



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE TECNOLOGIA E SOCIEDADE
MESTRADO EM AMBIENTE TECNOLOGIA E SOCIEDADE

ANNA LUISA DE CARVALHO BRITO

**ESTUDO GENÔMICO E PROTEÔMICO DO FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*
NA CULTURA DO MAMÃO.**

MOSSORÓ - RN

Fevereiro de 2019

ANNA LUISA DE CARVALHO BRITO

**ESTUDO GENÔMICO E PROTEÔMICO DO FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*
NA CULTURA DO MAMÃO.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ioná Santos Araújo
Holanda - UFERSA.

Co-orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Sousa
Jereissati – UFERSA.

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Sales Junior -
UFERSA

MOSSORÓ - RN

Fevereiro de 2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B862e Brito, Anna Luisa de Carvalho.

Estudo genômico e proteômico do fitopatógeno *Alternaria alternata* na cultura do mamão / Anna Luisa de Carvalho Brito. - 2019.

58 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientador: Emmanuel de Sousa Jereissati.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2019.

1. Diagnóstico molecular. 2. Carica papaya. 3. Proteômica. I. Holanda, Ioná Santos Araújo, orient. II. Jereissati, Emmanuel de Sousa, co-orient. III. Título.

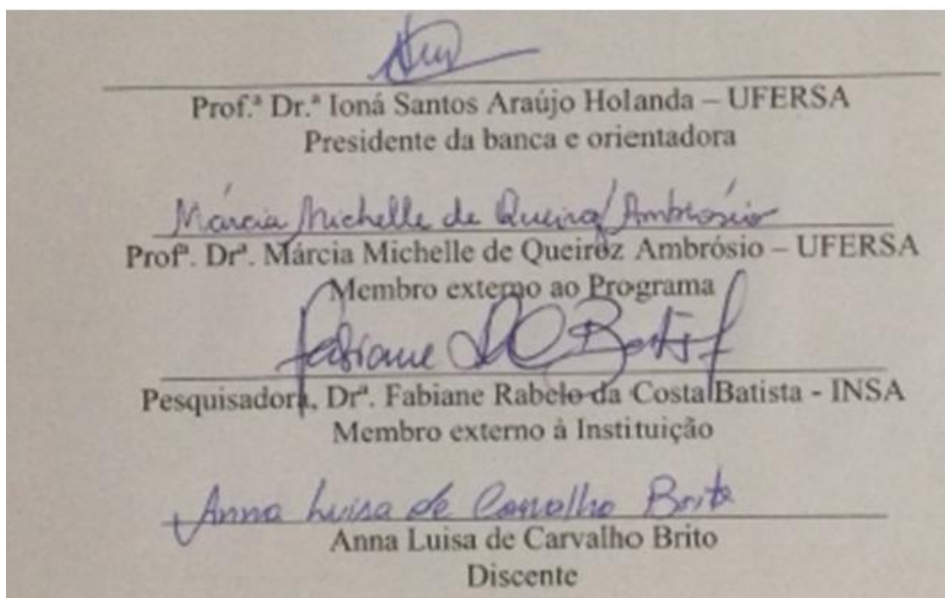
O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ANNA LUISA DE CARVALHO BRITO

**ESTUDO GENÔMICO E PROTEÔMICO DO FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*
NA CULTURA DO MAMÃO.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

Defendida em: 07 / 02 / 2019.



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente aos meus pais, Evani e Domingos Brito, por sempre terem estimulado em mim a busca pelo conhecimento, por sempre terem investido na minha educação, no meu bem-estar e na minha saúde. Por sempre terem sido meu ponto de apoio e estarem disponíveis para tudo que precisei, e que ainda possa precisar. Gostaria de agradecer também aos meus irmãos, Bruno e Ciro Brito, ao meu namorado Hélder Jr., e a toda minha família, que estão sempre presentes, mostrando suporte, me motivando e se alegrando junto comigo a cada nova conquista.

Nesses dois anos de mestrado tive ajuda não só de uma orientadora brilhante e inspiradora, a professora Ioná Holanda, mas também, de todo o Laboratório de Biotecnologia Vegetal, especialmente Sidarque Lima, Suzana Silva, Jorge Neto e Gilsivan Aquino. Foram vários os momentos de reuniões e conversas, não só acadêmicas, que esclareceram e aprimoraram minhas ideias, resultando nesse trabalho que tenho muito orgulho de estar concluindo, sem vocês esse trabalho não seria o mesmo, e nem meus fins de semana no laboratório teriam sido tão divertidos, agradeço de coração.

Agradeço ainda de forma especial, aos meus coorientadores: Emmanuel Jereissati, e Rui Sales Júnior. Muito obrigada pela disponibilidade, pela experiência nos ensinamentos quanto aos processos metodológicos, e por todo o apoio. Ao professor Emmanuel, obrigada também pelo empenho em firmar parcerias e atenção dada ao longo do trabalho. Vocês foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Tive a sorte de poder contar também, com o grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, que em pouco tempo já tem me ensinado muito sobre trabalho em equipe, irmandade, união e humildade, é um prazer fazer parte desse grupo e estar com vocês todos os dias. Quero me dirigir especialmente à Professora Oscarina Viana por todo apoio e compreensão, e a Pesquisadora Cristiane Teles, por toda ajuda e carinho. A vocês, o meu muito obrigada.

