'CAAATCGAGCAAGAGGAGGC3'	1720-1739 (ALV-1: NC_040680)	Lim et al. (2019)
	ALV-1 R1	5'TTTGCCAGTCCAACAAGTCG3'	2144-2162	
ALV-1 (478 nt)	ALuDetF6	5'AGCCAATGATTGTATTGACGTG3'	3942-3964 (ALV-1: NC_040680)	Liu et al. (2018)
	ALuDetR6	5'AGCTCTCTTCTAATGTGCGGAAC3'	4397-4419	
ALV-1 (601 nt)	ALV1-F5818	5'CTTGCTTCTGAGCTATACACTG3'	5761-5782 (ALV-1: OP271663)	Xiao et al. (2022)
	ALV1-R6419	5'GTGCACTTCCGTTTCCGGTG3'	6342-6361	

⁽¹⁾ nt: nucleotídeos.⁽²⁾ f (iniciador senso ou viral).⁽³⁾ r (iniciador reverso ou complementar).

Clonagem e variabilidade viral dos vírus latentes

Os fragmentos de DNA de tamanhos esperados em gel de agarose dos vírus ASPV/AGCaV, ASPV, ASGV e ACLSV foram purificados do gel usando um *kit* comercial e ligados a um vetor para clonagem de produtos de PCR. A seguir, as ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *Escherichia coli* TOP10 por meio de choque térmico. O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se um *kit* comercial e a confirmação da inserção dos fragmentos

de DNA clonados nos plasmídeos recombinantes foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI* e posterior avaliação em gel de agarose. O sequenciamento de nucleotídeos dos insertos nos plasmídeos recombinantes foi realizado pelo método de terminadores de cadeia (Sanger).

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos obtidas dos isolados virais estudados e sequências de outros isolados homólogos brasileiros e estrangeiros, disponíveis no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram comparadas entre si utilizando os recursos BLASTn e BLASTp do NCBI, respectivamente, e

Tabela 3. Relação dos vírus, isolados e variante virais de macieira estudados e outras informações geradas.

Vírus	Isolado viral	Sequência parcial obtida	Tamanho do fragmento de DNA (nucleotídeos)	Tamanho da sequência traduzida (aminoácidos)	Código de acesso no GenBank ⁽¹⁾	Hospedeira (macieira, código)	Origem
ASPV (AGCaV)	SP-M024	Polimerase de RNA dependente de RNA	273	90	PV454970	Fuji (M024)	São Joaquim (SC)
	SP-M015	Polimerase de RNA dependente de RNA	273	90	PV454971	Royal Gala (M015)	Pomar comercial da região Sul
	SP-M012	Polimerase de RNA dependente de RNA	273	90	PV454972	Royal Gala (M012)	Pomar comercial da região Sul
ASPV	SP-M015	Proteína capsidial	366	99	PV454973	Royal Gala (M015)	Pomar comercial da região Sul
	SP-M286	Proteína capsidial	366	99	PV454974	Monalisa (M286)	Caçador (SC)
ASGV	SG-M286	Proteína capsidial	524	160	PV454975	Monalisa (M286)	Caçador (SC)
	SG-M2282	Proteína capsidial	524	160	PV454976	Maxi Gala (M2282)	Vacaria (RS)
ACLSV	CL-M015	Proteína capsidial	358	119	PV454977	Royal Gala (M015)	Pomar comercial da região Sul
	CL-M012	Proteína capsidial	358	119	PV454978	Royal Gala (M012)	Pomar comercial da região Sul
ALV-1	BR-Brae	ORF1-ORF2	443	147	PP824367	Braeburn (M061)	Vacaria (RS)
		ORF3-ORF5	478	159	PP824368		
		ORF7 e ORF8	601	13 (ORF7) 38 (ORF8)	PP824348		
		ORF1-ORF2	565	188	PP922176 ⁽²⁾		
		ORF3 e ORF4	651	173 (ORF3) 164 (ORF4)	PP922177 ⁽²⁾		

⁽¹⁾ NCBI/GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).⁽²⁾ Sequências obtidas por HTS.

as identidades obtidas fundamentaram o estudo de variabilidade viral. Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram realizados utilizando-se software apropriado de bioinformática (Larkin et al., 2007). As relações filogenéticas foram inferidas usando-se o método de máxima verossimilhança, modelo Kimura de dois parâmetros, sítios invariáveis (I) e 1000 replicações *bootstrap*, implementadas com auxílio de um programa específico para análises filogenéticas (Tamura et al., 2021).

Identificação de um isolado brasileiro de luteovírus

Uma amostra de macieira da cultivar Braeburn, acesso M061, com cerca de 25 anos à época em que foi originalmente coletada em um pomar comercial em Vacaria, RS, foi avaliada mais detalhadamente após a análise inicial indicar a suspeita de infecção pelo ALV-1 (Nickel; Fajardo, 2021). Na amostragem e durante as observações subsequentes em telado, essas plantas não apresentaram sintomas perceptíveis de virose.

O extrato de ácidos nucleicos totais da casca verde de ramos foi enriquecido em dsRNA para preparar o cDNA para uma biblioteca de sequenciamento de alto rendimento (*High-throughput sequencing*, HTS) usando-se *kit* compatível com a plataforma de sequenciamento direcional de mRNA. O RNA ribossomal da planta foi eliminado usando-se *kit* para depleção de rRNA específico para plantas e compatível com a plataforma de sequenciamento. Foi usada plataforma norte-americana comercial para o sequenciamento bidirecional de alto rendimento, para leituras de até 150 nucleotídeos de tamanho. As sequências de pequenos fragmentos de DNA (*reads*) foram empregadas na montagem *de novo*, obtendo-se os *contigs* virais, que foram identificados utilizando-se o recurso BLAST do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e comparados com os acessos do banco de dados GenBank. Como resultado inicial, comprovadamente, a comunidade viral da amostra incluía os seguintes vírus, ACLSV, ASGV, ASPV, ARWV-1 e ARWV-2 (Nickel et al., 2020). No âmbito desse trabalho, nova análise de bioinformática foi realizada usando-se o comando *map to reference* de um software comercial específico para análise de dados de HTS. As leituras dos dados brutos do sequenciamento de RNA (RNA-Seq) da cultivar Braeburn foram alinhadas com o genoma de referência do ALV-1 (NC_040680), visando-se a montagem de *contigs* maiores ou do genoma quase completo. As sequências obtidas foram analisadas

individualmente, usando-se o recurso BLASTn do NCBI comparando-as com acessos do GenBank.

A análise de bioinformática adicional revelou a presença do ALV-1 nesta amostra. Para confirmar a presença desse vírus, identificado por HTS, o RNA total da amostra original foi testado por RT-PCR usando-se os pares de iniciadores ALV-1 F1 / ALV-1 R1 (Lim et al., 2019), ALuDetF6 / ALuDetR6 (Liu et al., 2018) e, ALV1-F5818 / ALV1-R6419 (Xiao et al., 2022), que promoveram a amplificação de fragmentos de DNA de 443, 478 e 601 pares de bases (pb), respectivamente, do genoma do ALV-1 (Tabela 2). Esses fragmentos de DNA foram ligados a vetor comercial de clonagem, e os plasmídeos recombinantes, isolados de culturas de *E. coli* transformadas e crescidas a 37 °C por 14 horas, foram sequenciados pelo método de terminadores de cadeia.

