

**AMANDA SAVI**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADO DE  
Physalis rugose mosaic virus E ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO  
MISTA COM *Tobacco mosaic virus* EM FISÁLIS NO PLANALTO  
CATARINENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Nascimento da Silva

**LAGES**

**2020**

**AMANDA SAVI**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADO DE  
Physalis rugose mosaic virus E ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO  
MISTA COM *Tobacco mosaic virus* EM FISÁLIS NO PLANALTO  
CATARINENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

**Banca Examinadora**

Orientador: Fábio Nascimento da Silva  
Professor Dr. Fábio Nascimento da Silva)  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias (CAV-UDESC)



Membro: \_\_\_\_\_  
Professor Ph.D. Amauri Bogo  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias (CAV-UDESC)

Membro: Danielle Ribeiro de Barros  
Professora Dr<sup>a</sup> Danielle Ribeiro de Barros  
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

**Lages, 17 de fevereiro de 2020.**

## RESUMO

A produção de pequenas frutas no Brasil apresenta crescente demanda pelo mercado consumidor nos últimos anos. Dentre o grupo de pequenas frutas, a espécie *Physalis peruviana* L. demonstra grandes potencialidades, devido ao seu elevado valor nutricional, ciclo vegetativo curto e valor econômico agregado. Mesmo com tantas características positivas, a cultura é suscetível a uma gama de patógenos e estudos relacionados a sanidade são escassos, especialmente se tratando de infecções causadas por vírus. A identificação de vírus em *P. peruviana* no planalto catarinense, realizada em trabalhos anteriores, fomenta o desenvolvimento de estudos para a obtenção de dados que possam estabelecer medidas preventivas no controle e na disseminação das viroses, bem como a caracterização de interações sinérgicas entre espécies virais. Portanto, os objetivos desse trabalho consistiram na caracterização biológica e molecular de isolado de *physalis rugose mosaic virus* (PhyRMV), detectado em Lages/SC, e análises comparativas de aspectos qualitativos e quantitativos entre plantas saudáveis e plantas com infecção simples e mista com o *tobacco mosaic virus* (TMV). O TMV, diferente do PhyRMV, não foi encontrado em campo comercial de fisális, a estirpe utilizada é mantida em plantas no laboratório para fins de experimentos. No capítulo I, a caracterização molecular de PhyRMV foi realizada pela extração de RNA de fita dupla (dsRNA), síntese da biblioteca de DNA complementar (cDNA) e sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing* – NGS). No ensaio de transmissão foram utilizadas sementes obtidas de plantas infectadas com PhyRMV, as quais foram semeadas e as plântulas avaliadas com base na expressão de sintomas e diagnóstico molecular (RT-PCR). Aspectos fisiológicos de sementes obtidas de plantas infectadas foram avaliados com base nos parâmetros de germinação e vigor. No capítulo II, o isolado de TMV infectando fisális (inóculo obtido a partir de plantas de fumo cultivadas em laboratório), foi caracterizado utilizando microscopia eletrônica e NGS. Adicionalmente, a confirmação da presença dos vírus PhyRMV e TMV nas plantas utilizadas no ensaio de infecção mista foi realizada a partir de extrações de RNA, síntese de cDNA e análise de eletroforese. Plantas de fisális infectadas com TMV e PhyRMV e mantidas em casa de vegetação

foram utilizadas como inóculo para o experimento de infecção mista, o qual, abrangeu 4 tratamentos (plantas saudas, infectadas com TMV, infectadas com PhyRMV e infectadas com ambos os vírus). Neste experimento, as variáveis morfológicas e fisiológicas utilizadas para quantificar o efeito da infecção foram área foliar, altura de plantas, clorofila e parâmetros relacionados a fotossíntese, além de análises relacionadas a qualidade de frutos como o tamanho e diâmetro de baga, pH, °Brix e acidez titulável. As análises obtidas a partir do NGS confirmaram que o sobemovirus estudado é pertencente a espécie tentativa *Physalis rugose mosaic virus*. Embora tenha sido detectada a presença de PhyRMV em sementes, ensaios biológicos demonstraram que PhyRMV não é transmitido para plântulas de *P. peruviana*. Porém, vale destacar que sementes obtidas de plantas infectadas apresentaram menor qualidade fisiológica. As infecções virais simples e mista causaram redução significativa na área foliar, menor quantidade de clorofila, redução na produção de frutos, bem como efeito negativo sobre parâmetros relacionados a qualidade de frutos. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre PhyRMV associado a fisális e sua interação com TMV.

**Palavras-chave:** Fisális, *Sobemovirus*, PhyRMV, Caracterização, Transmissão, Sinergismo, TMV.

## ABSTRACT

Small fruits in Brazil presents increasing demand in recent years. *Physalis peruviana* L. shows great potential due to its high nutritional value, short vegetative cycle and fast economic return. Despite of good features, the crop is susceptible to a range of culture-related pathogens and studies are scarce, especially for virus infections. The identification of viruses in *P. peruviana* in previous reports from Santa Catarina state, Brazil, promotes the development of studies to establish preventive measures for virus control and dissemination, as well as the characterization of synergistic interactions between viral species. Therefore, the objectives of this study were the biological and molecular characterization of physalis rugose mosaic virus (PhyRMV, isolated from Lages/SC) and comparative analysis of qualitative and quantitative aspects among healthy plants, plants with simple and mixed infection with tobacco mosaic virus (TMV). The TMV was not found in the comercial field of physalis, the TMV isolate used is kept in the laboratory for the purposes of experiment. In chapter 1, double-stranded RNA extraction (dsRNA), complementary DNA (cDNA) library synthesis and next generation sequencing (NGS) were performed for PhyRMV molecular characterization. In the transmission assay, seeds from PhyRMV-infected plants were used, sown and seedlings evaluated based on symptoms expression and molecular diagnosis (RT-PCR). Physiological aspects of seeds from infected plants were evaluated based on germination and vigor parameters. In chapter II, the TMV isolate infecting physalis (inoculum obtained from tobacco plants grown in the laboratory) was characterized using electron microscopy and NGS. Additionally, confirmation of the PhyRMV and TMV presence in plants used in the mixed infection assay was performed using RNA extractions, cDNA synthesis and electrophoresis analysis. Plants of *P. peruviana* infected with TMV and PhyRMV and kept in a greenhouse were used as inoculum for the mixed infection assay, which comprises 4 treatments (healthy plants, infected with TMV, infected with PhyRMV and infected with both viruses). In this assay we analyzed leaf area, plant height, chlorophyll and photosynthesis related parameters, as well as fruits quality such as berry size and diameter, pH, °Brix and titratable acidity. Analyzes from the NGS confirmed that the studied sobemovirus belongs

to the tentative species *Physalis rugose mosaic virus*. Although the presence of PhyRMV was detected in seeds, biological assays showed that PhyRMV is not transmitted to *P. peruviana* seedlings. However, it is noteworthy that seeds obtained from infected plants presented lower physiological quality. Single and mixed viral infections caused reduction in leaf area, specific leaf area, lower amount of chlorophyll, reduction in fruit yield, as well as negative effect on parameters related to fruit quality. These results broaden the knowledge about PhyRMV associated with physalis and its interaction with TMV.

**Keywords:** Cape gooseberry, *Sobemovirus*, PhyRMV, Characterization, Transmission, synergism, TMV.