

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Physalis rugose mosaic virus* ISOLADO A PARTIR DE *Physalis peruviana* em LAGES/SC¹

Caroline Bolson de Faria², Fabio Nascimento da Silva³, Amanda Savi⁴, Eduardo Silva Gorayeb⁵

¹ Vinculado ao projeto “Caracterização biológica e molecular de duas espécies virais associadas a *Physalis peruviana* em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul”

² Acadêmica do Curso de Agronomia - CAV/UDESC bolsista PROBIC/UDESC

³ Orientador, Departamento Agronomia - CAV/UDESC - fabio.silva@udesc

⁴ Acadêmico do Programa Pós Graduação em Produção Vegetal - CAV/UDESC

⁵ Acadêmico do Programa Pós Graduação em Produção Vegetal - CAV/UDESC

A fisália [*Physalis peruviana* (L.)] é uma excelente opção de cultivo para pequenos produtores, pois demonstra potencialidade devido ao seu valor nutricional, retorno econômico e ciclo curto. *Physalis rugose mosaic virus* (PhyRMV) é uma espécie viral emergente, causa sérios danos em fisális e pode infectar outras espécies de solanáceas importantes como o tomate e o fumo. Em fisális, o vírus afeta o desenvolvimento da planta e a qualidade dos frutos. Os objetivos deste estudo foram caracterizar molecularmente um isolado de PhyRMV associado a *P. peruviana*, coletada em área de produção em Lages/SC; avaliar o efeito da infecção viral sobre a qualidade fisiológica das sementes; e avaliar a transmissão do PhyRMV por sementes de fisális.

Para caracterização molecular foi extraído RNA de fita dupla (dsRNA) de um conjunto de seis plantas (previamente inoculadas com o extrato da planta coletada no campo), totalizando 15 g de tecido foliar sintomático. A qualidade e a concentração do dsRNA foram estimadas por espectrofotometria. As leituras de sequências de nucleotídeos foram geradas a partir de biblioteca de cDNA (DNA complementar) e sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing* – NGS), utilizando a plataforma Illumina HiSeq 4000/NovaSeq. Os adaptadores e leituras de baixa qualidade foram removidos por Trimmomatic. Os dados obtidos pelo NGS foram analisados usando o software SPAdes v.3.11.1 para a montagem dos *contigs*. Os *contigs* resultantes foram analisados quanto à identidade de nucleotídeos contra banco de dados (*GenBank*); e o genoma resultante foi analisado quanto a presença de regiões codificadoras e relacionamento filogenético.

O efeito da infecção de PhyRMV sobre a germinação, índice de velocidade de emergência (IVE) e vigor foi avaliado utilizando protocolos padrões de acordo com as regras de análise de sementes determinadas pelo MAPA. Para o ensaio de transmissão do vírus, foram utilizadas 900 sementes de plantas infectadas com PhyRMV, e a infecção viral foi verificada em 600 plântulas utilizando o diagnóstico baseado em sintomas e molecular.

Utilizando o NGS, foram obtidas 82.710.494 leituras a partir da amostra analisada. A amostra apresentou um bom rendimento, considerando o número total de bases sequenciadas e número total de leituras e apresentou conteúdo de CG/AT dentro da faixa esperada (49,23%). Além disso, os parâmetros relacionados à qualidade (Q20) foram superiores a 97,9%, indicando excelente qualidade do NGS. Após a montagem, foram gerados 29.364 *contigs*, sendo 73 *contigs* homólogos às sequências virais. A análise desses *contigs* resultou na sequência completa do genoma de PhyRMV, isolado do município de Lages/SC (número de acesso no *GenBank* MN782300). Para confirmar a presença do PhyRMV no dsRNA usado para o NGS, foram usados os primers específicos Sobemo 1F e Sobemo 1R, que têm como alvo um fragmento de 528 pb do

gene da replicase viral. O sequenciamento desse fragmento, indicou identidade de nucleotídeos (nts) de 100% com PhyRMV caracterizado por NGS neste estudo. A sequência genômica do isolado de Lages de PhyRMV consiste em 4.162 nts, com organização genômica idêntica à descrita para o isolado de Piracicaba de PhRMV, compartilhando 97% de identidade de nts.

A infecção por PhyRMV reduziu a taxa de germinação de sementes de fisálias de 90% (em sementes obtidas de plantas sadias) para 68% (em sementes obtidas de plantas infectadas pelo vírus). Porém, não foram observadas diferenças significativas no comprimento da parte aérea e da raiz primária das plântulas, indicando que PhyRMV não reduz o potencial fisiológico das sementes (Tabela 1). Corroborando com esses dados, também não foi observada diferença significativa no IVE. Adicionalmente, o vigor não foi afetado pelos tempos de exposição de 48 h e 72 h em solução saturada de NaCl. No entanto, diferenças significativas foram detectadas nas sementes submetidas a 72 h de incubação em água, sendo que as sementes obtidas de plantas infectadas por PhRMV apresentaram menor vigor (76%, comparado a 97% em sementes obtidas de plantas sadias, $P = 0,013$).

Cerca de 23% dos sobemovírus (grupo de vírus ao qual o PhyRMV pertence) podem ser transmitidos por sementes. Para verificar a transmissão do PhyRMV por sementes, plantas infectadas com PhyRMV foram utilizadas para coletar sementes e avaliar a capacidade de transmissão de PhyRMV para as plântulas, uma vez que não existe informação nesse sentido para essa espécie viral. Não foram observados sintomas em nenhuma das plantas analisadas (600), e as análises moleculares confirmaram a ausência de PhyRMV, indicando que o isolado caracterizado neste estudo não é transmitido por sementes. A presença do vírus na semente não é garantia de transmissão para a plântula e, embora análises moleculares indiquem a presença do vírus nas sementes, o PhyRMV não conseguiu atingir as plântulas. Vale ressaltar que o ensaio de transmissão foi realizado em triplicata (200 x 3) e os resultados foram congruentes.

Os resultados apresentados nessa pesquisa indicam que o isolado viral caracterizado nesse estudo tem alta identidade de sequência com o isolado de Piracicaba de PhyRMV previamente caracterizado; que o isolado de Lages de PhyRMV afeta a germinação e o vigor das sementes; e que este mesmo isolado não é transmitido por sementes.

Tabela 1. Médias de germinação de plântulas normais, comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz primária (CRP) de plântulas de fisálias oriundas de sementes obtidas de plantas sadias e infectadas com physalis rugose mosaic virus (PhyRMV).

Tratamento	Germinação	CPA	CRP
Com vírus	67,75 a	20,2 a	44,6 a
Sem vírus	90,25 b	21,85 a	46,6 a
CV (%)	13.8	30.1	48.6

CV, Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Palavras-chave: Sobemovirus. Sequenciamento. Sementes.