As identidades de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos entre as sequências obtidas do isolado brasileiro de ALV-1 e isolados homólogos estrangeiros, disponíveis no GenBank, foram determinadas utilizando-se o recurso BLAST do NCBI, visando-se a confirmação da identidade do patógeno na amostra infectada. Alinhamentos de múltiplas sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA sequenciados foram realizados usando o recurso MUSCLE e uma matriz de identidade de sequências de nucleotídeos aos pares foi gerada usando-se um software apropriado de bioinformática (Muhire et al., 2014). As mesmas sequências de nucleotídeos dos *contigs*, obtidos a partir da montagem das leituras de HTS, também foram submetidas a alinhamentos múltiplos com auxílio de um software específico para bioinformática (Larkin et al., 2007). As relações filogenéticas foram inferidas usando-se o método de máxima verossimilhança, modelo Kimura de dois parâmetros, sítios invariáveis (I) e 1000 replicações *bootstrap*, implementadas em programa específico para análises filogenéticas (Tamura et al., 2021).

Adicionalmente, o ALV-1 foi indexado por RT-PCR utilizando-se o par de iniciadores ALV1-F5818 / ALV1-R6419 (Xiao et al., 2022) e RNAs totais extraídos de 50 acessos, incluindo as 19 amostras de macieiras descritas na Tabela 1, as quais foram originalmente coletadas nas principais regiões produtoras de maçã dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, propagadas e mantidas sob condições controladas em telado. A RT-PCR em única etapa foi realizada usando um *kit* comercial e as reações foram elaboradas conforme recomendado a partir de 4 µL (aproximadamente 400 ng) de RNA total.

Resultados e discussão

Deteção e caracterização molecular parcial de vírus latentes em macieiras

A incidência de vírus nas 19 amostras avaliadas por RT-PCR foi de 26,3% (ACLSV), 63,2% (ASGV), 57,9% (ASPV), 31,6% (ASPV/AGCaV) e uma amostra positiva para ALV-1. Em relação ao tipo de infecção, foi observado ausência de infecção (em 5 plantas) e infecções simples (3 plantas), dupla (6 plantas), tripla (uma planta), com quatro vírus (3 plantas) e cinco patógenos virais (uma planta) nas cultivares avaliadas (Tabela 1). Desta forma, o ASGV e o ASPV foram prevalentes nos acessos de macieiras indexados, seguidos pelo ACLSV. Como a transmissão desses vírus é principalmente favorecida pelo plantio de material propagativo (mudas) infectado, visto que esses vírus não possuem vetores, informações sobre incidência e prevalência podem auxiliar na definição de alternativas de manejo e controle de viroses. Este trabalho está inserido num contexto que visa ampliar o conhecimento sobre patógenos virais associados a acessos de macieiras mantidos em uma coleção na Embrapa Uva e Vinho.

Todas as sequências de nucleotídeos geradas foram depositadas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (Tabela 3). As maiores identidades de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos deduzidos (aad) entre as sequências obtidas nesse trabalho para os vírus latentes da macieira, ASPV variante AGCaV (três isolados com a caracterização parcial baseada no gene da polimerase de RNA dependente de RNA), ASPV, ASGV e ACLSV (dois isolados de cada vírus com a caracterização parcial baseada no gene da proteína capsial) e alguns vírus/isolados homólogos, com acessos disponíveis no GenBank, são apresentadas na Tabela 4. Desta forma, alguns fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR foram sequenciados e analisados, confirmando-se a especificidade das detecções virais. As identidades de nucleotídeos entre os vírus/variantes estudados e vírus/isolados homólogos nacionais ou estrangeiros, previamente caracterizados, foram altas, sendo de até 96,7% (ASPV variante AGCaV), até 97,5% (ASPV), até 98,9% (ASGV) e até 98,9% (ACLSV) (Tabela 4). Assim, os isolados caracterizados dos três vírus latentes exibiram alta conservação de sequência com isolados homólogos que infectam diferentes cultivares de macieira e outras frutíferas (por exemplo, marmelo), bem como provenientes de diferentes regiões geográficas. No entanto, mesmo em um estudo restrito, envolvendo apenas dois isolados de cada vírus (ASPV, ASGV

e ACLSV), foi possível verificar diferenças na variabilidade genética viral, alta para o ASPV e baixa para o ASGV e ACLSV. Por exemplo, a identidade de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos entre os isolados SP-M015 (GenBank PV454973) e SP-M286 (PV454974) de ASPV foi de 82% e de 98,9%, respectivamente; entre os isolados SG-M286 (PV454975) e SG-M2282 (PV454976) de ASGV foi de 92,2% e de 98,1% e entre os isolados CL-M015 (PV454977) e CL-M012 (PV454978) de ACLSV foi de 97,5% e de 100%.

As identidades de nucleotídeos (de até 98,9%) entre os isolados virais caracterizados foram um pouco menores comparativamente às identidades de aminoácidos deduzidos (de até 100%), considerando-se os fragmentos amplificados, situados no gene que codifica a proteína capsial dos vírus ASPV, ASGV e ACLSV (Tabela 4). A proteína capsial tem função estrutural, ou seja, compõe a estrutura física da partícula viral. Assim, fatores evolutivos podem restringir variações nesse gene que não sejam convenientes para o vírus, por exemplo, que pudessem provocar a perda da capacidade de interação com fatores da planta hospedeira ou com vetores, quando o vírus os possui (Li et al., 2020; Vats et al., 2024). Adicionalmente, as sequências dos iniciadores utilizados para os vírus ASPV, ASGV e ACLSV estão localizadas no gene da proteína capsial (CP), região mais conservada desses vírus, podendo favorecer a detecção de uma gama maior de isolados de um mesmo vírus, reduzindo a ocorrência de falso-negativos na RT-PCR (Candresse et al., 1995). A alta variabilidade genética do vírus e, conseqüentemente, o não reconhecimento das sequências virais pelos iniciadores, resultará em falhas de pareamento (Silva et al., 2008). De modo geral, todos os iniciadores utilizados se mostraram adequados para a detecção, ou seja, viabilizaram a amplificação específica de fragmentos dos vírus/isolados estudados (Figura 1).

Com a utilização do par de iniciadores CY57f /CY61r foi possível amplificar a variante do ASPV conhecida por AGCaV nas amostras analisadas. Os fragmentos amplificados de 273 pb de três isolados foram sequenciados e os isolados SP-M012 (GenBank PV454972) e SP-M015 (PV454971) apresentaram maiores identidades de nucleotídeos (96,7%) e de aminoácidos deduzidos (100%) com um isolado canadense de ASPV de macieira (MZ148058). Já o isolado SP-M024 (PV454970) diferiu significativamente dos anteriores, apresentando maiores identidades de nt (89,3%) e de aad (97,8%) com o mesmo isolado canadense de ASPV (Tabela 4). Entretanto, a maior identidade de nt

Tabela 4. Identidades de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos entre as sequências obtidas dos vírus latentes da macieira, ASPV variante AGCaV, ASPV, ASGV e ACLSV e sequências de vírus homólogos estrangeiros ou nacionais disponíveis no banco de dados GenBank.

