



SÉRGIO BRUNO FERNANDES

**Estudo molecular e biológico de um isolado viral de *Physalis*
peruviana, proveniente do estado de Santa Catarina**

**Lavras – MG
2018**

SÉRGIO BRUNO FERNANDES

**Estudo molecular e biológico de um isolado viral de *Physalis peruviana*, proveniente do
Estado de Santa Catarina**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a). Antonia dos Reis Figueira
Orientador (a)
Dr(a). Priscilla de Sousa Geraldino Duarte
Coorientador (a)

**Lavras – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Fernandes, Sérgio Bruno.

Estudo molecular e biológico de um isolado viral de *Physalis peruviana* proveniente do Estado de Santa Catarina / Sérgio Bruno Fernandes. - 2018.

37 p.

Orientador(a): Antonia dos Reis Figueira.

Coorientador(a): Priscilla de Sousa Geraldino Duarte.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Virologia Molecular. 2. Sobemovirus. 3. *Physalis peruviana*.
I. Figueira, Antonia dos Reis. II. Duarte, Priscilla de Sousa Geraldino. III. Título.

SÉRGIO BRUNO FERNANDES

ESTUDO MOLECULAR E BIOLÓGICO DE UM ISOLADO VIRAL DE *Physalis peruviana*, PROVENIENTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
MOLECULAR AND BIOLOGICAL STUDIES OF A VIRUS ISOLATE DETECTED
IN *Physalis peruviana* FROM SANTA CATARINA STATE –BRAZIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 1 de março de 2018.

Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Dra. Suellen Bárbara Ferreira Galvino Costa

Prof(a). Dr(a). Antonia dos Reis Figueira
Orientador(a)

Dr(a). Priscilla de Sousa Geraldino Duarte
Coorientador(a)

Lavras – MG
2018

*A minha família que sempre esteve ao meu lado em todas as dificuldades. Aos meus amigos
que em tempos difíceis sempre me fizeram sorrir.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, o Departamento de Fitopatologia e todos os técnicos que diretamente e indiretamente me auxiliaram na jornada.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. A FAPEMIG e ao CNPq.

À Professora Dra Antonia, que me acolheu e me ensinou com competência e ética durante meu trajeto. Será para sempre meu espelho para minha vida profissional bem como para a pessoal. Sou eternamente grato!

À Dra Priscilla pela Coorientação, atenção e ajuda na realização de todo trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Molecular e do BIOTEC, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos e ao Guilherme Penido que foram importantes para a conclusão deste trabalho e que sempre estavam me apoiando e me mantendo feliz.

Em especial, à minha família pelo apoio incondicional. Meus pais, Renata e Vanderlei, pelo sacrifício para a realização dos meus sonhos e meus irmãos, Guilherme, Nathália, Pollyana, Analine e Júnior que sempre estiveram ao meu lado nos momentos felizes bem como nos momentos difíceis. Agradeço também meus tios Claudete e Antônio, que foram também meus pais durante toda trajetória. A todos os outros integrantes da Grande Família (Fernandes e Garcia) que torceram e lutaram junto comigo nessa caminhada!

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A *Physalis peruviana* L.) têm se mostrado uma boa alternativa para os pequenos produtores da região sul brasileira, que apresenta condições climáticas favoráveis, por possuir um fruto com alto valor de mercado e baixo custo de produção. A fruta possui qualidades nutracêuticas, que torna a cultura promissora para alcançar diversos nichos de mercado. O grande desafio dessa cultura é que, devido à sua introdução recente no Brasil, existem poucas informações sobre o controle de fitopatógenos que podem afetá-la como, por exemplo, as doenças de etiologia viral. Recentemente um isolado viral denominado de BRSC2017 foi detectado em plantas de *Physalis peruviana* cultivadas na região sul do Brasil, apresentando sintomas de mosaico, deformação foliar e enfezamento, que sugeria a presença de *Potato virus Y* (PVY), vírus comum em solanáceas. Entretanto, amostras encaminhadas para o Laboratório de Virologia Molecular, com a finalidade de fazer a identificação do agente causal, reagiram negativamente quando testadas por DAS-ELISA e RT-PCR, empregando-se antissoros e primers específicos para o PVY. Inoculação em plantas hospedeiras também induziram sintomas diferentes daqueles observados para o PVY. Posterior observação ao microscópio eletrônico mostrou partículas isométricas com cerca de 30nm de diâmetro, confirmando esses resultados. Com o auxílio de *random* primers, um fragmento contendo 673pb foi amplificado por RT-PCR, sequenciado e analisado. Quando os nucleotídeos e os aminoácidos do BRSC2017 foram comparados com isolados virais disponíveis no GenBank, observou-se que a maior identidade ocorreu com a ORF 2B, que codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), do *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV), pertencente ao gênero *Sobemovirus*. Esse vírus, encontrado na Austrália, ainda não descrito no Brasil. No entanto, seguindo os critérios de taxonomia para o gênero, a maior identidade ficou abaixo dos 75% necessários para que sejam considerados da mesma espécie. O sequenciamento completo do genoma do BRSC2017 permitirá chegar a uma identificação definitiva desse isolado viral.

Palavras-chave: Detecção viral. VTMoV. *Velvet tobacco mottle virus*. *Sobemovirus*. *Physalis peruviana*.

ABSTRACT

Physalis (*Physalis peruviana* L.) has been considered a good alternative for small farmers in the Southern region of Brazil, which presents favorable climatic conditions. Besides that, this plant produces fruit with high market value, with nutraceutical qualities and low production cost, allowing growers to reach several market niches. However, the *physalis* faces great challenges due to its recent introduction in Brazil, since there is little information on the control of phytopathogens that could jeopardize the crop yield, such as viral diseases. Recently, a viral isolate called BRSC2017 was detected in *P. peruviana* plants, grown in the Santa Catarina State, Brazil, presenting mosaic, foliar deformation and stunting. These symptoms suggested the presence of *Potato virus Y* (PVY), which is common in solanaceous plants. However, samples sent to the Laboratory of Molecular Virology, for virus diagnosis, were DAS-ELISA and RT-PCR negative, when tested with antisera and primers specific for PVY. Inoculation in diagnostic species also induced symptoms different from those caused by PVY, and the virus was not transmitted by *Myzus persicae* Sulz. Later observation under the electron microscope showed isometric particles, with about 30nm in diameter, confirming these results. Using random primers, a fragment containing 673bp was amplified by RT-PCR, sequenced and analyzed. When the nucleotides of BRSC2017 were compared with genomes of the viral isolates available in GenBank, the greatest nucleotide identity (69%) occurred with ORF 2B, which encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV), a *Sobemovirus* species. The VTMoV is present in Australia but has not yet been described in Brazil. However, based on the taxonomic criteria for species demarcation in the genus *Sobemovirus*, the lower identity needed to be considered the same species must be 75%. The complete sequencing of the BRSC2017 genome will allow a definitive identification of this viral isolate.

Keywords: Viral detection. VTMoV. *Velvet tobacco mottle virus*. *Sobemovirus*. *Physalis peruviana*.

SUMÁRIO

1	Introdução	10
2.	Referencial Teórico	12
2.1	<i>Physalis peruviana</i> L.: histórico, cultivo e importância econômica.....	12
2.1.1	Principais pragas e doenças da <i>Physalis</i>	13
2.3	<i>Velvet tobacco mottle virus</i> (VTMoV).....	14
2.4	Principais técnicas utilizadas para diagnose de fitoviroses	16
3	Material e Métodos	18
3.1	Coleta e armazenamento das amostras e realização de ensaios	18
3.2	Teste Biológico em plantas hospedeiras.....	18
3.3	Estudo da transmissão via vetor <i>Myzus persicae</i> e via semente.....	18
3.4	Microscopia Eletrônica	19
3.5	Minipurificação e extração do RNA viral	19
3.6	Reação de RT-PCR com Random Primers e análise de Bioinformática..	20
4	Resultados e Discussão	22
5	Conclusão	30
6	Referências Bibliográficas	31

1 Introdução

A *Physalis peruviana* L., considerada uma hortaliça não convencional, é uma espécie originada na Colômbia, que foi recentemente introduzida no Brasil por possuir um bom potencial para o setor de fruticultura. Ela pertence a uma das famílias com maior número de espécies do reino vegetal, a *Solanacea*, incluindo algumas de grande importância econômica como o tomate e a batata, dentre as 2600 já descritas (THE PLANT LIST, 2013). Apenas no gênero *Physalis* mais de 130 espécies já foram catalogadas (THE PLANT LIST, 2013).

