QUANTIFICAÇÃO DE DANO EM *Physalis peruviana* PROVENIENTE DE INFECÇÕES SIMPLES E MISTA COM physalis rugose mosaic virus (PhyRMV) E tobacco mosaic virus (TMV)[1]

Julia Emanueli Rau[2], Francisco Antônio Carra Nardello[3], Amanda Savi[4], Fábio Nascimento da Silva[5]

[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 - bolsista PIBIC/CNPq
[3] Acadêmico do Curso de Agronomia - CAV
[4] Acadêmica do Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal - CAV
[5] Orientador Departamento de Agronomia - CAV – fabio.silva@udesc.br

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios com o potencial de causar infecções simples ou múltiplas. Quando infectada por um vírus, a planta sofre alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas que resultam em danos a produção, podendo esses danos serem potencializadas nos casos de infecções virais mistas. A cultura do fisális é hospedeira de diversos patógenos, dentre eles os vírus physalis rugose mosaic virus (PhyRMV) e tobacco mosaic virus (TMV). Este trabalho teve como objetivos a caracterização do isolado de TMV utilizado e realizar análises comparativas de aspectos quantitativos e qualitativos entre plantas de fisális sadias, plantas com infecção simples e infecção mista entre PhyRMV e TMV.

A caracterização do isolado de TMV foi realizada pela extração de RNA de fita dupla (dsRNA). O dsRNA foi utilizado para síntese de biblioteca de DNA complementar (cDNA) e sequenciamento de nova geração (NGS). Para a validação do NGS foram desenhados e utilizados iniciadores específicos. A detecção do TMV nas plantas utilizadas no ensaio por infecção mista foi realizada através da homogeneização em nitrogênio líquido de 100mg de folhas de fisális sintomáticas, sendo submetidas à extração de RNA total utilizando o reagente TRi (Sigma Aldrich) de acordo com as especificações do fabricante. Para a verificação da integridade e quantidade dos ácidos nucleicos extraídos foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% e quantificação de ácidos nucleicos em espectrofotômetro. Na síntese de DNA complementar (cDNA) foi utilizado o iniciador reverso Tob-Uni2 e a PCR foi realizada utilizando a enzima goTaq Flexi DNA polymerase (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante e utilizando os iniciadores universais para o gênero *Tobamovirus* (Tob-Uni1 e Tob-Uni2). Para a detecção de PhyRMV, a síntese do DNA complementar foi a mesma feita para o TMV, exceto pela utilização do iniciador reverso Sobemo 1R. Na PCR foram utilizados os iniciadores Sobemo1F e Sobemo1R, específicos para PhyRMV. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel agarose 1%, corados com GelRed (Biotium), visualizados sobre luz UV e fotografados.

Para a avaliação dos efeitos quali e quantitativos em infecção simples e mista foi realizado o transplante de mudas sadias para vasos contendo solo e substrato (3:1), sendo inoculadas 20 dias após o transplante e mantidas em casa de vegetação em temperaturas de 24°C (± 2°C). Foram utilizados 4 tratamentos, sendo eles: plantas inoculadas apenas com PhyRMV; plantas inoculadas apenas com TMV; plantas inoculadas com as duas espécies virais e plantas controle, inoculadas apenas com tampão. A ausência ou presença dos vírus foi confirmada descrito anteriormente. Os parâmetros vegetativos avaliados foram: altura de plantas (cm), área foliar (cm), índice SPAD,

fotossíntese, condutância estomática e transpiração. A avaliação destes parâmetros foi realizada 24 dias após a inoculação (DAI), sendo repetidas a cada 14 dias, totalizando 9 avaliações (38DAI, 52DAI, 66 DAI, 80 DAI, 94 DAI, 108DAI, 122DAI, 136DAI E 152DAI). Os frutos foram colhidos manualmente no estádio 4 de maturação e as variáveis analisadas foram: número médio de frutos produzidos por planta, massa média da baga (g), diâmetro médio da baga (mm), potencial Hidrogeniônico (pH), teor de sólidos solúveis (°Brix) e acidez titulável (% de ácido cítrico).

As amostras de TMV apresentaram bom rendimento e conteúdo CG/AT dentro do esperado. A sequência genômica do TMV obtida apresenta 6391 nucleotídeos e quatro fases de leitura aberta. Adicionalmente, os testes realizados confirmaram a presença de PhyRMV e TMV nas plantas inoculadas com os vírus.

Para os parâmetros fisiológicos e morfológicos, observou-se uma redução significativa na área foliar de plantas infectadas em comparação a plantas sadias. As análises demonstraram uma redução nos índices de SPAD nas plantas com infecção viral simples, não sendo essa redução significativa em estágios mais avançados da infecção. Já as plantas com infecção mista apresentaram menor quantidade de clorofila. O tratamento com infecção mista apresentou também menor altura de plantas em comparação aos outros tratamentos, que não apresentaram diferença significativa. As médias de massa seca e massa fresca foram menores nas plantas com infecção simples e mista. As médias de fotossíntese, condutância estomática e transpiração foram menores no tratamento com plantas sadias.

Os tratamentos com infecções virais simples e mistas apresentaram deformação e menor quantidade de frutos do que o tratamento com plantas sadias, sendo os menores índices de produção obtido por semana no tratamento com plantas infectadas por ambos os vírus (Figura 1). Os frutos apresentaram menor diâmetro e massa de baga nos tratamentos tanto de infecção simples quanto mista. As plantas com infecções simples apresentaram menor teor de sólidos solúveis totais. Maiores valores de acidez titulável foram observados em plantas sadias. Os valores de pH apresentaram diferença significativa apenas no tratamento com infecção mista. Os resultados apresentados nessa pesquisa indicam sinergismo entre PhyRMV e TMV, considerando que os menores valores na maioria dos parâmetros avaliados foram obtidos no tratamento com plantas infectadas por ambos os vírus.

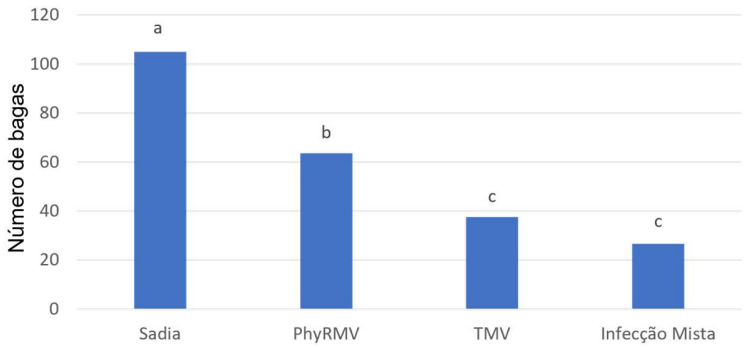

Figura 1. Número total da colheita de frutos de fisális oriundas de plantas sadias, plantas inoculadas com PhyRMV, com TMV e com PhyRMV + TMV (infecção mista). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Palavras-chave: *Physalis peruviana.* Infecção mista. Sinergismo.

Apoio: CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; fapesc Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina; GOVERNO DE SANTA CATARINA