Vírus	Isolado caracterizado (GenBank) ⁽¹⁾	Vírus homólogo (GenBank) ⁽¹⁾	País de origem	Hospedeira	Identidade de nucleotídeos (%)	Identidade de aminoácidos deduzidos (%)
ASPV (AGCaV)	SP-M024 (PV454970)	MZ148058 (ASPV)	Canadá	Macieira	89,3	97,8
		MZ148063 (ASPV)	Canadá	Macieira	88,2	97,8
		MZ148044 (ASPV)	Canadá	Macieira	86,3	96,7
		NC_018714 (AGCaV)	Canadá	Macieira	80,6	92,2
ASPV (AGCaV)	SP-M015 (PV454971) e SP-M012 (PV454972)	MZ148058 (ASPV)	Canadá	Macieira	96,7	100,0
		MZ148063 (ASPV)	Canadá	Macieira	94,8	100,0
		MZ147978 (ASPV)	Canadá	Macieira	88,3	98,9
		NC_018714 (AGCaV)	Canadá	Macieira	83,6	94,4
ASPV	SP-M015 (PV454973)	FR750244	Índia	Macieira	97,5	100,0
		MZ148081	Canadá	Macieira	91,8	100,0
		KM873721	Índia	Macieira	91,6	100,0
ASPV	SP-M286 (PV454974)	MW842997	Brasil	Macieira	92,9	100,0
		MZ148020	Canadá	Macieira	92,1	100,0
		MW843002	Brasil	Macieira	92,0	99,0
ASGV	SG-M286 (PV454975)	MK481976	China	Macieira	98,5	100,0
		MK481988	China	Macieira	98,5	99,4
		MK481987	China	Macieira	98,3	98,7
ASGV	SG-M2282 (PV454976)	MK481961	China	Macieira	98,9	100,0
		JN871585	China	Macieira	98,7	100,0
		FJ445218	China	Macieira	98,7	99,4
ACLSV	CL-M015 (PV454977)	MK929793	Brasil	Macieira	98,9	98,3
		AM292923	Grécia	Marmelo	98,6	100,0
		KX579122	Alemanha	Macieira	98,6	99,2
ACLSV	CL-M012 (PV454978)	AM292923	Grécia	Marmelo	98,3	100,0
		KP772636	China	Macieira	98,0	100,0
		KR605120	China	Macieira	97,8	99,2

⁽¹⁾ NCBI/GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

verificada entre os isolados SP-M012, SP-M015 e SP-M024 de ASPV (variante AGCaV) e um acesso de AGCaV, disponível no GenBank (HE963831/NC_018714), foi de 83,6% (Tabela 4). Resultados semelhantes já foram obtidos, ou seja, valores de identidade de nucleotídeos no gene da replicase viral entre isolados de ASPV (isolado PA66, GenBank

D21829 e B17-3, OQ819182) e isolados de AGCaV (Aurora-1, HE963831; CYD, KT835289 e Alborz-A5, OR537851) variaram entre 76,06 e 78,70% (Bougard et al., 2025). Existe alta diversidade genética entre isolados de ASPV, porém os critérios de demarcação de espécies no gênero *Foveavirus* são, no mínimo, 72% de identidade de nt ou 80% de

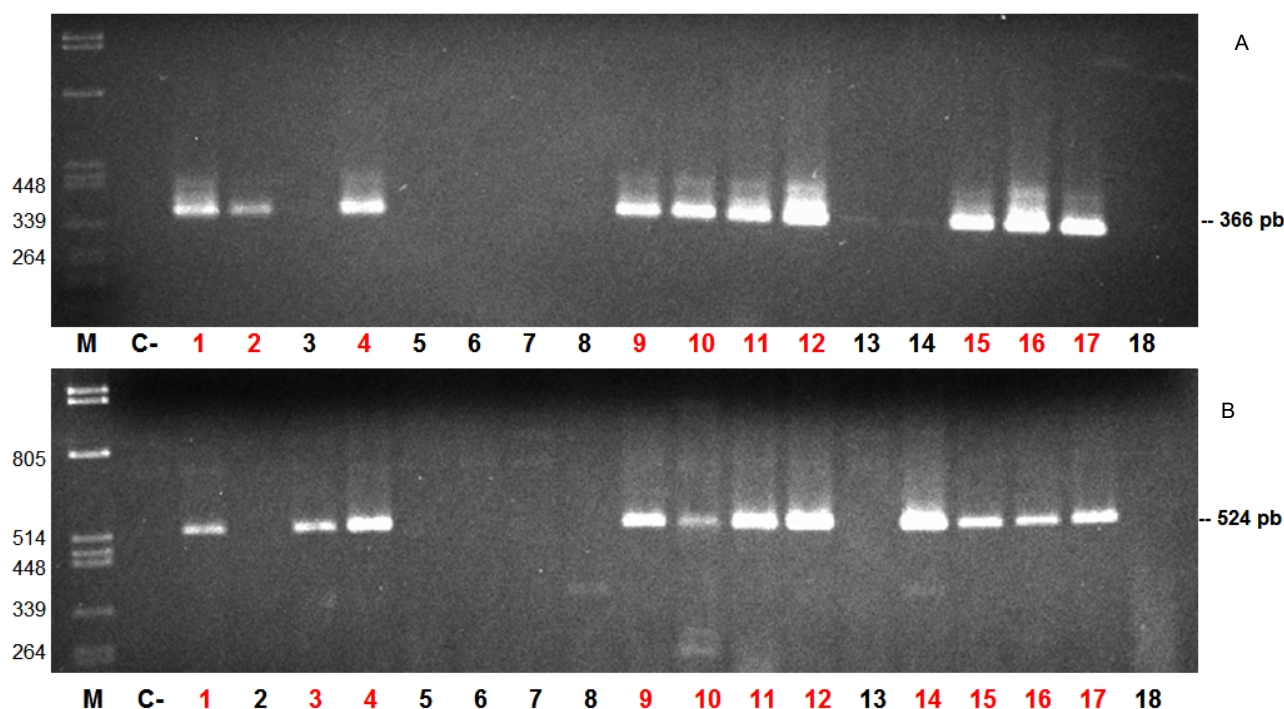


Figura 1. Análise eletroforética em géis de agarose das amplificações de cDNAs por RT-PCR para ASPV com os iniciadores ASPV 8869f / ASPV 9211r (A) e para ASGV com os iniciadores ASGV 5873f / ASGV 6396r (B) a partir das amostras de macieiras descritas na Tabela 1. Os fragmentos amplificados de 366 e 524 pb de ASPV e ASGV, respectivamente, estão indicados, bem como as amostras infectadas (em vermelho). Marcador de peso molecular (M) e controle sadio (C-). Os fragmentos de DNA clonados e sequenciados, poços 4 e 16 (ASPV) (A) e 16 e 17 (ASGV) (B) (Tabela 1), representam os controles positivos.

identidade de aad entre isolados, considerando-se os genes da proteína capsidial (CP) ou da polimerase viral (Adams et al., 2012).

O alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos dos isolados mencionados é apresentado na Figura 2, na qual é possível observar as posições de consenso e divergentes (com alterações de nucleotídeos). Alta variabilidade genética entre isolados de ASPV de diferentes hospedeiras (macieira, pereira e marmelo) foi relatada em vários países, incluindo o Brasil (Mathioudakis et al., 2021; Bougard et al., 2025).

A amplificação com iniciadores, originalmente desenhados para a detecção do AGCaV, comprova a ocorrência dessa variante genética do ASPV, bem como foi demonstrada a existência de variabilidade genética entre os isolados sequenciados dessa variante. No entanto, Costa et al. (2022) relataram discordâncias entre o sequenciamento do fragmento amplificado e os resultados individuais de RT - PCR/ RT-qPCR (RT-PCR em tempo real) envolvendo a detecção de AGCaV e ASPV em pomáceas. Segundo os autores, é possível que alguns iniciadores para AGCaV também tenham amplificado algumas estirpes de ASPV. Isso também poderia justificar a

detecção do AGCaV apenas por RT-qPCR em algumas amostras. Os iniciadores degenerados desenhados para a detecção do AGCaV por RT-qPCR também poderiam ter amplificado estirpes de ASPV.