A planta é produzida em locais frios e a sua fruta tem atraído diversos nichos de mercado, por ser exótica, com sabor adocicado e nutrientes importantes como minerais e antioxidantes, superando outras frutas comumente consumidas como o mamão e a laranja (RODRIGUES et al., 2009; RUFATO et al., 2013). Os altos preços que alcança no mercado mostram o quão rentável é a cultura, mesmo exigindo mão de obra especializada.

Por ser uma cultura pouco estudada, as informações a respeito das doenças que podem ocorrer durante o cultivo são bastante escassas, prejudicando a adoção de métodos de controle necessários para evitar perdas indesejadas na produção. No caso específico de fitovirose, que devido ao tipo de interação patógeno-hospedeira não possuem controle curativo, a diagnose precoce é fundamental para embasar as medidas de controle que devem ser de caráter essencialmente preventivo. Para isso, o estudo de novas viroses se torna importante, pois essas, quando negligenciadas, podem causar perdas significativas na produção.

Em plantações comerciais, estabelecidas no Estado de Santa Catarina, foram encontradas plantas de *Physalis peruviana* com sintomas de mosaico, enrugamento e clorose, causando o subdesenvolvimento da planta com conseqüente depreciação dos frutos. Inicialmente suspeitou-se que esses sintomas poderiam ser devidos à infecção pelo *Potato virus Y* (PVY), mas isso não foi confirmado por diversos testes diagnósticos de rotina, empregados nos Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Houve então a necessidade de se fazer uma investigação mais ampla, visando identificar o agente causal dessa virose.

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a diagnose de vírus em plantas. Dentre elas, a mais simples é a inoculação em plantas indicadoras, porém nem sempre essa técnica permite a correta identificação do patógeno. Quando o vírus já é conhecido, o teste sorológico ELISA, que se baseia na reação antígeno-anticorpo, é um dos mais indicados, sendo considerado como uma das ferramentas mais importantes na diagnose de vírus em plantas (CLARK; ADAMS, 1977). No entanto, este teste demanda a disponibilidade de

anticorpos específicos, que nem sempre estão disponíveis, principalmente para vírus que não fazem parte da rotina de análises dos vírus de ocorrência mais comum. Uma das alternativas, na ausência de anticorpos específicos, seriam as técnicas PCR e/ou RT-PCR, que permitem detectar vírus desconhecidos com a utilização de primers degenerados, denominados de *random primers*.

Nesse trabalho, além da técnica de inoculação em plantas indicadoras, foram empregadas outras metodologias como Microscopia Eletrônica de Transmissão, RT-PCR e sequenciamento genômico, para fazer a identificação do agente causal do mosaico observado nas plantas de *Physalis* sp, coletadas em Santa Catarina. Os resultados obtidos permitiram inferir sobre a etiologia do vírus, oferecendo subsídios para a adoção de medidas de controle da virose, visando minimizar os seus efeitos no campo de cultivo.

2 Referencial Teórico

2.1 *Physalis peruviana* L.: histórico, cultivo e importância econômica

A *Physalis peruviana* L. é uma das 130 espécies do gênero *Physalis*, pertencente a uma família com espécies de grande importância agrícola como a batata (*Solanum tuberosum*), o tomate (*Solanum lycopersicum*) e o fumo (*Nicotiana tabacum*). A família *Solanaceae* possui 2.600 espécies, o que a configura como uma das que possui o maior número de espécies entre os vegetais. O gênero é caracterizado por conter flores pendentes, além de ser uma planta herbácea, encontrada nos subtropicais, podendo chegar, em alguns casos, a 1,8 metros de altura, comumente variando entre 0,6 – 0,9 m, com flores facilmente polinizáveis (PUENTE et al., 2011; SULLIVAN, 2014). Os frutos possuem uma coloração amarela, de formato ovoide, protegido pelo cálix, podendo se abrir durante o processo de amadurecimento (KLINAC, 1986; PUENTE et al., 2011; SULLIVAN, 2014).

A sua origem está ligada aos países Andinos: Colômbia, Peru e Equador (LEGGE, 1974). Segundo Puente et al. (2011), essa planta não possui modificações estruturais em relação ao seu germoplasma e em relação à sua origem, sendo que a sua estruturação fenotípica transcende os períodos pré-Inca e Inca. Ao se expandir para outros países sul-americanos, somente na década de 80 passou a ter uma grande importância comercial para a Colômbia, sendo atualmente o país com maior produção da fruta, conhecida popularmente de *uchuva*, seguido pela África do Sul, considerada o segundo país com maior produção mundial (MUNIZ et al., 2014; SALAZAR et al., 2008). No Brasil a cultura foi implementada no final da década de 90, em São Paulo, na Estação Experimental Santa Luiza. Após ser considerada uma cultura promissora, em 2008 passou a ser utilizada como uma nova opção de cultura para os produtores (MUNIZ et al., 2014)

Os frutos possuem altos teores de minerais e ácidos graxos que são importantes na alimentação de humanos. Estudos sobre a sua composição centesimal, mineral e sobre o perfil dos ácidos graxos do fruto mostraram: altas taxas de lipídios, variando entre 0,32 e 3,16 g.100g⁻¹ de peso seco, o que é superior ao encontrado em outras frutas como mamão, maçã, laranja, morango e acerola; presença de íons metálicos como ferro, magnésio, zinco, cálcio, potássio e sódio, dentre outros, que são essenciais para o metabolismo celular; altas taxas de ácido linoleico na fração lipídica, que possui grande importância no controle de doenças cardiovasculares (RODRIGUES et al., 2009).

Além do conteúdo mineral e lipídico, os frutos de *P. peruviana*, têm se mostrado uma fonte importante de antioxidantes. Segundo Wu et al. (2006), extratos do fruto obtidos pela

metodologia de Extração de Fluidos Supercrítica (SFE), que utiliza como solvente dióxido de carbono (CO₂), mostraram uma maior porcentagem de flavonoides e compostos fenólicos, quando comparado com outras metodologias. Ainda, os autores relatam que através dessa metodologia os compostos presentes nos extratos mostraram uma alta atividade anti-inflamatória, que confirmam as propriedades terapêuticas do fruto.

Normalmente, a fruta é consumida *in natura*, porém pode ser utilizada para a fabricação de geleias, bebidas lácteas, iogurtes e bebidas alcoólicas. Devido ao fato de ser bastante atraente quanto às propriedades nutracêuticas e o sabor adocicado, mais e mais consumidores são atraídos por essa fruta exótica. Os altos preços da fruta no mercado tornam o consumo restrito a um determinado grupo de consumidores, com maior poder aquisitivo, porém nos períodos de alta produção, os preços caem tornando a fruta mais acessível a outros consumidores (MUNIZ et al., 2008).

Sua produção está ligada a locais moderadamente frios e de altitudes mais elevadas (SALAZAR et al., 2008), e se mostra rentável para produtores de regiões frias como Santa Catarina (MUNIZ et al., 2008; RUFATO et al., 2013). Na região sul brasileira, a produção de *physalis* utiliza os mesmos manejos empregados na cultura do tomateiro e a época de semeadura é de extrema importância para cultura (BETEMPS et al., 2014). Seu melhor crescimento ocorre em regiões altas, 800 a 3500 metros de altitude, com temperaturas entre 8-20° C, sendo suscetível a temperaturas extremas (RUFATO et al., 2013).

Betemps et al. (2014) utilizaram três épocas de semeadura, entre agosto de 2007 e novembro de 2008, na região de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, para verificar os estádios fenológicos da planta e assim estabelecer informações sobre as diferentes fases fenotípicas, bem como condições edafoclimáticas para um manejo mais específico para cultura. Eles observaram que, quando a semeadura foi realizada no mês de setembro, as plantas apresentaram um alto crescimento vegetativo e aumento na produção. A colheita dos frutos se iniciou em fevereiro, porém o pico de produção ocorreu em junho.

Mesmo que a cultura tenha um bom potencial para a região sul brasileira, ela exige uma mão de obra especializada e uma demanda quanto a logística de mercado. Além disso, o seu plantio tem sido limitado pelo fator manejo cultural, que ainda não está bem estabelecido (MUNIZ et al., 2008).

2.1.1 Principais pragas e doenças da *Physalis*

Pouca informação é encontrada na literatura sobre a ocorrência de fitopatógenos nessa cultura no Brasil, de modo que, os dados disponíveis foram coletados apenas no seu local de

origem, a Colômbia. Rufato et al. (2013) relatam que até o ano de 2009, nenhuma doença foi encontrada em áreas experimentais de plantio.

A cultura é suscetível a fungos do gênero *Cercospora sp.*, sendo a espécie *Cercospora physalidis* Ellis causadora de manchas necróticas nas folhas e nos frutos, em qualquer um dos estágios de desenvolvimento (ZAPATA et al., 2002). Os sintomas se iniciam como pontos necróticos nas folhas, chegando a formar manchas irregulares que desenvolvem uma coloração acinzentada (RUFATO et al., 2013; ZAPATA et al., 2002).

