

Deteção e caracterização molecular do *Apple Stem Grooving Virus* em pereiras no Sul do Brasil

Molecular detection and characterization of Apple Stem Grooving Virus in pear trees from Southern Brazil

Vanucci Marcos Santi^{1*}, Pedro Anibal Dambroz de Oliveira¹, Samara Nascimento¹, Priscila Stocoo Theodoro¹, João Frederico Mangrich dos Passos², Fabio Nascimento da Silva¹.

¹Laboratório de Virologia Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil.

²Estação Experimental de Lages, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil.

*Autor para correspondência: vanucci.ms@gmail.com

RESUMO

A cultura da pereira (*Pyrus communis* L.) apresenta elevado potencial produtivo na região Sul do Brasil, mas é vulnerável a diversas viroses que afetam sua qualidade e rendimento. Este estudo teve como objetivo detectar e caracterizar molecularmente o *Apple Stem Grooving Virus* (ASGV) em amostras de pereira coletadas no município de São Joaquim, Santa Catarina. Três amostras de cultivares copa foram submetidas ao sequenciamento de alto rendimento (HTS), resultando em aproximadamente 41 milhões de leituras, posteriormente filtradas, montadas e analisadas com ferramentas bioinformáticas. Para validação dos dados obtidos por HTS, foi realizada a amplificação por PCR com primers específicos para ASGV, confirmando a presença do vírus em uma das amostras, com visualização dos produtos por eletroforese em gel de agarose. O genoma completo do isolado viral identificado apresentou 6.476 nucleotídeos e revelou duas ORFs características: a primeira codificando uma poliproteína relacionada à replicação viral, e a segunda, a proteína de movimento. As análises de similaridade com sequências depositadas no GenBank indicaram elevados níveis de identidade nucleotídica, sendo 87,94% para a poliproteína e 95,62% para a proteína de movimento. Os resultados demonstram a eficácia da integração entre métodos moleculares convencionais e tecnologias de nova geração na identificação e caracterização de vírus vegetais, além de contribuírem para

o conhecimento da diversidade viral em pomares de pereira e para o aprimoramento das estratégias de monitoramento fitossanitário na região.

Palavras-chave: fitossanitário; sequenciamento de alto rendimento; *Capillovirus mali*.

ABSTRACT

The pear crop (*Pyrus communis* L.) has high productive potential in the southern region of Brazil but is vulnerable to several viral diseases that can affect its quality and yield. This study aimed to detect and molecularly characterize *Apple Stem Grooving Virus* (ASGV) in pear samples collected in the municipality of São Joaquim, Santa Catarina. Three scion cultivar samples were subjected to high-throughput sequencing (HTS), resulting in approximately 41 million reads, which were subsequently filtered, assembled, and analyzed using bioinformatics tools. To validate the HTS results, PCR amplification was performed using ASGV-specific primers, confirming the presence of the virus in one of the samples, with visualization of the products by agarose gel electrophoresis. The complete genome of the identified viral isolate comprised 6,476 nucleotides and revealed two characteristic ORFs: the first encoding a polyprotein associated with viral replication, and the second encoding a movement protein. Similarity analyses with sequences deposited in GenBank indicated high levels of nucleotide identity, with 87.94% for the polyprotein and 95.62% for the movement protein. The results demonstrate the effectiveness of integrating conventional molecular methods with next-generation technologies for the identification and characterization of plant viruses, in addition to contributing to the understanding of viral diversity in pear orchards and enhancing phytosanitary monitoring strategies in the region.

Keywords: phytosanitary; high-throughput sequencing; *Capillovirus mali*.

1 INTRODUÇÃO

A pereira (*Pyrus communis* L.) é uma das frutíferas mais antigas cultivadas, com registros históricos na Ásia e Europa (Wu *et al.*, 2014). Atualmente, destaca-se no cenário agrícola mundial, sendo principalmente cultivada em países como China, Estados Unidos, Itália, Argentina e Espanha (Ferradini *et al.*, 2017). No Brasil, a produção é de aproximadamente 15.681 toneladas, o que representa menos de 10% da demanda anual de cerca

de 200.000 toneladas, sendo o restante suprido por importações (IBGE, 2023). Esse cenário revela um potencial de crescimento para a cultura no país (Carra *et al.*, 2021).