No presente trabalho, para a definitiva detecção do AGCaV nas amostras analisadas, outros três pares de iniciadores foram avaliados por RT-PCR, 355f/1105r e 355f/898r (James et al., 2013) e CY57f/ CY72r (Morelli et al., 2017). Porém os resultados obtidos foram inconclusivos nesses casos (dados não mostrados). O AGCaV foi descrito como um potencial foveavírus distinto (James et al., 2013), mas devido à alta similaridade de nucleotídeos e à organização do genoma semelhante ao ASPV, atualmente é considerado uma variante do ASPV que causa o sintoma de ruga verde (*green crinkle*) em frutos de macieiras, caracterizado por depressões na casca dos frutos (Li et al., 2020).

Doenças virais representam uma ameaça ao desenvolvimento de plantas frutíferas perenes. Ao contrário de doenças causadas por outros patógenos, a exemplo de fungos, bactérias e nematoides, não há maneira economicamente viável de eliminar os vírus de uma planta infectada no campo. Assim, em geral, as medidas de controle de viroses são

PV454972_ASPV_Brasil	GAC	CTT	GGC	CTG	TTT	TCA	GCA	CTC	TGT	TTT	GTG	CAG	GTT	TGC	CCC	GTA	CAT	GAG	ATA	TAT	CGA	AGC	AAA	GGT	TGT	TGA
PV454971_ASPV_Brasil	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PV454970_ASPV_Brasil	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
MZ148058_ASPV_Canada	A..	.C.	A..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	C..	C..	...
NC_018714_AGCav_Canada	A..	TC.	...	T..	...	...	A..	...	A..	.C.	A..	...	A..	...	...	...	C..	T..	...	G..	...	T..	G..	C..	...	.T.
PV454972_ASPV_Brasil	AGT	TCT	ACC	TAA	AAA	TCT	CTA	TAT	TCA	TTC	TGG	GAA	GAA	CAT	AGA	CGA	TCT	TGC	TGC	TTG	GGT	GAC	TGT	GAA	TAA	ATT
PV454971_ASPV_Brasil	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PV454970_ASPV_Brasil	...	.T.	...	C..	...	...	...	C..	...	...	...	A..	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	.T	G..	...	C..	...
MZ148058_ASPV_Canada	...	...	C..	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...
NC_018714_AGCav_Canada	G..	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	T..	T..	T..	.T.	A..	.A	G..	...	C..	C..	CC.	...	G..	...
PV454972_ASPV_Brasil	CAA	TGG	GGT	ATG	CAC	CGA	GTC	TGA	TTA	CGA	AGC	TTT	TGA	TGC	GTC	ACA	GGA	CCA	CTT	TAT	TCT	TGC	CTT	TGA	GCT	TGA
PV454971_ASPV_Brasil	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PV454970_ASPV_Brasil	...	...	...	...	T..	...	C..	.A.	T..	...	...	C..	...	A..	G..	A..	T..	T..	C..	...	...	...	...	...	...	...
MZ148058_ASPV_Canada	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	T..	...	...	...
NC_018714_AGCav_Canada	...	.A.	...	...	A..	A..	A..	...	T..	...	A..	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	.T.	G..
PV454972_ASPV_Brasil	GGT	TAT	GAA	ATA	TCT	TGG	TCT	CCC	TCC	AGA	CCT	CAT	TGC	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PV454971_ASPV_Brasil	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PV454970_ASPV_Brasil	...	G..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
MZ148058_ASPV_Canada	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
NC_018714_AGCav_Canada	...	C..	...	.T	C..	...	...	T..	G..	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Figura 2. Alinhamento múltiplo das sequências parciais de nucleotídeos do gene da polimerase de RNA dependente de RNA do ASPV, variante AGCaV, com 273 pb. Sequências comparadas: isolados M012 (PV454972), M015 (PV454971) e M024 (PV454970) (Tabela 3), além de um isolado homólogo de ASPV (MZ148058) e da variante canadense do AGCaV (NC_018714). As posições de consenso são identificadas por pontos e as divergentes, em relação à sequência-base (isolado M012), com o nucleotídeo diferente.

essencialmente preventivas. Nesse contexto, conhecer a identidade do vírus desde o início da infecção é importante, pois as estratégias de manejo/controle da virose estão baseadas principalmente nas propriedades e características dos vírus, por exemplo, modo de transmissão, e estas podem diferir segundo o vírus (Fajardo; Nickel, 2019).

A RT-PCR foi utilizada com eficiência para detectar diferentes vírus, isolados e variantes virais em extratos de ácidos nucleicos totais de cascas de ramos de macieiras. Também foram determinadas as homologias de nt e aad dos isolados estudados em relação a isolados homólogos disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). Demonstrou-se a predominância de infecções virais múltiplas em macieiras assintomáticas, bem como, pela primeira vez, a provável ocorrência de uma variante genética do ASPV (AGCaV) associada a acessos brasileiros de macieiras. Assim, implementar a utilização de testes diagnósticos sensíveis e específicos, baseados em RT-PCR, para a indexação de matrizes e materiais propagativos é uma estratégia importante para a detecção dos vírus latentes da macieira e, consequentemente, para promover uma exploração sustentável e economicamente mais rentável dessa cultura.

Identificação de um isolado brasileiro de luteovírus

A montagem dos *contigs* do RNA-Seq foi realizada mapeando-se as sequências de pequenos fragmentos de DNA (*reads*) em relação a uma sequência de referência (*reference-based mapping*),

ou seja, o genoma de referência do ALV-1, isolado PA8 da Pensilvânia (GenBank NC_040680). Dessa forma, cerca de metade do genoma de um isolado brasileiro de ALV-1 foi reconstruído a partir da amostra de macieira sequenciada. No total 41,5 milhões de leituras de extremidades pareadas (*paired-end reads*) foram obtidas por HTS a partir da cultivar Braeburn. A análise dos dados brutos do HTS identificou 39 leituras mapeadas no genoma do ALV-1 em baixa cobertura. Onze *contigs* de até 651 nucleotídeos foram obtidos, distribuídos ao longo do genoma do ALV-1, totalizando 3.034 nucleotídeos de 6.001 nucleotídeos (nt) do genoma completo ou 50,5% do genoma de referência do ALV-1 (NC_040680). Dois dos maiores *contigs* com 565 nucleotídeos cobrindo o gene da poliproteína P1-P2 (ORF1-ORF2), codificando parcialmente a proteína de fusão P1-P2 da RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) (GenBank PP922176) e 651 nt cobrindo as sequências abertas de leitura das proteínas P3 (ORF3) e P4 (ORF4), que codificam parcialmente a proteína capsidial (CP) e a proteína de movimento (MP) (GenBank PP922177) (Tabela 3), exibiram 97,2 e 98,6% de identidades de nucleotídeos com a sequência de referência do ALV-1 (NC_040680), respectivamente.

As altas identidades de nucleotídeos determinadas entre diferentes isolados de ALV-1 da Bélgica, Canadá, República Tcheca, Hungria, Coreia do Sul, Turquia, EUA e o isolado brasileiro de ALV-1, BR-Brae, refletiram-se na análise filogenética quando considerados ambos *contigs* montados a partir do

sequenciamento HTS, ou seja, os agrupamentos formados demonstraram haver uma relação filogenética próxima entre os vários isolados. Ambos *contigs* do HTS (565 e 651 pb) do isolado BR-Brae se agruparam no maior clado (I) composto por isolados de países europeus, Canadá e/ou EUA, enquanto o clado II foi formado apenas por isolados de ALV-1 da República Tcheca e Canadá (GenBank ON855045, ON855046, ON855050 e OP271662) (Figuras 3A e 3B). Vários estudos demonstraram a importância do HTS para detectar vírus em macieiras e outras pomáceas (Costa et al., 2022). Entretanto, o RNA-Seq

(HTS) nem sempre irá recuperar genomas virais completos, quase completos ou *contigs* maiores, devido às características de replicação do vírus ou mesmo devido a aspectos relativos à técnica em si (Fajardo et al., 2017).