A ocorrência de fungos do gênero *Phoma sp.*, causam requeima em folhas e frutos, onde os sintomas observados são manchas escuras que contém os esporos do patógeno (RUFATO et al., 2013; ZAPATA et al., 2002). Graças a alta umidade e baixas temperaturas, as lesões se unem, devido a condição climática ótima para fungo, tornando-se de pontos pequenos para manchas maiores que depreciam o fruto e diminuem a área fotossintética das folhas (ZAPATA et al., 2002). Para esses dois fungos, *Phoma sp.* e *Cercospora sp.*, Rufato et al. (2013) relatam que a medida mais eficiente é a poda, uma vez que, essa permite a aeração interferindo diretamente no microclima ideal para o fungo.

A *physalis* se mostra bastante suscetível a patógenos de etiologia viral, sendo utilizada como planta indicadora na identificação de vários vírus. Segundo o site Descriptions of Plant Viruses (2017), a *physalis* auxilia na identificação de 11 espécies de vírus, sendo muitas dessas, incluídas no gênero *Potyvirus*, que é importante para a família Solanaceae.

O único vírus considerado típico dessa planta é o *Physalis mottle virus* (PhMV), pertencente ao gênero *Tymovirus* (GOPINATH et al., 1998; KRISHNA et al., 1999; SASTRI et al., 1999). Possui partículas icosaédricas, contendo RNA de fita simples, senso positivo (KRISHNA et al., 1999, 2001), e causa enfezamento, amarelecimento e mal desenvolvimento das folhas. Inicialmente foi descrito como uma estirpe de *Belladonna mottle virus* (BDMV), (MOLINE; FRIES, 1973).

2.3 Velvet tobacco mottle virus (VTMoV)

O VTMoV pertence ao gênero *Sobemovirus*, que possui partículas isométricas com, aproximadamente, 30nm de diâmetro, contendo RNA de fita simples, senso positivo, com aproximadamente 4500pb (HULL, 1988). A criação do gênero foi proposta por Hull (1977), sendo que o membro tipo desse gênero é o *Southern bean mosaic virus* (SBMV). Atualmente esse gênero abriga 19 espécies de vírus (ICTV, 2017).

O VTMoV foi descrito, pela primeira vez, por Randles et al. (1981) em plantas de *Nicotiana velutina*, “tabaco veludo”, uma espécie selvagem da Austrália, tendo sido

classificado no gênero *Sobemovirus* por conter similaridades sorológicas com o vírus *Solanum nodiflorum mottle virus* (SNMoV) (ARTHUR et al., 2014; ARTHUR; DOGRA; RANGLES, 2010). Seu capsídeo é composto por 180 unidades, sendo cada subunidade proteica com 26 a 31 kDa (TRUVE; FARGETTE, 2012). Até o momento, esse vírus ainda não havia sido encontrado fora da Austrália.

O seu genoma é capaz de codificar 5 proteínas com diversas funções na infecção viral. A P1, uma proteína com 17,3kDa, possivelmente tem relação com o movimento sistêmico e supressão do silenciamento gênico (ARTHUR; DOGRA; RANGLES, 2010). A proteína P2a tem possível atividade de protease, a proteína da capa, CP, de aproximadamente 30,7 kDa é responsável pela encapsulação do RNA viral (ARTHUR; DOGRA; RANGLES, 2010). A proteína *Viral protein genome-linked* (VPg), é uma proteína que se liga covalentemente ao RNA viral na região 5', com possível envolvimento durante o processo de infecção viral (VAN DER WILK et al., 1998). Por fim, a proteína RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), com participação direta na replicação viral, realizando a síntese de RNA's a partir do RNA viral (ARTHUR et al., 2014; ARTHUR; DOGRA; RANGLES, 2010; TRUVE; FARGETTE, 2012).

Análises de microscopia eletrônica e por gel desnaturante detectaram a presença de um RNA circular e de fita simples em isolados de VTMoV, um *viroid-like* RNA (scRNA) (ARTHUR et al., 2014; FRANCKI, 1981). Gould; Francki e Randles (1981) afirmam que durante o processo evolutivo, o VTMoV e o scRNA perderam a capacidade de replicação, e por isso ambos eram dependentes um do outro para o processo de síntese de RNA. No entanto, Francki; Grivell e Gibb (1986), ao realizar a inoculação do viroide e do vírus, quando inoculados juntos causavam em *N. clevelandii* lesões necróticas, em contraste, quando era inoculado o scRNA as plantas não apresentavam sintomas, já quando inoculadas com o VTMoV apresentaram sintomas típicos, mosaico e clareamento de nervuras. Ainda assim, não se encontra na literatura indícios sobre a importância do scRNA com o VTMoV.

O VTMoV pode ser transmitido mecanicamente e pelo vetor *Cytorpeltis nicotianae*, de modo persistente circulativo, não havendo, até o momento, nenhum relato de transmissão pelas sementes (GIBB; RANGLES, 1991). Na Austrália, onde esse vírus tem sido encontrado, ele foi detectado na natureza apenas em plantas de *N. velutina* (ARTHUR et al., 2014). Ele possui uma gama de hospedeiras limitada, causando doença apenas em três espécies selvagens de tabaco: a *Nicotina velutina*, espécie na qual foi identificado e que deu origem ao seu nome, a *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana clevelandii* (ARTHUR et al., 2014). Até o momento, este vírus ainda não tinha sido encontrado em lavouras comerciais, o que

explica a falta de informações relacionadas ao seu controle. No entanto, assim como as demais viroses, o controle deve ser preventivo, no sentido de propagar material sadio, eliminar as fontes de inóculo e controlar o inseto vetor para impedir a disseminação do patógeno no campo.

2.4 Principais técnicas utilizadas para diagnose de fitoviroses

Dentre as diferentes formas de identificação de vírus em plantas, a utilização do método de inoculação em plantas indicadoras, ou seja, plantas que reagem com sintomas específicos e diferenciados à infecção por um determinado vírus, é o procedimento mais simples e amplamente utilizado até os dias atuais. Neste processo, é feita a inoculação mecânica do vírus em plantas específicas e, posteriormente, por meio da análise dos sintomas, é possível fazer a sua identificação com base nos sintomas descritos na literatura. Para a reprodutibilidade dos sintomas, a inoculação deve ser feita em plantas ainda jovens e em condições ambientais controladas (ASTIER et al., 2007). A técnica, apesar de fácil, demanda uma estrutura física com ambiente controlado e proteção contra vetores para o crescimento das plantas, sendo que o aparecimento dos sintomas está intimamente relacionado com fatores ambientais, como temperatura e luminosidade (MATTHEWS, 1992). Além disso, é uma técnica pouco precisa e em certos casos pode demorar de um a dois meses para a obtenção de resultados definitivos.

Atualmente, um dos testes mais empregados tem sido o sorológico ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Esse teste se baseia na reação antígeno-anticorpo e é um teste rápido e eficiente, porém demanda mão de obra treinada e a disponibilidade de antissoros específicos. Diversas variações têm sido empregadas no teste ELISA. O DAS-ELISA (*double antibody sandwich- ELISA*), sendo o mais empregado nos testes de diagnose de rotina, utiliza dois anticorpos policlonais, sendo o secundário conjugado com uma enzima (CLARK; ADAMS, 1977), e o TAS-ELISA (*triple antibody sandwich*) utiliza anticorpo policlonal para a captura do vírus e o monoclonal como segundo anticorpo específico, além de um terceiro, anti anticorpo monoclonal, conjugado com uma enzima (ASTIER et al., 2007). Em ambos os casos, a adição de substrato específico para a enzima que se encontra conjugada com um dos anticorpos, possibilita o desenvolvimento de uma coloração, cuja intensidade aumenta com a concentração do vírus na amostra. A avaliação dessa concentração pode ser obtida pela densidade ótica, medida em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustada conforme o substrato utilizado.

Outras técnicas de diagnose bastante empregadas na rotina é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação da Transcriptase Reversa seguido da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para vírus cujo ácido nucleico é o DNA e o RNA, respectivamente. O uso dessas técnicas cresceu imensamente nos estudos de fitopatógenos, pois supera as limitações encontradas nas técnicas anteriormente citadas, como ausência de anticorpos específicos, maior sensibilidade e maior facilidade para obter os primers para amplificação da sequência genômica alvo, sendo bem mais simples e menos oneroso do que obter anticorpos policlonais e monoclonais (HENSON; FRENCH, 1993). Portanto, para os vírus que possuem o DNA como ácido nucleico, realiza-se a amplificação utilizando a técnica de PCR, bastando apenas a extração do DNA e posterior amplificação com o auxílio de *primers* específicos para o vírus que se quer diagnosticar, caso ele seja conhecido.