A fruticultura está exposta a altos níveis de incerteza, especialmente em razão de riscos fitossanitários que afetam a produção (Gerum *et al.*, 2019). Dentre os patógenos associados às doenças das plantas, os vírus se destacam por seu impacto nas culturas frutíferas (Lopes; Ávila, 2005). Esses fitopatógenos são nucleoproteínas formadas por RNA ou DNA envolto por cápsula proteica, e dependem de células vivas da planta hospedeira para se replicarem (Agrios, 2024).

Alguns desses vírus têm comportamento latente, ou seja, não induzem sintomas perceptíveis na maioria das cultivares comerciais de pomáceas, o que pode levar à implantação e/ou manutenção de pomares infectados (Araújo *et al.*, 2016). Embora não apresentem sintomas visíveis, esses vírus estão associados ao declínio dos pomares de macieira e pereira, resultando na redução do vigor das plantas, na diminuição da qualidade dos frutos e da vida útil do pomar, além de tornar as plantas mais suscetíveis a outros patógenos (Nickel; Fajardo, 2016; Araújo *et al.*, 2016).

O *Apple Stem Grooving Virus* (ASGV, espécie *Capillovirus mali*, família *Betaflexiviridae* e gênero *Capillovirus*) é um dos mais importantes vírus latentes, afetando diversas culturas frutíferas, especialmente espécies e cultivares dos gêneros *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Citrus* e *Actinidia* (Araújo *et al.*, 2016; ICTV, 2025).

A caracterização molecular de vírus em plantas infectadas é fundamental para estratégias de manejo preventivo e controle eficaz das viroses (Agrios, 2024). No Brasil, a identificação e estudo do *Apple Stem Grooving Virus* (ASGV) em pereiras são especialmente relevantes, considerando o potencial produtivo da cultura e os impactos negativos causados por vírus latentes (Araújo *et al.*, 2016). A detecção precoce desse patógeno em viveiros e pomares possibilita intervenções mais eficientes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar molecularmente o ASGV em amostras de pereira (*Pyrus communis* L.) coletadas em Santa Catarina, utilizando técnicas de sequenciamento de alto rendimento (HTS) e validação por PCR, contribuindo para o conhecimento da ocorrência e da biologia do vírus em uma cultura de importância econômica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas três amostras de pereira das cultivares copa, aqui nomeadas PC1, PC2 e PC3, no município de São Joaquim (SC). Essas amostras vegetais consistiram em ramos das cultivares citadas. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC (CAV-UDESC), onde foram armazenadas em geladeira a 4°C.

A extração de RNA total foi realizada utilizando amostras de ramos (100 mg). O material foi macerado em nitrogênio líquido, sendo a extração realizada com kit de extração RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e concentração do RNA foi verificada por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

O material genético extraído das três amostras compôs um *pool*. Essas amostras de RNA foram colocadas em tubos do kit RNA stable (Biomatrica) e secas em Speed Vac (modo V-AQ) por 1 hora e 30 minutos. Na sequência os RNAs foram enviados para realizar o sequenciamento (Proteimax, São Paulo).

As leituras (*reads*) do HTS foram inicialmente processados com a ferramenta BBduk e montadas utilizando a ferramenta Tadpole assembler (Geneious Software versão 2022). A sequência resultante foi subsequentemente selecionada contra os bancos de dados NCBI usando as ferramentas de pesquisa BLASTn e BLASTx com parâmetros padrão e alinhados com sequências virais.

Para a validação dos resultados obtidos por HTS, foram realizadas a síntese de cDNA e a reação de PCR. A síntese de cDNA foi conduzida utilizando a transcriptase reversa M-MLV e o primer oligo dT (Promega, EUA), conforme as instruções do fabricante, a partir de 1 µg de RNA total extraído. A PCR foi realizada com a enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, utilizando primers específicos SG5641F (5'ATGAGTTTGGGAAGACGTGCTTC3') e SG6396R (5'CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT3') para amplificar uma região genômica de 755 pb, correspondente a parte do gene da proteína de capsídeo (CP) do ASGV. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,0 %), visualizados sobre luz UV e fotografados.