A amostra de macieira da cultivar Braeburn, identificada como infectada pelo ALV-1 por HTS, também foi confirmada como positiva para esse vírus por RT-PCR. Três fragmentos diferentes de DNA de tamanhos esperados foram amplificados, clonados e sequenciados confirmando a infecção pelo ALV-1. As sequências obtidas com 443 nucleotídeos

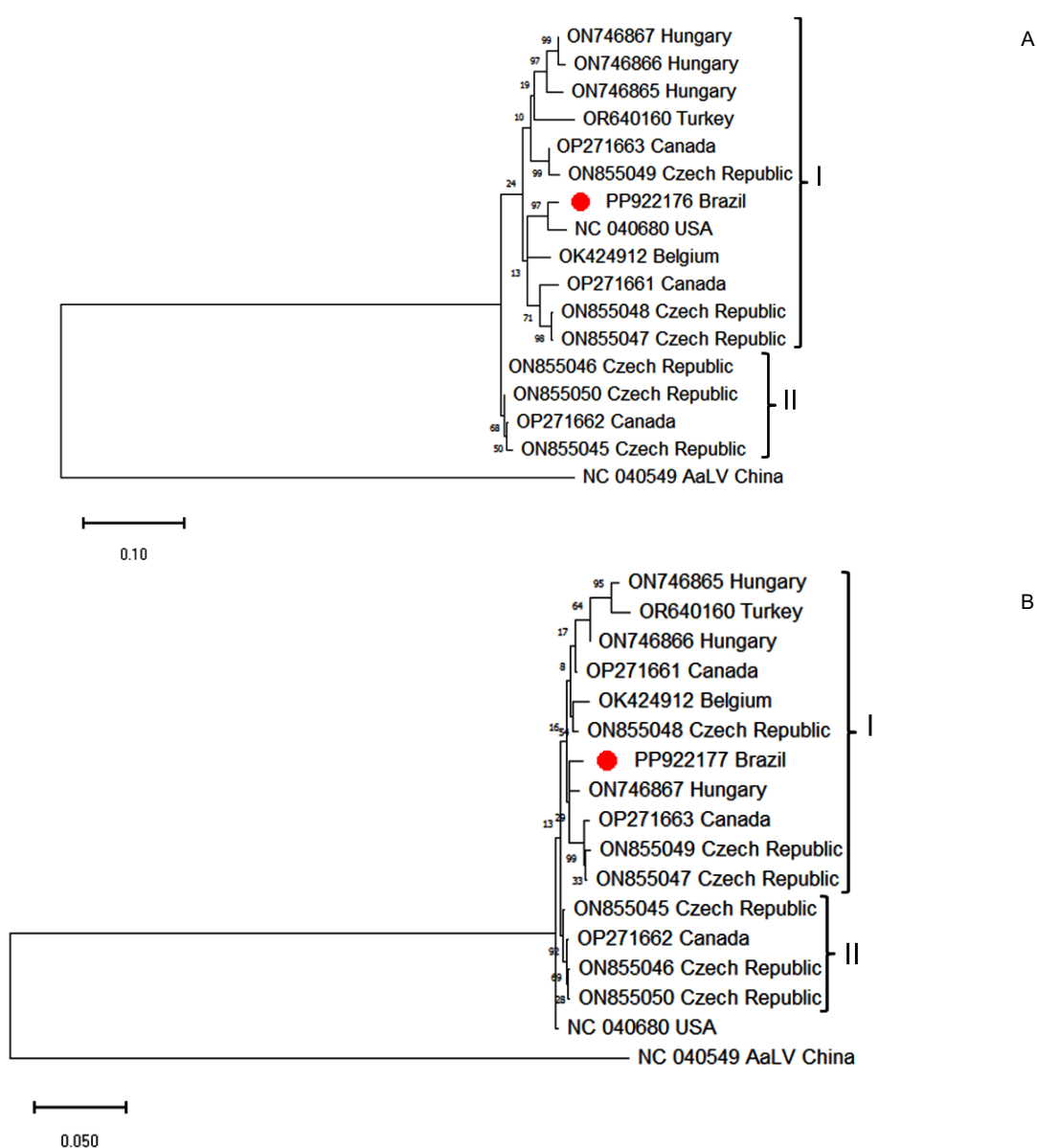


Figura 3. Relações filogenéticas baseadas nas sequências de nucleotídeos alinhadas dos *contigs* de 565 nucleotídeos no gene da poliproteína P1-P2 (GenBank PP922176) (A) e 651 nt nos genes das proteínas P3 e P4 (PP922177) (B) do isolado BR-Brae de ALV-1 e isolados homólogos disponíveis no GenBank usando-se o método de máxima verossimilhança. Os alinhamentos foram realizados com o recurso MUSCLE. Números nos ramos indicam valores de *bootstrap*. Foram utilizados, para o grupo externo da árvore, o apple-associated luteovirus (AaLV, *Luteovirus*, NC_040549) e, para o isolado-tipo do ALV-1, GenBank NC_040680.

(GenBank PP824367), que codificam parcialmente o gene da poliproteína P1-P2 (ORF1-ORF2); 478 nt (GenBank PP824368), que codificam parcialmente o gene da poliproteína P3-P5 (ORF3-ORF5) e, finalmente, 601 nt (GenBank PP824348), que codificam parcialmente os genes das proteínas P7 (ORF7) e P8 (ORF8) (Tabela 3) exibiram altas identidades de nucleotídeos com isolados homólogos de ALV-1. O isolado brasileiro BR-Brae de ALV-1 apresentou identidades de nucleotídeos de 97,7 e 97,5% com o isolado PA8 (NC_040680), considerando os fragmentos de DNA de 443 e 478 pb, respectivamente, e 99% com o isolado BC134 (OP271663). As identidades de nucleotídeos dessas sequências do isolado BR-Brae de ALV-1 com vários outros isolados estrangeiros desse vírus, disponíveis no GenBank, foram altas, variando de 95 a 97,7% (443 nt), 93 a 98,5% (478 nt) e 96,7 a 99% (601 nt) (Figuras 4A e 4B).

Várallyay et al. (2022) analisaram nove genomas quase completos de ALV-1. As identidades das sequências e as análises filogenéticas os dividiram em dois grupos e todos os isolados húngaros e tchecos de ALV-1 foram agrupados segundo o país. Os autores também determinaram que a variabilidade estimada de nucleotídeos atingiu 8% sendo que a maioria das alterações de nucleotídeos encontrava-se nas ORF1 e ORF5. Xiao et al. (2022) detectaram o ALV-1 em cinco amostras compostas de macieiras com as identidades das sequências de nucleotídeos desses isolados e o genoma de referência do ALV-1 variando de 94 a 99%. Assim, os resultados obtidos com o isolado brasileiro de ALV-1 são similares às informações disponíveis para outros isolados desse vírus.