Para os vírus que tem como ácido nucleico o RNA, primeiramente é necessário fazer uma cópia de cDNA, por meio da utilização da enzima transcriptase reversa, antes de empregar a PCR. Quando não se conhece o vírus a ser diagnosticado, pode-se empregar alguns primers como: direcionados às regiões conservadas do genoma, a exemplo, o oligo dT, que tem como alvo a cauda poliA, presente nos mRNAs; primers aleatórios disponíveis comercialmente (ou *random primers*), que se ligam à sequência a ser amplificada (NIE; SINGH, 2001). Após a amplificação é necessário fazer o sequenciamento genômico, a fim de realizar a diagnose por comparação com os genomas virais depositados no banco internacional de genes (GENBANK).

3 Material e Métodos

3.1 Coleta e armazenamento das amostras e realização de ensaios

O isolado viral utilizado neste trabalho foi coletado no Estado de Santa Catarina, e encaminhado para o Laboratório de Virologia Molecular para diagnose, onde recebeu o nome de BRSC2017. As folhas de *Physalis* com sintomas foram utilizadas para inoculação mecânica em plantas de *Physalis peruviana*, para manutenção do inóculo e parte armazenadas em ultrafreezer, -80°C. Folhas sintomáticas foram coletadas e dessecadas para armazenamento em freezer, a -24°C. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Virologia Molecular e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG), ambos situados no Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras.

3.2 Teste Biológico em plantas hospedeiras

As plantas hospedeiras foram obtidas por semeadura em bandejas e posterior transplante para vasos contendo terra, areia e esterco na proporção 3:1:2, sob condições de casa de vegetação. Foram inoculadas as seguintes espécies indicadoras: *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum* cv. Turkish e cv. Samsun NN, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *Physalis peruviana*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Capsicum annum* Group, *Solanum lycopersicum*, *Gomphrena globosa* e *Datura stramonium*.

Para cada espécie, foram inoculadas mecanicamente duas plantas no estágio de duas a três folhas, com duas repetições e dois tratamentos: plantas inoculadas e não inoculadas. Foram realizadas duas repetições no tempo: uma em junho/2017 e outra em novembro/2017. Para a inoculação mecânica, folhas de *P. peruviana* foram maceradas em tampão fosfato 0,01M pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1g/5ml (p/v). O extrato obtido foi friccionado nas folhas das plantas teste receptoras, previamente polvilhadas com Carborundo (CSi) 600 mesh, e, em seguida, essas foram lavadas com água corrente e as plantas mantidas por aproximadamente 60 dias na casa-de-vegetação para observação visual dos resultados.

3.3 Estudo da transmissão via vetor *Myzus persicae* e via semente

No estudo de transmissão via afídeo, foram empregadas 3 plantas, com duas repetições e três tratamentos: plantas inoculadas com afídeos previamente alimentados em planta infectada, plantas com afídeos previamente alimentados em plantas sadias e plantas não infestadas com pulgões. Afídeos jovens da espécie *Myzus persicae*, foram mantidos em plantas de *P. peruviana* não infectadas e/ou infectadas com o BRSC2017, durante 24 horas, como período de aquisição do

vírus, em câmara de crescimento, com temperatura e umidade controladas. Após esse tempo, 20 pulgões foram transferidos para plantas saudas de *P. peruviana* e deixados por mais 24 horas como período de transmissão. Em seguida, os pulgões foram eliminados com inseticida e as plantas transferidas para a casa de vegetação, para observação visual de possíveis sintomas, por mais 60 dias.

3.4 Microscopia Eletrônica

Fragmentos de folhas infectadas, com o isolado BRSC2017, foram coletados e o seu extrato obtido por maceração, com um bastão de vidro, em lâmina de microscópio na presença de solução tampão fosfato de sódio e potássio 0.1 M, pH 7.0, contendo 2% polivinilpirrolidona e 0.2 % de sulfito de sódio (p/v). Em seguida, o extrato foi colocado em tela de cobre, com malha de 400µm, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e posterior lavagem por cinco vezes com água ultrapura para a remoção dos sais. Após a lavagem o material foi contrastado com acetato de uranila a 1% e seco em papel filtro Whatman. A observação das telas foi feita em Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo JEOL JEM1011 na Universidade de Wageningen, Holanda.

3.5 Minipurificação e extração do RNA viral

Para a extração da partícula viral, adaptou-se a metodologia estabelecida por Chang et al. (1976). Foram macerados 2g de tecido foliar sintomático de *P. peruviana* em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 15ml de Tampão Citrato de Amônio (0,1M e pH 7,6), 150µL de Iodoacetamida (0,25M), 150µL de Dietil-ditio-carbamato de Sódio (NaDieca) à 0,5M e 50µL de β-mercaptoetanol. Após a homogeneização, a suspensão foi filtrada em gaze, transferida para tubos e centrifugada a 8.000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos da ultra centrífuga à vácuo (Beckman L8-70M), adicionado de 500µL de Triton X-100 e misturado por vórtex. Os tubos foram centrifugados com 5ml de almofada de sacarose a 20%, preparado com a mesma solução utilizada na etapa de homogeneização, durante 3 horas e 30 minutos a 28.000rpm.

O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1ml de Tampão Fosfato (0,005M e pH 7,2). Os tubos foram vedados com parafilme e a solução foi incubada a 4°C *overnight*. O sobrenadante foi transferido para microtubos e centrifugado a 8.000 rpm durante 5 minutos. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante transferido para novos microtubos que, posteriormente, foram armazenados à -24°C.

Para a extração do RNA viral, 100 μ L da suspensão viral obtida no processo de purificação parcial foram misturados a 100 μ L de água ultrapura tratada com DEPC e 50 μ L de Tampão de Extração pH 9,5 contendo: 0,2M de Tris-glicina, 0,2M de NaCl e 20mM de EDTA. Também foi adicionado 20 μ L de SDS 20% e 2,7 μ L de Proteinase K (20ng/ml). Após a homogeneização, os microtubos foram incubados à 37°C em estufa durante 90 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio na proporção de 1:1 e a solução foi homogeneizada em vórtex. A solução foi centrifugada a 10.000rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. A etapa anterior foi repetida, mudando apenas a centrifugação que passou a ser de 15 minutos a 13.200 rpm e o sobrenadante transferido para microtubos novos.

A precipitação do RNA viral foi realizada utilizando-se 1/20 volumes de acetato de sódio (3M e pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. A incubação foi em ultra freezer (-80°C) durante 30 minutos. Os microtubos foram centrifugados durante 30 minutos a 13.200rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi lavado com Etanol 70% com centrifugação de 13.200rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em câmara de fluxo, em seguida, ressuspenso em água ultrapura tratada com DEPC e autoclavada. Foi utilizado 1 μ L da solução contendo o RNA viral para verificação da integridade do RNA em gel de agarose a 0,7%, corado com gel red e visualizado em fotodocumentador com luz ultravioleta, utilizando um marcador de 1Kb.

3.6 Reação de RT-PCR com Random Primers e análise de Bioinformática

Em um microtubo foi adicionado 1 μ L do RNA viral, 1 μ L de dNTP's (10mM), 1 μ L de *random primers* hexâmeros (Promega) e 10,5 μ L de água ultrapura tratada com DEPC e autoclavada. A suspensão foi incubada durante 10 minutos a 70°C, e imediatamente transferida para o gelo. Foram adicionados 4 μ L de Tampão (Ludwig Biotec) e 1 μ L da enzima M-MLV Transcriptase Reversa (Ludwig Biotec). Os microtubos foram incubados a 50°C durante 50 minutos para síntese do cDNA e 70°C durante 15 minutos para inativação da enzima.

Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 1 μ L do cDNA foi utilizado juntamente com 1 μ L de dNTP's (10mM), 1 μ L de *random primers* (Promega) (25ng/ μ L), 5 μ L de tampão da enzima e 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (Cellco). A amplificação em termociclador iniciou-se com 95°C durante 2 minutos; 95°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, 30 vezes, respectivamente, e, por fim, 72°C por 5 minutos. O

resultado foi visualizado em gel de agarose a 0,7%, corado com gel red, utilizando um marcador de 100pb.

Os fragmentos obtidos foram sequenciados pela empresa Helixxa. As análises foram realizadas utilizando-se o programa NCBI BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2015) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos e a construção de árvores filogenéticas foram feitos empregando-se os programas CLUSTAL W2 (V. 2.0) e Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7.0), respectivamente. A caracterização das espécies seguiu os critérios do ICTV, que consideram mesmas espécies de *Sobemovirus* as que possuem identidade maior ou igual a 75%.