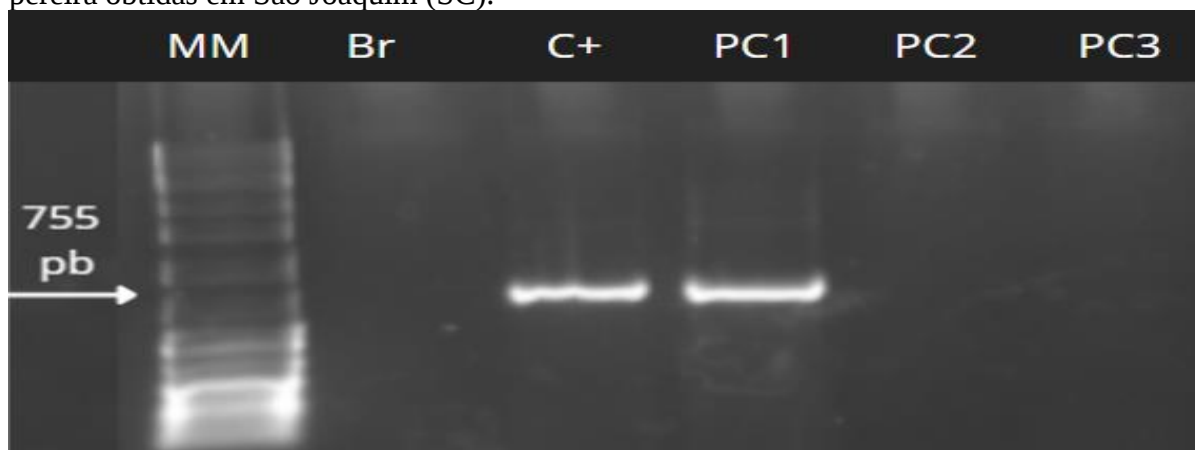
As leituras foram submetidas a predição de ORFs usando o programa ORF Finder em

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), permitindo a identificação de domínios conservados e funcionais das proteínas.

3 RESULTADOS

A amplificação por PCR com os pares de primers específicos, indicaram a presença de ASGV em uma amostra do total de três sequenciadas (Figura 1).

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de Apple Stem Grooving Virus (ASGV), utilizando os primers SG5641F e SG6396R. MM: marcador molecular 1kb (Promega); Br: branco; PC1, PC2 e PC3: amostras das plantas de pereira obtidas em São Joaquim (SC).



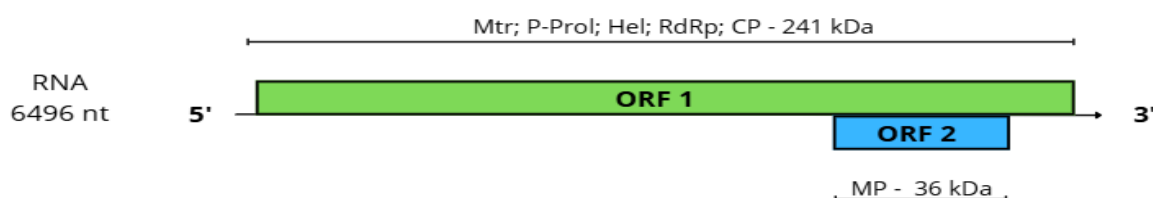
Fonte: Elaborada pelos autores (2025).

O sequenciamento de alto rendimento (HTS) resultou em 41 milhões de leituras brutas (cada uma com aproximadamente 151 nt) geradas para a amostra. As sequências foram analisadas e processadas inicialmente com a ferramenta BBduk e montadas utilizando a ferramenta Tadpole assembler (Geneious Software versão 2022). Uma sequência foi gerada e pesquisados no banco de dados do genoma do vírus NCBI usando BLASTn e BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), com resultados positivos para ASGV.

O genoma completo do isolado apresentou fita simples de RNA de sentido positivo, com 6.476 nucleotídeos (nt), desconsiderando a cauda poli(A) na extremidade 3' (Figura 2). O genoma do ASGV revelou duas ORFs: a ORF1 estende-se da posição 6.455 nt até 1.138 nt, codificando uma poliproteína de 2.105 aminoácidos (aa) e aproximadamente 241 kDa, que apresentou 87,94% de identidade nucleotídica em comparação com um isolado previamente

depositado no GenBank (Acesso N° P36309). Esta poliproteína apresenta domínios típicos de metiltransferase, protease semelhante à papaína, helicase de ligação a trifosfato de nucleotídeo, RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e proteína de cápside (CP). A ORF2, por sua vez, localiza-se entre as posições 1.704 nt e 742 nt, codificando a proteína de movimento (MP), com 320 aminoácidos e cerca de 36 kDa, apresentando 95,62% de identidade nucleotídica com outro isolado depositado no GenBank (Acesso N° P36698).