O número restrito de amostras indexadas por RT-PCR para avaliar a presença do ALV-1 poderia ser uma explicação para a detecção do vírus em apenas uma amostra. Este resultado sugere que esse vírus teria baixa incidência nas regiões produtoras de maçãs do país, já que as amostras analisadas originalmente foram coletadas em pomares comerciais. Como a incidência projetada seria muito baixa, haveria também menor possibilidade de disseminação do vírus a partir de macieiras infectadas. A área de cultivo da 'Braeburn' no país é pequena, o que também restringiria a eventual disseminação de infecções virais. Liu et al. (2018) demonstraram que o ALV-1 é transmissível por enxertia para mudas de macieiras e o vírus pode se disseminar pela propagação vegetativa de enxertos e/ou porta-enxertos.

O ALV-1 foi relatado em outros países produtores de maçã, incluindo Bélgica, Canadá, República Tcheca, Grécia, Hungria, Coreia do Sul, Turquia e

EUA (Liu et al., 2018; Lim et al., 2019; Malandraki et al., 2020; Fontdevila Pareta et al., 2022; Várallyay et al., 2022; Xiao et al., 2022; Akdura et al., 2024), sugerindo ampla disseminação, provavelmente por meio do intercâmbio de materiais propagativos infectados. A importância do ALV-1 para a pomicultura deriva do fato desse patógeno ter sido encontrado associado a disfunções, não totalmente esclarecidas, caracterizadas pelo declínio da macieira em vários países. No nordeste dos EUA, esse vírus, em associação com ACLSV, ASGV e/ou ASPV, foi encontrado em plantas com sintomas do declínio rápido da macieira (*rapid apple decline*, RAD), especialmente nas cultivares Fuji, Gala e Golden Delicious enxertadas em vários porta-enxertos, sendo o M9, o mais afetado. As macieiras afetadas apresentavam necrose do tronco, rachaduras e cancrios (Liu et al., 2018). Na Coreia do Sul, o ALV-1 também foi detectado em infecções múltiplas, incluindo o ARWV 1, em porta-enxertos de macieira M9 (Lim et al., 2019).

Vale destacar que a 'Braeburn' analisada apresentou infecções múltiplas com vários vírus, incluindo os vírus latentes ACLSV, ASGV e ASPV (Tabela 1), comuns em macieiras, além do ARWV 1 e ARWV 2, conforme relatado anteriormente por Nickel et al. (2020) e da infecção com o ALV-1, comprovada neste trabalho. Em vários casos relatados (Malandraki et al., 2020), o ALV-1 foi detectado em plantas doentes exibindo infecções mistas com outros vírus, dificultando sua associação com sintomas específicos da doença.

Provavelmente, as síndromes de declínio não podem ser explicadas por um único fator. A infecção viral pode enfraquecer as plantas, contribuindo, no futuro, para comprometer ainda mais a sanidade. As análises de sintomas indicaram a necessidade de pesquisa multidisciplinar com foco em fatores bióticos (fungos, bactérias, vírus/viroides) e ambientais (baixa temperatura, tipo de solo e condições climáticas relacionadas ao estresse da planta) em face da etiologia aparentemente complexa do declínio da macieira (Lee et al., 2023). Wunsch et al. (2024) sugerem que os vírus avaliados ASGV, ACLSV, ASPV/AGCaV, ARWV 2, CCGaV, tobacco ringspot virus (TRSV), tomato ringspot virus (ToRSV) e o viroide AHVd, dentre outros, não seriam os principais responsáveis pelo declínio rápido da macieira e destacam a necessidade de novos trabalhos para avaliar a relação entre a fisiologia das plantas e o estresse hídrico com o declínio da macieira, bem como a eficácia potencial de práticas culturais para a mitigação do problema.

Os dados de sequências virais obtidos neste estudo para um isolado brasileiro de ALV-1 expandem

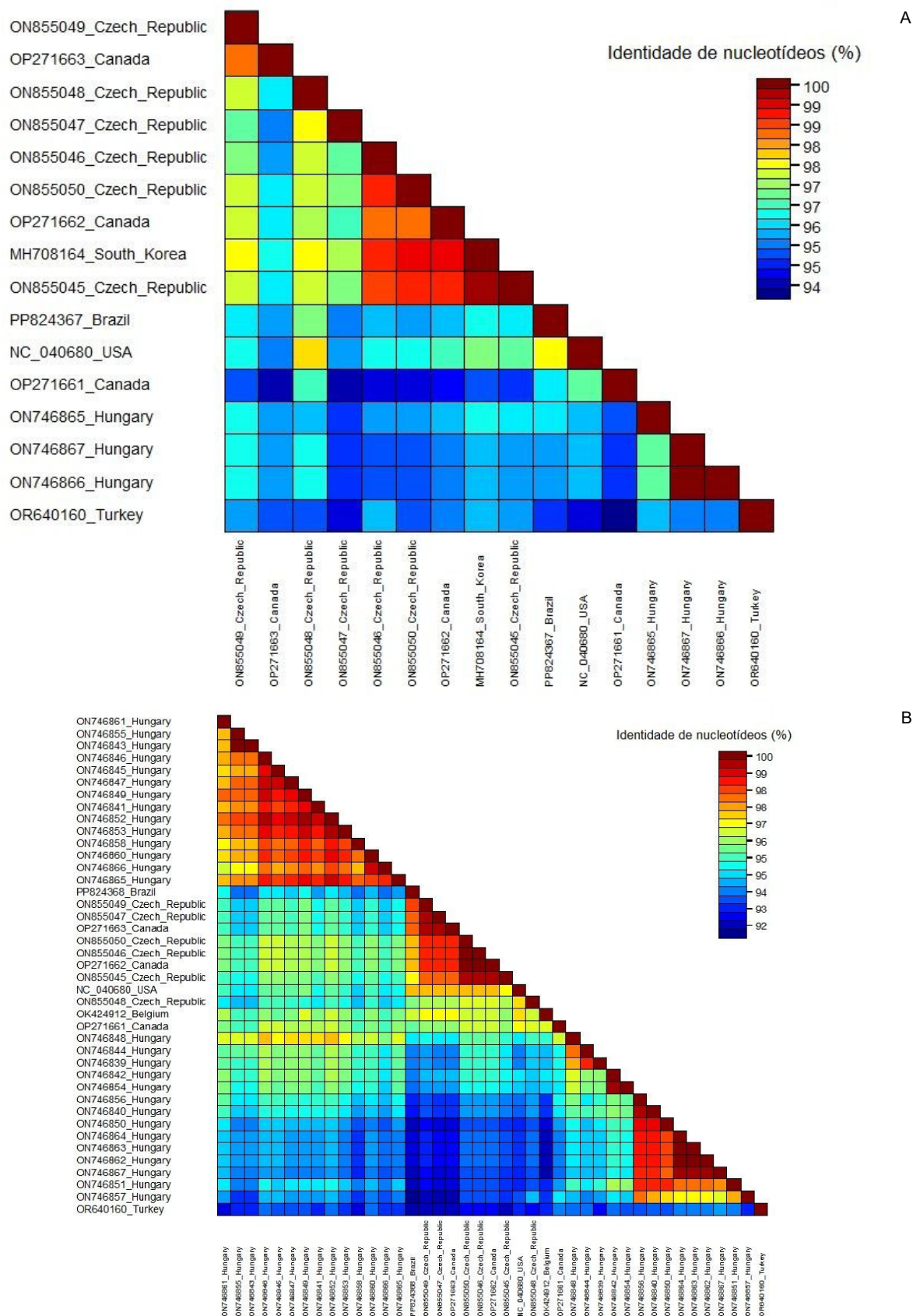


Figura 4. Matriz de identidade de sequências de nucleotídeos aos pares gerada usando um software de bioinformática (Muhire et al., 2014), incluindo duas sequências obtidas do isolado brasileiro de ALV-1, BR-Brae, com 443 nucleotídeos (GenBank PP824367) (A) e 478 nt (PP824368) (B) e vários isolados homólogos estrangeiros desse vírus disponíveis do GenBank. Os países de origem dos isolados são mencionados após os códigos de acesso do GenBank. Sequência de referência do ALV-1, NC_040680. A porcentagem de identidade entre as sequências está representada como mapa de calor.

o conhecimento sobre a diversidade de vírus que ocorrem em macieiras no país e podem contribuir para a implementação de testes diagnósticos mais precisos visando indexar matrizes de macieira. É importante ressaltar a necessidade de avaliar diferentes cultivares de macieira para determinar possíveis infecções pelo ALV-1, avaliar a disseminação desse vírus, bem como sua possível participação na etiologia de outras doenças, relevantes para a cultura. Este estudo amplia a distribuição geográfica do ALV-1, sendo a primeira caracterização de um isolado desse vírus associado a um acesso de macieira no país. Estudos adicionais são necessários para determinar a incidência, a prevalência e eventuais efeitos negativos à macieira provocados pelo ALV-1 no país.