Os isolados do GenBank empregados para comparação foram membros do gênero *Sobemovirus*: dispostos na Tabela 1, tendo as relações filogenéticas sido estudadas utilizando-se o algoritmo neighbor-joining para aminoácidos e UPGMA para nucleotídeos, empregando-se o bootstrap com 5.000 repetições.

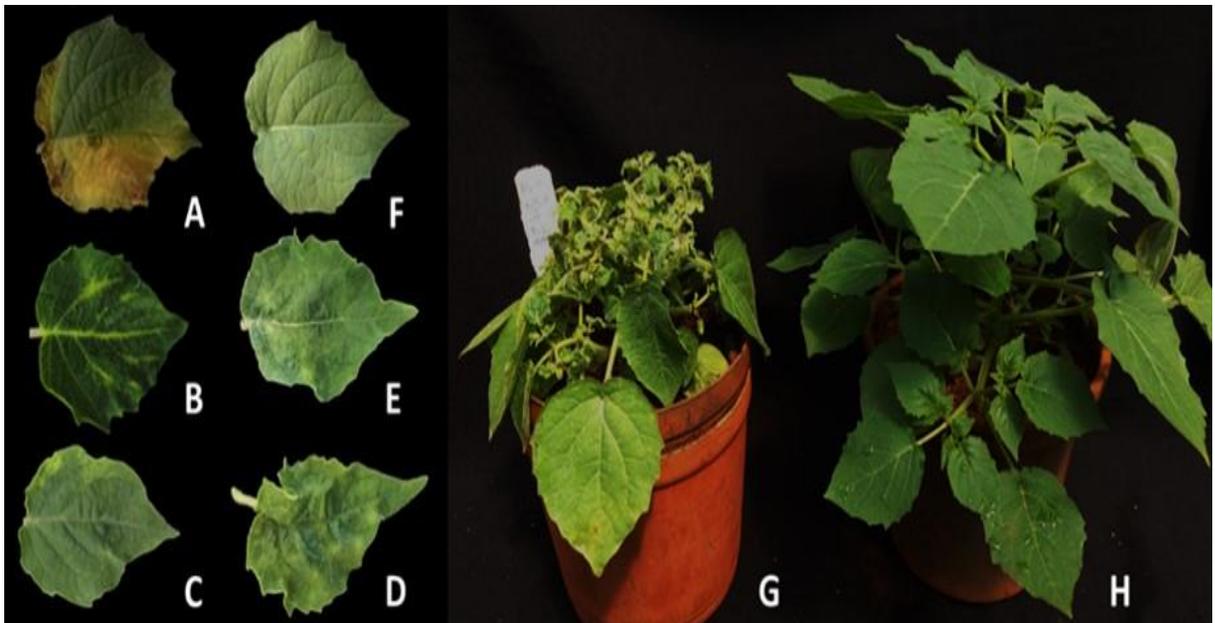
Tabela 1 - Isolados pertencentes ao gênero *Sobemovirus* disponíveis no GenBank empregados para comparação com o isolado de *Physalis peruviana* coletado em Santa Catarina (BRSC2017).

Acesso	Espécie/Isolado	Local	Referência
NC_033706	<i>Solanum nodiflorum mottle virus</i> (SNMV)	Austrália	(SÔMERA; TRUVE, 2017)
HM754263	<i>Velvet tobacco mottle virus</i> isolado K1 (VTMoV)	Austrália	(ARTHUR; DOGRA; RANGLES, 2010)
HQ680395	<i>Velvet tobacco mottle virus</i> isolado Cunnamulla	Austrália	(ARTHUR et al., 2014)
HQ680386	<i>Velvet tobacco mottle virus</i> isolado Yanninguire	Austrália	(ARTHUR et al., 2014)
HQ680389	<i>Velvet tobacco mottle virus</i> isolado F	Austrália	(ARTHUR et al., 2014)
HQ680387	<i>Velvet tobacco mottle virus</i> isolado Cobblers	Austrália	(ARTHUR et al., 2014)
AY177608	<i>Turnip rosette virus</i> (TRoSV)		(SÔMERA; TRUVE, 2013)
EF091714	<i>Ryegrass mottle virus</i> isolado MAFF	Japão	(BALKE; RESEVICA; ZELTINS, 2007)
AJ608207	<i>Rice yellow mottle virus</i> (RYMV)	Costa do Marfim	(BALKE; RESEVICA; ZELTINS, 2007)
NC_002618	<i>Cocksfoot mottle virus</i> (CfMV)		(MAKINEN et al., 1995)
NC_001696	<i>Lucerne transient streak virus</i> (LTSV)	Canadá	(SÔMERA; TRUVE, 2013)
AY376453	<i>Subterranean clover mottle virus</i> (SCMoV)	Austrália	(DWYER et al., 2003)
NC_029578	<i>Blueberry shoestring virus</i> (BSSV)	Estados Unidos	(YANAGISAWA et al., 2016)
GQ845002	<i>Sowbane mosaic virus</i> (SoMV)	China	
AY004291	<i>Sesbania mosaic virus</i> (SeMV)	Índia	(LOKESH et al., 2001)
DQ875594	<i>Southern bean mosaic virus</i> (SBMV)	Brasil	(OZATO JÚNIOR; GASPARELLO; BELINTANI, 2009)

4 Resultados e Discussão

As plantas de *Physalis peruviana* inoculadas com o isolado BRSC2017 reagiram com sintomas de mosaico e manchas cloróticas, nas nervuras e no limbo foliar, que são bastante semelhantes aos causados pelo PVY (Figura 1), levando à suspeita de que poderia se tratar desse vírus. Entretanto, quando submetidas ao teste DAS-ELISA, utilizando anticorpos para detecção de PVY, os resultados foram negativos.

Figura 1 - Sintomas apresentados por plantas de *Physalis peruviana* inoculadas mecanicamente com o isolado viral BRSC2017. Em A pontos necróticos; B clorose nas nervuras; C clorose nas bordas da folha; D e E mosaico, enrugamento e deformação foliar; F folha sadia; G planta inoculada, H planta sadia.



Dentre as 10 espécies inoculadas mecanicamente, as solanáceas *Nicotiana tabacum* (Turkish e Samsun NN), *Capsicum annuum*, *Solanum Lycopersicum* e *Datura stramonium* e as espécies *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae), *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor* (Chenopodiaceae), foram imunes, ou seja, não mostraram sintomas visuais (Tabela 2). Apenas as espécies selvagens de *Nicotiana*, a *N. clevelandii*, a *N. glutinosa* e a *N. benthamiana* foram suscetíveis. Pode-se observar, portanto, que o BRSC2017 infecta seletivamente plantas dentro da família *Solanaceae*, sendo a *P.peruviana* a única espécie suscetível, entre as plantas cultivadas dessa família, que foram testadas.

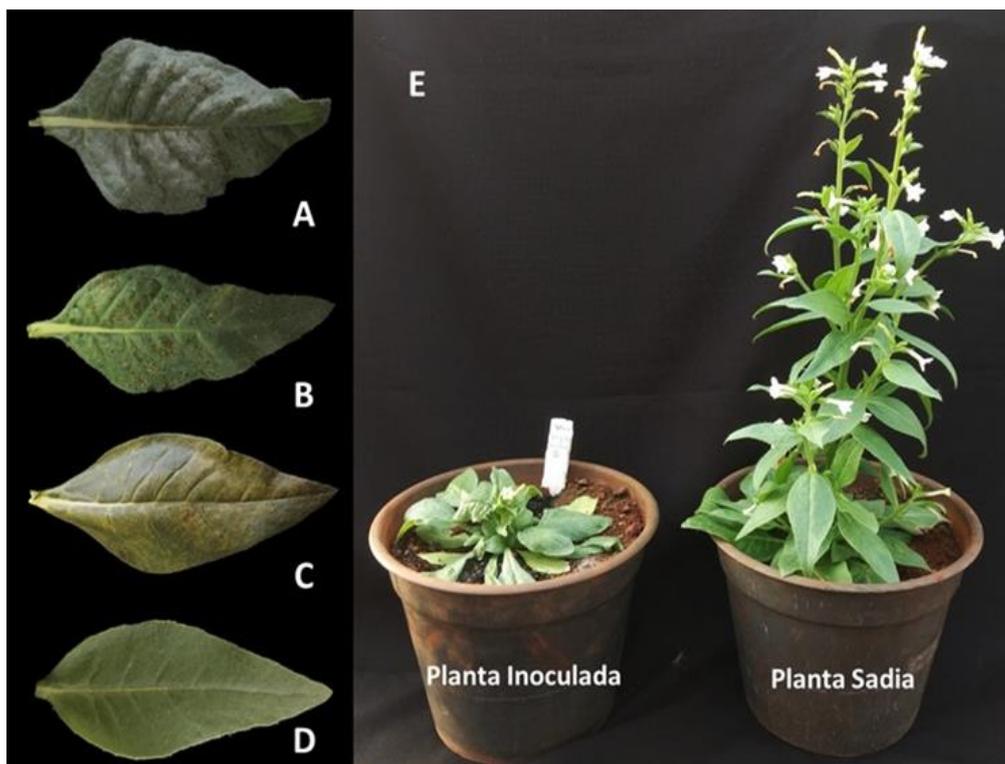
Tabela 2 - Sintomas apresentados pelas plantas indicadoras após a inoculação com isolado BRCS2017.