Figura 2 - Organização do genoma de um isolado de apple stem grooving virus (ASGV). Mtr, metiltransferase; P-Prol, “papain-like protease”; Hel, “NTP-binding helicase”; RdRp, RNA polimerase dependente de RNA; CP, proteína da capa proteica; MP, proteína de movimento.



Fonte: Elaborada pelos autores (2025).

4 DISCUSSÃO

A análise inicial por sequenciamento de alto rendimento (HTS) permitiu a detecção de sequências associadas ao ASGV nas amostras analisadas. A utilização de ferramentas de bioinformáticas (BBduk e Tadpole) possibilitam o tratamento e montagem eficiente das sequências, e os alinhamentos com BLASTn e BLASTx confirmaram a identidade com isolados previamente descritos de ASGV (Villamor *et al.*, 2019). Para validação dos achados do HTS, foi realizada amplificação por PCR com os primers específicos SG5641F e SG6396R, confirmando a presença do vírus em uma das três amostras e evidenciando a eficácia do método como ferramenta de confirmação rápida e específica. O presente estudo reforça os achados de pesquisas anteriores que enfatizam a relevância do HTS e da PCR na detecção de fitopatógenos em frutíferas (Nickel *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2022).

As altas identidades nucleotídicas observadas (87,94% para ORF1 e 95,62% para ORF2) em relação aos isolados depositados no GenBank indicam que o isolado detectado é altamente conservado, sugerindo uma estabilidade evolutiva do vírus em hospedeiros da região Sul do Brasil, o que corrobora com os resultados apresentados por Nickel (2001).

Esses resultados reforçam a importância da combinação entre abordagens de nova geração (HTS) e métodos moleculares clássicos, como a PCR, para a detecção precisa e caracterização genômica de vírus, especialmente em contextos onde a sintomatologia pode ser ausente, inespecífica ou mascarada por infecções mistas (Costa *et al.*, 2022). A identificação do ASGV contribui para o entendimento epidemiológico da virose em pomares de pereira e pode subsidiar estratégias de controle e manejo fitossanitário mais eficazes.

5 CONCLUSÃO

Os resultados confirmam a presença do *Apple Stem Grooving Virus* (ASGV) em uma amostra de pereira da região de São Joaquim (SC), caracterizada por sequenciamento de alto rendimento e validada por PCR. A análise genômica revela alta identidade nucleotídica com isolados previamente descritos, indicando um isolado conservado do vírus. A combinação das abordagens moleculares mostra-se eficaz para a detecção e caracterização de vírus vegetais, contribuindo para o monitoramento fitossanitário e ampliando o conhecimento sobre a diversidade viral em pomares de pereira no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2024.
- ARAÚJO, L. *et al.* Doenças da macieira e da pereira. **Informe Agropecuário**, v. 37, p. 61-74, 2016.
- CARRA, B. *et al.* Plant growth regulators to increase fruit set and yield of ‘Rocha’ pear trees in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 3, p. 1-16, 2021.
- COSTA, L. C. *et al.* 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, 12 dez. 2022.
- FERRADINI, N. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of ancient Italian landraces of pear. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 751, 9 maio 2017.
- GERUM, A. F. A. A. *et al.* **Fruticultura tropical**: potenciais riscos e seus impactos. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 232).

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Maçã**. 2023.

Realização

**SIMPÓSIO
INTER
NACIONAL**



Financiamento



fapesp
Fundação de Amparo à
Pesquisa e Inovação do
Estado de Santa Catarina

Apoio



Ciência, Saúde e Território

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. 2025. Disponível em:
<https://ictv.global/taxonomy>

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. 2. ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 151, 2005.

NICKEL, O. *et al.* Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *apple stem grooving virus*, and its survey in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 655–659, 2001.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Eliminação de vírus latentes de macieiras por quimioterapia e cultivo de meristemas *in vitro***. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016. 36 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 193).

VILLAMOR, D. E. V. *et al.* High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. **Phytopathology**, v. 109, n. 5, p. 716–725, maio 2019.

WU, J. *et al.* High-density genetic linkage map construction and identification of fruit-related QTLs in pear using SNP and SSR markers. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 20, p. 5771–5781, nov. 2014.