Conclusões

- 1) Constatou-se a predominância de infecções virais múltiplas em macieiras infectadas por três dos vírus latentes investigados, o que pode resultar em efeitos negativos mais pronunciados nas infecções da macieira.
- 2) Foram demonstradas algumas especificidades relativas ao diagnóstico viral em macieiras infectadas com diferentes vírus, isolados e variante virais. Obtiveram-se avanços em relação à compreensão da variabilidade e diversidade viral em macieiras pelo emprego de diferentes técnicas moleculares.
- 3) Uma variante genética do apple stem pitting virus, denominada apple green crinkle associated virus, foi detectada e caracterizada pela primeira vez associada a macieiras no país.
- 4) Foi confirmada a identidade de um isolado brasileiro de apple luteovirus 1 associado a um acesso de macieira por meio de sequenciamento convencional e de alto rendimento e amplificação direcionada.
- 5) Recomenda-se que os patógenos virais, isolados ou variante abordados nesse trabalho sejam considerados em processos de produção e indexação de matrizes de macieiras, visando-se elevar a sanidade dos materiais propagativos utilizados em pomares.

Agradecimentos

Ao técnico Marcos Fernando Vanni da Embrapa Uva e Vinho pelo apoio na execução dos testes laboratoriais de indexação viral. A Thierry Candresse (Institut National de Recherche pour l'Agriculture,

l'Alimentation et l'Environnement, INRAE) pelo auxílio na análise preliminar de bioinformática dos dados de HTS. O trabalho foi executado e financiado no âmbito do projeto de pesquisa Embrapa SEG 20.18.03.036.00.00.

Referências

- ADAMS, M. J.; CANDRESSE, T.; HAMMOND, J.; KREUZE, J. F.; MARTELLI, G. P.; MAMBA, S.; PEARSON, M. N.; RYU, K. H.; SALDARELLI, P.; YOSHIKAWA, N. Family *Betaflexiviridae*. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (eds). **Virus taxonomy**. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Elsevier, 2012. Part II: The Viruses, p. 920-941. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00078-1>
- AKDURA, N.; MENDOZA, J.; HASSELHOFF, S.; COSTA, L.; HU, X.; YANG, Y.; FOSTER, J. A.; MCFARLAND, C.; HURTADO-GONZALES, O. P. First report of three bunyavirus-like viruses, apple luteovirus 1, and apple hammerhead viroid in apples from Hakkari, Türkiye. **Plant Disease**, v. 108, n. 2, p. 541, Feb. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-23-2151-PDN>.
- ARAÚJO, L.; MEDEIROS, H. A.; PASA, M. S.; SILVA, F. N. Doenças da macieira e da pereira. **Informe Agropecuário**, v. 37, n. 291, p. 61-74, 2016. Disponível em: <https://www.livrariaepamig.com.br/docs/ia-291-manejo-de-doencas-de-fruteiras-de-clima-temperado-subtropical-e-tropical>. Acesso em: 08 abril 2025.
- BARBA, M.; ILARDI, V.; PASQUINI, G. Control of pome and stone fruit virus diseases. **Advances in Virus Research**, v. 91, p. 47-83, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.001>
- BOUGARD, K.; MAREE, H. J.; BESTER, R. Discovery of a divergent apple stem pitting virus variant and development of an RT-PCR assay for improved detection in South African pear orchards. **Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 1069-1076, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-025-01867-5>.
- CANDRESSE, T.; LANNEAU, M.; REVERS, F.; GRASSEAU, N.; MACQUAIRE, G.; GERMAN, S.; MALINOWSKI, T.; DUNEZ, J. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus. **Acta Horticulturae**, v. 386, p. 136-147, 1995. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.386.17>.
- CHEN, S.; YE, T.; HAO, L.; CHEN, H.; WANG, S.; FAN, Z.; GUO, L.; ZHOU, T. Infection of apple by apple stem grooving virus leads to extensive alterations in gene expression patterns but no disease symptoms. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, e95239, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095239>.

COSTA, L. C.; ATHA, B.; HU, X.; LAMOUR, K.; YANG, Y.; O'CONNELL, M.; MCFARLAND, C.; FOSTER, J. A.; HURTADO-GONZALES, O. P. High-throughput detection of a large set of viruses and viroids of pome and stone fruit trees by multiplex PCR based amplicon sequencing. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 1072768, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1072768>.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. **Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2019. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 110). 25p. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195251/1/Doc110.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2025.

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, p. 250-260, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-017-0142-8>.

FONTDEVILA PARETA, N.; LATEUR, M.; STEYER, S.; BLOUIN, A. G.; MASSART, S. First reports of apple luteovirus 1, apple rubodvirus 1 and apple hammerhead viroid infecting apples in Belgium. **New Disease Reports**, v. 45, n. 2, e12076, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/ndr2.12076>.

FUCHS, M.; ALMEYDA, C. V.; AL RWAHNIH, M.; ATALLAH, S. S.; CIENIEWICZ, E. J.; FARRAR, K.; FOOTE, W. R.; GOLINO, D. A.; GÓMEZ, M. I.; HARPER, S. J.; KELLY, M. K.; MARTIN, R. R.; MARTINSON, T.; OSMAN, F. M.; PARK, K.; SCHARLAU, V.; SMITH, R.; TZANETAKIS, I. E.; VIDALAKIS, G.; WELLIVER, R. Economic studies reinforce efforts to safeguard specialty crops in the United States. **Plant Disease**, v. 105, n. 1, p. 14-26, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1061-FE>.

GUERRA, D. S.; NICKEL, O.; DEL PONTE, E. M.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; FAJARDO, T. V. M.; MARODIN, G. A. B. Development of glomerella leaf spot is enhanced in virus-infected Maxi Gala apples. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 1, p. 237-241, 2012. DOI: <https://www.jstor.org/stable/45156030>.

IBGE. Produção de Maça 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maca/br>. Acesso em: 01 abril 2025.

JAMES, D.; VARGA, A.; JESPERSON, G. D.; NAVRATIL, M.; SAFAROVA, D.; CONSTABLE, F.; HORNER, M.; EASTWELL, K.; JELKMANN, W. Identification and complete genome analysis of a virus variant or putative new foveavirus associated with apple green crinkle disease. **Archives of Virology**, v. 158, p. 1877-1887, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1678-7>.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal

W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, Nov. 2007. DOI: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.