Famílias	Espécies	Sintomas
	<i>Physalis peruviana</i>	N / CN / CL / Ms / Er / Df
	<i>Nicotiana tabacum cv Sansun NN</i>	I
	<i>Nicotiana tabacum cv Turkish</i>	I
Solanaceae	<i>Nicotiana clevelandii</i>	M / Ers / N / Df / Efs
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	M / CN / Ef
	<i>Nicotina benthamiana</i>	M / A / Ef /
	<i>Datura stramonium</i>	I
	<i>Solanum lycopersicum</i>	I
	<i>Capsicum annuum</i>	I
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	I
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	I
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	I

Legenda: M = mosaico CN = clorose nas nervuras CL = clorose no limbo foliar A = anéis esverdeados Er = enrugamento Ef = enfezamento N = necrose Df = deformação foliar I = imune s = severo

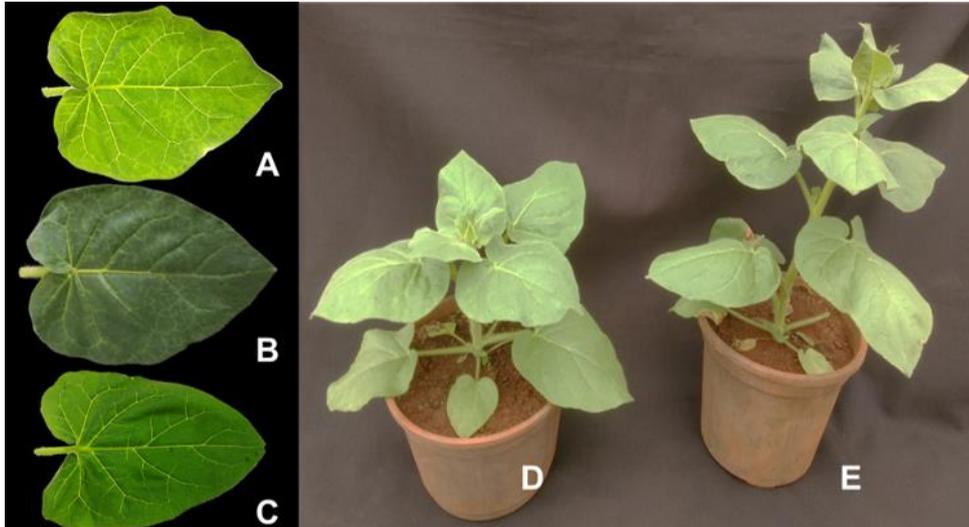
Os sintomas observados em *N. clevelandii* (Figura 2), foram caracterizados por mosaico comum, mais visível nas folhas novas, enrugamento severo, necrose e deformação foliar (Figura 2 A-C). As plantas apresentaram também enfezamento severo, tendo ocorrido a morte da planta cerca de 20 dias após a inoculação.

Figura 2 - Sintomas em *Nicotiana clevelandii*, 15 após serem inoculadas mecanicamente com o isolado viral BRSC2017. Em A-C sintomas nas folhas; D folha sadia; E plantas inoculada com isolado e planta sem inoculação.



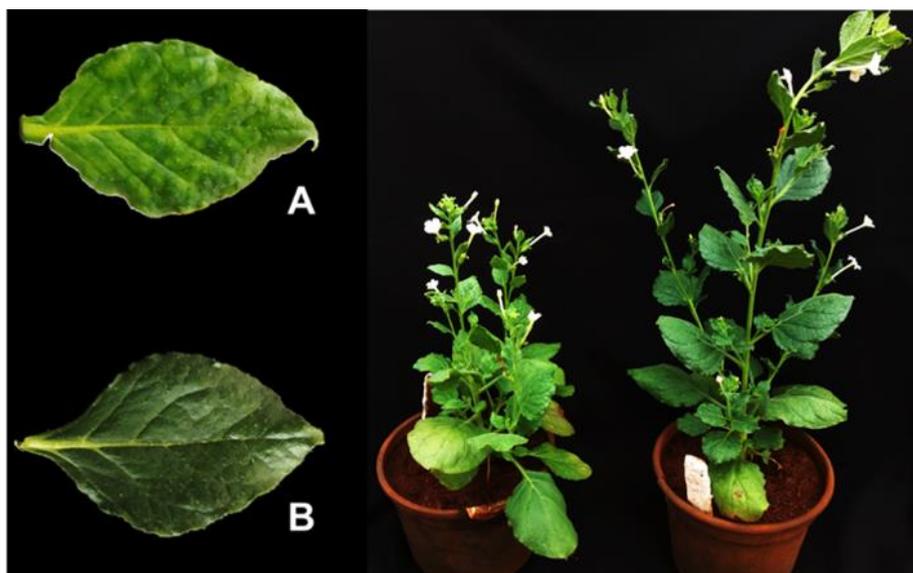
A *N. glutinosa* mostrou mosaico leve, clorose nas nervuras e enfezamento (Figura 3). Ao contrário da *N. clevelandii* essas plantas não morreram no decorrer do experimento.

Figura 3 - Sintomas causados pelo isolado viral BRSC2017 de *Physalis peruviana* em *Nicotina glutinosa*: em A mosaico leve; B clorose nas nervuras; C folha sadia; D enfezamento; E controle negativo.



Plantas de *N. benthamiana* apresentaram sintomas de mosaico e o aparecimento de anéis esverdeados com centro clorótico (Figura 4). As plantas também apresentaram redução da área foliar e enfezamento.

Figura 4 - Sintomas observados em *Nicotina benthamiana* após a inoculação com isolado BRSC2017: em A mosaico; B folha sadia; C enfezamento; D controle negativo.

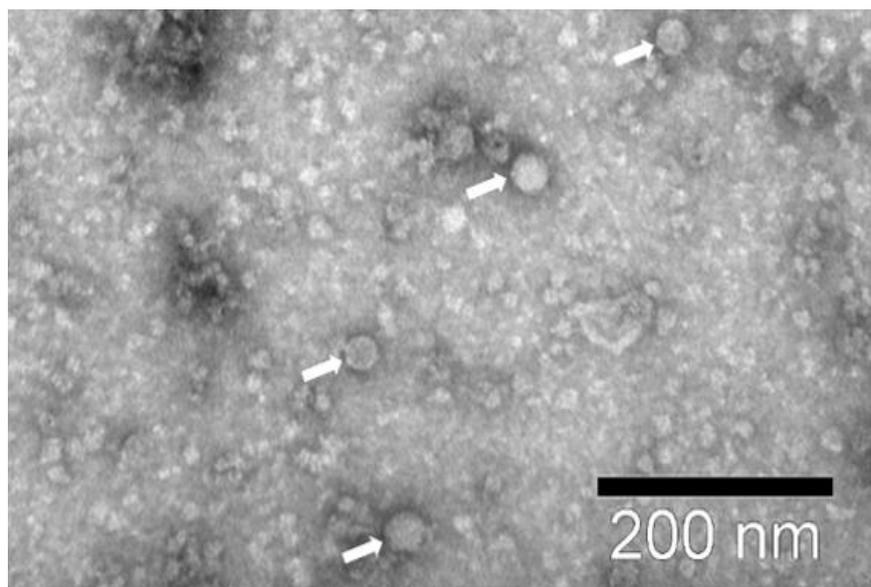


Os resultados observados nas plantas inoculadas foram bastante diferentes dos causados por PVY, pois esse infecta parte das plantas que foram imunes ao BRSC2017 como: *Nicotiana tabacum* (2 cultivares), *Solanum lycopersicum*, *Chenopodium* sp e *Capsicum annuum*. Além disso, os sintomas do PVY em *N. benthamiana* se caracterizam por mosaico leve ou severo, deformação foliar, clareamento do espaço internerval, em temperaturas entre 25 e 30°C, tendendo a ficar mais severos em temperaturas inferiores (CHUNG et al., 2016; DEL TORO et al., 2015; DOROSZEWSKA; DEPTA, 2011), enquanto que o isolado BRSC2017 induziu anéis esverdeados nas folhas, e apresentou o mesmo padrão no experimento realizado no inverno e no verão. Isso corroborou os resultados obtidos em DAS-ELISA, que foram negativos para a presença do PVY.

Além disso, nos testes de transmissão do isolado BRSC2017 pelo *M. persicae*, nenhuma das plantas inoculadas, com o afídeo previamente alimentado em plantas de *P. peruviana* infectadas, apresentaram sintomas, mostrando a ineficiência desse vetor. Isso definitivamente excluiu a possibilidade de ser ele um isolado de PVY.

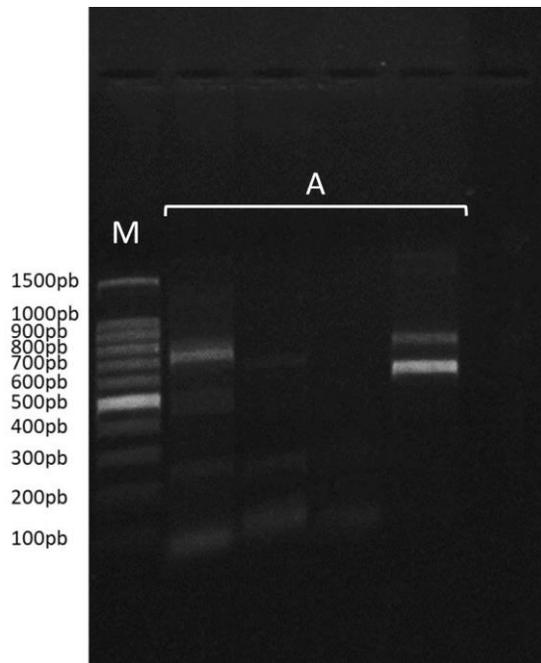
Após esses ensaios, as observações feitas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), utilizando-se a técnica de 'leaf deep' e contrastação negativa (Figura 5), mostraram a presença de partículas isométricas, com aproximadamente 30nm de diâmetro, revelando a presença de uma outra espécie viral.

Figura 5 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando partículas isométricas evidenciadas pelas setas brancas. A barra indica a dimensão de 200nm.



Iniciou-se então a pesquisa por meio de amplificação e sequenciamento do genoma, utilizando-se *random primer* (Figura 6). Após sequenciados, os fragmentos genômicos obtidos permitiam montar uma sequência com 673pb que, quando comparada com os isolados disponíveis no GenBank (NCBI), apresentou maior identidade com a RNA polimerase dependente de RNA (ORF2b) de isolados do vírus *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV). Esse vírus pertence ao gênero *Sobemovirus*, que também possui partícula isométrica com aproximadamente 30nm de diâmetro (HULL, 1988).

Figura 6 - Análise eletroforética em gel de agarose do produto da PCR. Em M marcador de peso molecular 100pb e A Produtos das PCRs com *Random primers*.



Quando se compararam os sintomas induzidos por ambos os vírus, VTMoV e o isolado BRSC2017, nas hospedeiras empregadas nesse trabalho, os sintomas apresentados por *N. clevelandii* foram semelhantes. A exemplo do que foi obtido nesse trabalho, outros autores observaram que essas plantas, quando inoculadas com o VTMoV, apresentaram lesões necróticas, mosaico severo e rugosidade. Entretanto, o VTMoV induziu necrose em plantas de *N. glutinosa* e não induziu sintomas nas plantas de *Physalis peruviana* e *N. benthamiana*, como o observado para o isolado BRSC2017 (FRANCKI; GRIVELL; GIBB, 1986, ARTHUR; DOGRA; RANGLES, 2010). Isso indicou uma possível diferença entre esses dois vírus.

As identidades de nucleotídeos obtidas, quando o fragmento genômico amplificado do BRSC2017 foi comparado com os isolados disponíveis no GenBank (Tabelas 3), mostraram

uma identidade entre 68%, com o isolado HQ 680395, e 70%, com os isolados HQ680389 e HQ680387, todos pertencentes à espécie VTMoV, descritos na Austrália. Quando comparados com outras espécies de Sobemovirus, apresentou identidades iguais ou menores que 65%.

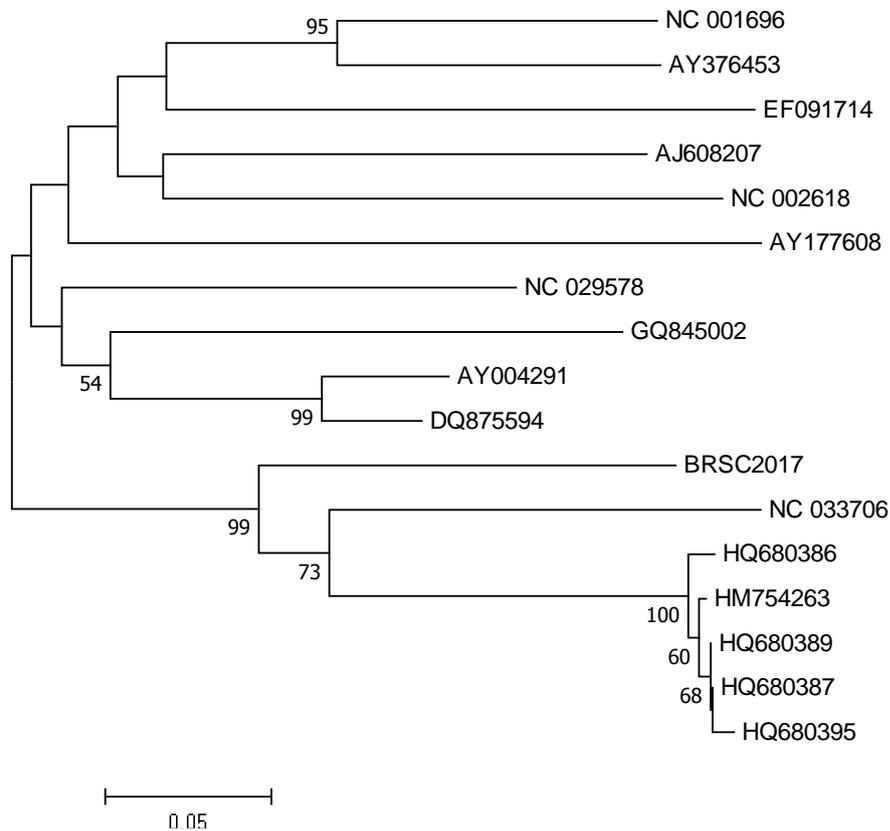
Tabela 3 - Matriz de identidade de nucleotídeos entre o isolado BRSC2017 com acessos do GenBank dos membros do gênero *Sobemovirus* e isolados de VTMoV.

Nº	Isolado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	BRSC2017	-	65	68	69	70	70	69	61	60	63	61	60	58	63	65	61	63
2	NC_033706		-	69	69	70	70	69	59	59	62	59	61	60	60	62	64	65
3	HQ680395			-	94	95	96	94	59	59	62	61	62	58	62	62	61	61
4	HQ680386				-	97	96	96	59	59	61	61	62	60	63	62	62	62
5	HQ680389					-	97	97	59	60	63	61	61	59	63	62	61	61
6	HQ680387						-	97	59	59	63	61	61	58	64	61	61	61
7	HM754263							-	59	59	62	61	61	60	63	61	62	62
8	AY177608								-	58	60	58	59	59	61	63	64	64
9	EF091714									-	65	62	60	58	62	58	65	66
10	AJ608207										-	64	63	63	65	62	64	65
11	NC_002618											-	64	63	59	60	64	64
12	NC_001696												-	71	61	60	65	66
13	AY376453													-	63	62	63	63
14	NC_029578														-	64	69	66
15	GQ845002															-	67	67
16	AY004291																-	81
17	DQ875594																	-

Quando foi construída a árvore filogenética, com base na sequência de nucleotídeos (Figura 7), o BRSC2017 se agrupou próximo aos isolados de VTMoV e de *Solanum nodiflorum mottle virus* (SNMV), porém ficou em um clado separado, mostrando uma certa distância genética entre eles.

A identidade de aminoácidos entre o BRSC2017 e os isolados de VTMoV do GenBank (Tabela 4) foi um pouco maior, mostrando que algumas das substituições observadas nos nucleotídeos foi do tipo sinônima. A menor identidade foi de 73%, com os isolados HQ680395 e HQ680386, e a maior foi de 74% com os isolados HQ680389, HQ680387 e HM754263, todos de VTMoV da Austrália. A identidade de aminoácidos com outras espécies de *Sobemovirus* foi igual ou menor a 71%. A árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos (Figura 8) foi semelhante a obtida com base na sequência de nucleotídeos, com o BRSC2017 localizado isoladamente em um clado.

Figura 8 - Cladograma construído com base na sequência de aminoácidos do BRSC2017 e de outras espécies de Sobemovirus disponíveis no GenBank. Os valores foram obtidos pelo MEGA 7.0 e teste neighbor-joining, com 5000 repetições.