LEE, S.-Y.; PETER, K. A.; DAS, K.; DIANE, A.-R.; JUNG, H.-Y. The rapid apple decline phenomenon: Current status and expected associated factors in Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 39, n. 6, p. 538-547, Dec. 2023. DOI: <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.09.2023.0132>.

LI, C.; YAEGASHI, H.; KISHIGAMI, R.; KAWAKUBO, A.; YAMAGISHI, N.; ITO, T.; YOSHIKAWA, N. Apple russet ring and apple green crinkle diseases: fulfillment of Koch's postulates by virome analysis, amplification of full-length cDNA of viral genomes, in vitro transcription of infectious viral RNAs, and reproduction of symptoms on fruits of apple trees inoculated with viral RNAs. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1627, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01627>.

LIM, S.; BAEK, D.; MOON, J. S.; CHO, I. S.; CHOI, G. S.; DO, Y. S.; LEE, D. H.; LEE, S. H. First report of apple luteovirus 1 and apple rubbery wood virus 1 on apple tree rootstocks in Korea. **Plant Disease**, v. 103, n. 3, p. 591, March 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1351-PDN>.

LIU, H.; WU, L.; NIKOLAEVA, E.; PETER, K.; LIU, Z.; MOLLOV, D.; CAO, M.; LI, R. Characterization of a new apple luteovirus identified by high-throughput sequencing. **Virology Journal**, v. 15, n. 85, May 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0998-3>.

MACKENZIE, D. J.; MACLEAN, M. A.; MUKERIJ, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 81, n. 2, p. 222-226, Feb. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.222>.

MALANDRAKI, I.; BERIS, D.; VASSILAKOS, N.; VARVERI, C. First report of apple luteovirus 1 in apple trees in Greece. **Plant Disease**, v. 104, n. 9, p. 2530, Sept. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0553-PDN>.

MANZOOR, S.; NABI, S. U.; AYAZ, A.; RASOOL, B.; SHARMA, S. K.; CHESTI, M. H.; PARVEEN, S.; VERMA, M. K.; DIAB, M. A.; RABBEE, M. F. Unveiling viral threats to temperate pome fruits: characterization, transmission, and sustainable management strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, n. 1560720, March 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1560720>.

MATHIOUDAKIS, M. M.; MALIOGKA, V. I.; CANDRESSE, T.; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; BUDZYŃSKA, D.; HASIÓW-JAROSZEWSKA, B.; KATIS, N. I. Molecular characterization of the coat protein gene of Greek apple stem pitting virus isolates: evolution through deletions, insertions, and recombination events. **Plants**, v. 10, n. 5, article 917, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10050917>.

MENZEL, W.; JELKMANN, W.; MAISS, E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. **Journal of Virological Methods**, v. 99, n. 1-2, p. 81-92, Jan. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00381-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00381-0).

MORELLI, M.; GIAMPETRUZZI, A.; LAGHEZZA, L.; CATALANO, L.; SAVINO, V. N.; SILDARELLI, P. Identification and characterization of an isolate of apple green crinkle associated virus involved in a severe disease of quince (*Cydonia oblonga*, Mill.). **Archives of Virology**, v. 162, n. 1, p. 299-306, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3074-6>.

MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLOS One**, v. 9, e108277, Sept. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 55 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 69). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/579037/1/CNPUVDOC.6909.pdf>. Acesso em: 01 abril 2025.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Eliminação de vírus latentes de macieiras por quimioterapia e cultivo de meristemas in vitro**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 193). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153197/1/Comunicado-Tecnico-193.pdf>. Acesso em: 08 abril 2025.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Novas viroses diagnosticadas em macieiras no Brasil por sequenciamento de alto desempenho (HTS)**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021. 18 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular técnica, 161). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224400/1/CircTec-161-o.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2025.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; CANDRESSE, T. First report on detection of three bunya-like viruses in apples in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 3088, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0283-PDN>.

NCKEL, O.; GRYNBERG, P.; FAJARDO, T. V. M. Detection of multiple viruses and viroid in apple trees in Brazil and their possible association with decline. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 18, n. 1, article 10, March 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13314-023-00492-4>.

NICKEL, O.; SILVA, F. N.; FAJARDO, T. V. M.; GO-RAYEB, E. S. Characterization and genetic variability of coat protein genes of Apple chlorotic leaf spot virus isolates from southern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 109-116, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0197-6>.

PEDRELLI, A.; NALI, C.; PANATTONI, A.; PELLEGRINI, E.; COTROZZI, L. Apple chlorotic leaf spot virus infection affects the physiology and biochemistry of leaves and the quality of fruits of Tuscany (Italy) autochthonous apple varieties. **Plant Pathology**, v. 74, n. 1, p. 158-170, Jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.14004>.

ROTT, M. E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 411-420, May 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1011264400482>.

ROTT, M. E.; KESANAKURTI, P.; BERWARTH, C.; RAST, H.; BOYES, I.; PHELAN, J.; JELKMANN, W. Discovery of negative-sense RNA viruses in trees infected with apple rubbery wood disease by next-generation sequencing. **Plant Disease**, v. 102, n. 7, p. 1254-1263, July 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0851-RE>.

SILVA, F. N.; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; BOGO, A. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 157-161, Abr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000200011>

SOUZA, E. B.; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; SILVA, J. M. F.; BARROS, D. R. Biological and molecular characterization of two Brazilian isolates of Apple stem grooving virus. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 391-396, June 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0163-3>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, July 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

VÁRALLYAY, E.; PŘIBYLOVÁ, J.; GALBACS, Z. N.; JAHAN, A.; VARGA, T.; ŠPAK, J.; LENZ, O.; FRÁNOVÁ, J.; SEDLÁK, J.; KOLONIUK, I. Detection of apple hammerhead viroid, apple luteovirus 1 and citrus concave gum associated virus in apple propagation materials and orchards in the Czech Republic and Hungary. **Viruses**, v. 14, n. 11, article 2347, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14112347>.

VATS, G.; SHARMA, V.; NOORANI, S.; RANI, A.; KAUSHIK, N.; KAUSHIK, A.; KALA, D.; NAGRAIK, R.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, S.; SINGH, B.; KAUSHAL, A.; WALIA, Y.; DHIR, S. Apple stem grooving capillovirus: plant pathogen and its potential as a tool in functional genomics and effective disease management. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 57, n. 4, p. 261-295, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2024.2359948>.

WANG, M. R.; CUI, Z.-H.; LI, J.-W.; HAO, X.-Y.; ZHAO, L.; WANG, Q.-C. In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. **Plant Methods**, v. 14, p. 87, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>.

WRIGHT, A. A.; CROSS, A. R.; HARPER, S. J. A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees. **PLOS One**, v. 15, n. 1, e0227669, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227669>.

WRIGHT, A. A.; SZOSTEK, S. A.; BEAVER-KANUYA, E.; HARPER, S. J. Diversity of three bunya-like viruses infecting apple. **Archives of Virology**, v. 163, p. 3339-3343, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3999-z>.

WUNSCH, A. O.; MIRANDA SAZO, M.; VAN ZOEREN, J.; LAMOUR, K. H.; HURTADO-GONZALES, O. P.; KHAN, A.; FUCHS, M. Investigating the role of viruses in the rapid decline of young apple trees in high-density orchards in

New York. **Plants**, v. 13, n. 20, article 2866, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13202866>.

XIAO, H.; HAO, W.; STOROSCHUK, G.; MACDONALD, J. L.; SANFAÇON, H. Characterizing the virome of apple orchards affected by rapid decline in the Okanagan and Similkameen Valleys of British Columbia (Canada). **Pathogens**, v. 11, n. 11, article 1231, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11111231>.