Apesar de apresentar uma identidade maior com o VTMoV, os critérios adotados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, consideram que para pertencer a uma mesma espécie do gênero *Sobemovirus*, o exemplar deve apresentar uma identidade de nucleotídeos igual ou superior a 75% em todo o genoma. Portanto existe uma possibilidade de ser essa uma outra espécie ainda não descrita na literatura. Porém é necessário fazer o sequenciamento do genoma completo para que seja possível uma conclusão definitiva.

5 Conclusão

O isolado BRSC2017 apresentou maior identidade com o *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV), ainda não descrito anteriormente no Brasil, bem como características morfológicas típicas de espécies do gênero *Sobemovirus*.

Por ter apresentado identidade menor do que a necessária para ser considerado um isolado da espécie VTMoV, no fragmento genômico sequenciado, é possível que o BRSC2017 seja uma nova espécie, porém isso somente poderá ser confirmado após o sequenciamento completo do seu genoma.

6 Referências Bibliográficas

- ARTHUR, K. et al. Nucleotide sequence diversity in velvet tobacco mottle virus: A virus with a unique Australian pathosystem. **Virus Genes**, v. 48, n. 1, p. 168–173, 2014.
- ARTHUR, K.; DOGRA, S.; RANGLES, J. W. Complete nucleotide sequence of Velvet tobacco mottle virus isolate K1. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1893–1896, 2010.
- ASTIER, S. et al. **Principles of Plant Virology: Genome, Pathogenicity, Virus Ecology**. Enfield, NH, USA: Science Publishers, 2007.
- BALKE, I.; RESEVICA, G.; ZELTINS, A. The Ryegrass mottle virus genome codes for a sobemovirus 3C-like serine protease and RNA-dependent RNA polymerase translated via -1 ribosomal frameshifting. **Virus Genes**, v. 35, n. 2, p. 395–398, 2007.
- BETEMPS, D. L. et al. Época de Semeadura, Fenologia e Crescimento de Plantas de Fisális no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 179–185, 2014.
- CHANG, M. U. et al. Morphology and Intracellular Appearance of Orchid Fleck Virus. **Ann. Phytopath. Soc. Japan**, v. 42, p. 156–157, 1976.
- CHUNG, B. N. et al. The Effects of High Temperature on Infection by Potato virus Y, Potato virus A, and Potato leafroll virus. **Plant Pathology**, v. 32, n. 4, p. 321–328, 2016.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475–483, 1977.
- DEL TORO, F. J. et al. High temperature, high ambient CO₂ affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- DOROSZEWSKA, T.; DEPTA, A. RESISTANCE OF WILD NICOTIANA SPECIES TO DIFFERENT PVY ISOLATES 1. **Phytopathologia**, v. 59, p. 9–24, 2011.
- DWYER, G. I. et al. The complete nucleotide sequence of Subterranean clover mottle virus. **Archives of Virology**, v. 148, n. 11, p. 2237–2247, 2003.
- FRANCKI, R.-I. B. **Studies on encapsidated viroid-like RNA I. Characterization of Velvet Tobacco Mottle Virus** *Virology*, 1981.
- FRANCKI, R. I. B.; GRIVELL, C. J.; GIBB, K. S. **Isolation of velvet tobacco mottle virus capable of replication with and without a viroid-like RNA** *Virology*, 1986.
- GIBB, K. S. J.; RANGLES, J. W. **Transmission of velvet tobacco mottle virus and related viruses by the mirid *Cyrtopeltis nicotianae***. *Advances in Disease Vector Research*, 1991.
- GOPINATH, K. et al. Genomic sequence of physalis mottle virus and its evolutionary relationship with other tymoviruses * . p. 1489–1500, 1998.
- GOULD, A. R.; FRANCKI, R. I. B.; RANGLES, J. W. **Studies on encapsidated viroid-like RNA IV. requirement for infectivity and specificity of two RNA components from velvet tobacco mottle virus** *Virology*, 1981.
- HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 31, p. 81–109, 1993.

HULL, R. The Grouping of Small Spherical Plant Viruses with Single RNA Components. **J. gen. Virol.**, v. 36, p. 289–295, 1977.

HULL, R. The Sobemovirus Group. In: FRAENKEL-CONRAT, H.; WAGNER, R. R. (Eds.). **The Plant Viruses: Polyhedral Virions With Monopartite RNA Genomes**. Plenum Press. New York: [s.n.]. v. 3p. 113–139.

ICTV. **INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. Virus taxonomy: 2017 release**. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

KLINAC, D. J. Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) production systems. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 14, n. 4, p. 425–430, 1986.

KRISHNA, S. S. et al. Three-dimensional Structure of *Physalis Mottle Virus*: Implications for the Viral Assembly. **Journal of molecular biology**, v. 289, p. 919–934, 1999.

KRISHNA, S. S. et al. Structural Studies on the Empty Capsids of *Physalis Mottle Virus*. 2001.

LEGGE, A. P. Notes on the history, cultivation and uses of *Physalis peruviana* L. **Journal of the Royal Horticultural Society**, v. 99, n. 7, p. 310–314, 1974.

LOKESH, G. L. et al. Complete nucleotide sequence of *Sesbania mosaic virus*: A new virus species of the genus *Sobemovirus*. **Archives of Virology**, v. 146, n. 2, p. 209–223, 2001.

MAKINEN, K. et al. Characterization of cocksfoot mottle sobemovirus genomic RNA and sequence comparison with related viruses. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 1995, p. 2817–2825, 1995.

MATTHEWS, R. E. F. **Fundamentals of Plant Virology**. 1^a Edição ed. Nova Zelândia: ACADEMIC PRESS, INC. Harcourt Brace Jovanovich, 1992.

MOLINE, H. E.; FRIES, R. E. A strain of belladonna mottle virus isolated from *Physalis heterophylla* in Iowa. **Phytopathology**, v. 64, p. 44–48, 1973.

MUNIZ, J. et al. Sistemas de condução para o cultivo de *Physalis* no planalto catarinense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 830–838, 2008.

MUNIZ, J. et al. General aspects of *Physalis* cultivation. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 964–970, 2014.

NIE, X.; SINGH, R. P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. **Journal of Virological Methods**, v. 91, p. 37–49, 2001.

OZATO JÚNIOR, T.; GASPAR, J. O.; BELINTANI, P. Completion of the Nucleotide Sequence of a Brazilian Isolate of *Southern bean mosaic virus*. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 9, p. 573–575, 2009.

PUENTE, L. A. et al. ***Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review** **Food Research International**, 2011.

RODRIGUES, E. et al. Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit *Physalis peruviana* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 642–645, 2009.

RUFATO, A. D. R. et al. A cultura da *Physalis*. In: KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L.;

- PELIZZA, T. R. (Eds.). . **Pequenas Frutas**. Florianópolis: UDESC, 2013. p. 143–193.
- SALAZAR, M. R. et al. A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 2, p. 142–148, 2008.
- SASTRI, M. et al. Identification of a discrete intermediate in the assembly/disassembly of physalis mottle tymovirus through mutational analysis. **Journal of molecular biology**, v. 289, n. 4, p. 905–918, 1999.
- SÕMERA, M.; TRUVE, E. The genome organization of lucerne transient streak and turnip rosette sobemoviruses revisited. **Archives of Virology**, v. 158, n. 3, p. 673–678, 2013.
- SÕMERA, M.; TRUVE, E. Complete nucleotide sequence of *Solanum nodiflorum* mottle virus. **Archives of Virology**, v. 162, n. 6, p. 1731–1736, 2017.
- SULLIVAN, J. R. Pollination biology of *Physalis viscosa* var. *cinerascens* (Solanaceae). **American journal of botany**, v. 71, n. 6, p. 815–820, 2014.
- THE PLANT LIST. **The Plant List**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>.
- TRUVE, E.; FARGETTE, D. Sobemovirus. In: KING, A. M. Q. et al. (Eds.). . **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. 9. ed. Elsevier Academic Press, 2012. p. 1185–1189.
- VAN DER WILK, F. et al. The genome-linked protein (VPg) of Southern bean mosaic virus is encoded by the ORF2. **Virus Genes**, v. 17, n. 1, p. 21–24, 1998.
- WU, S. J. et al. Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 407–413, 2006.
- YANAGISAWA, H. et al. Combined DECS analysis and next-generation sequencing enable efficient detection of novel plant RNA Viruses. **Viruses**, v. 8, n. 3, 2016.
- ZAPATA, J. et al. **Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia** **Boletim Técnico** Rionegro, Colômbia Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, , 2002. Disponível em: <[http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6407/1/Manejo del cultivo de la uchuva.pdf](http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6407/1/Manejo%20del%20cultivo%20de%20la%20uchuva.pdf)>