Meu último agradecimento todo especial, vai para o responsável por ter colocado todas essas pessoas na minha vida, permitindo que eu me tornasse a pessoa que sou hoje, e que eu chegasse até aqui. Obrigada Deus, por sempre trilhar meus caminhos, mesmo que eu não perceba sempre, no final, o senhor me mostra que tudo acontece da melhor maneira, e que tudo dá certo. Sou profundamente agradecida por tudo que tive a oportunidade de viver até hoje, e pelas experiências incríveis que sei que terei daqui para frente. Obrigada.

Discipline-se a fazer o que você sabe que é certo e importante, embora difícil. Este é o caminho para o orgulho, autoestima e satisfação pessoal.

Margaret Thatcher

ESTUDO GENÔMICO E PROTEÔMICO DO FITOPATÓGENO *Alternaria alternata* NA CULTURA DO MAMÃO.

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor e terceiro maior exportador mundial de mamão. O cultivo intensivo de mamoeiros em áreas fixas tem favorecido doenças fúngicas capazes de causar perdas no campo e também no período pós-colheita. Lesões foliares de origem fúngica prejudicam a capacidade fotossintética da planta podendo levá-la a morte, além de facilitar a invasão no fruto de patógenos causadores de podridão durante o amadurecimento, sendo responsáveis pelas perdas mais severas. Na cultura do mamão, a *Alternaria alternata* é capaz de causar danos tanto no fruto como também na folha. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um diagnóstico rápido e sensível da infecção de *A. alternata* na cultura do mamão, e investigar proteínas relacionadas a tal infecção. No presente estudo, *primers* gene específicos baseados na sequência do gene *Al a 1* (*AaltDAlta1* – CGCATCCTGCCCTGTCA/*AinFIAlta1* - GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC), foram utilizados para se fazer o diagnóstico molecular rápido e seguro da infecção de *A. alternata* em áreas produtoras do Rio Grande do Norte. Além da análise genômica, análise proteômica baseada em SDS-PAGE foi utilizada para separar proteínas extraídas de grupos controle e inoculado de mudas de mamão das variedades Tainung e Feltrin, a fim de investigar proteínas diferencialmente expressas com potencial de interferir no processo de estabelecimento da patologia. Os resultados da análise genômica mostraram que em 100% das áreas produtoras analisadas, foi encontrada a presença do fungo *A. alternata*, infectando mamoeiros no estado do Rio Grande do Norte. Na avaliação dos sintomas após inoculação, foi percebido que a variedade Feltrin possivelmente apresenta uma maior resistência à infecção, por ter apresentado sintomas mais brandos. Com as avaliações proteômicas, foi visto que na variedade Tainung as mudas inoculadas com *A. alternata* apresentaram redução do conteúdo proteico expresso. Dentre as proteínas inibidas, identificou-se a proteína RuBisCo, envolvida no metabolismo fotossintético vegetal. Assim, sugere-se que a inibição da proteína Rubisco possa estar envolvida nos mecanismos que levam ao surgimento dos sintomas relacionados a patogenia.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular, *Carica papaya*, Proteômica.

GENOMIC AND PROTEOMIC STUDY OF THE PHYTOPATHOGEN *Alternaria alternata*
IN PAPAYA CULTURE

ABSTRACT

Brazil is the second largest producer and third largest exporter of papaya. The intensive cultivation of papaya in fixed areas has favored fungal diseases capable of causing losses in the field and in the post-harvest period. Foliar lesions of fungal origin impair the photosynthetic capacity of the plant, leading to its death and facilitating the invasion into the fruit of pathogens causing rot during maturation, and being responsible for the more severe losses. In the culture of papaya, *Alternaria alternata* is capable of causing damage both in the fruit and in the leaf. The aim of the present work was to establish a rapid and sensitive diagnosis of *A. alternata* infection in papaya culture, and to investigate proteins related to such infection. In the present study, gene specific primers based on the Alt a 1 gene sequence (AaltDA1ta1 - CGCATCCTGCCCTGTCA / AinflAlta1 - GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC) were used to make a rapid and safe molecular diagnosis of *A. alternata* infection in papaya producing areas of Rio Grande do Norte. In addition to genomic analysis, SDS-PAGE-based proteomic analysis was used to separate proteins extracted from control and inoculated groups of papaya seedlings of the Tainung and Feltrin varieties, in order to investigate differentially expressed proteins with potential to interfere in the pathology establishment process. The results of the genomic analysis showed that in 100% of the producing areas analyzed, the presence of the fungus *A. alternata* was found infecting papaya plants in the state of Rio Grande do Norte. In the evaluation of the symptoms after inoculation, it was noticed that the Feltrin variety possibly presents a greater resistance to the infection, due to having presented milder symptoms. With the proteomic evaluations, it was observed that in the Tainung variety the seedlings inoculated with *A. alternata* showed reduction of the expressed protein content. Among the inhibited proteins, RuBisCo protein, involved in plant photosynthetic metabolism, was identified. Thus, it is suggested that the inhibition of Rubisco protein may be involved in the mechanisms that lead to the appearance of symptoms related to pathogenesis.

Keywords: Molecular diagnosis, *Carica papaya*, Proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folha de mamoeiro com sintoma de "queima" causado por <i>A. alternata</i>	26
Figura 2 - Mudanças comerciais da variedade Tainung.....	29
Figura 3 - Mudanças comerciais da variedade Feltrin, amostras na sementeira, e nos recipientes.	29
Figura 4 - Aspectos das folhas com sintomas de queima de <i>Alternaria</i>	30
Figura 5 - DNA das amostras de folhas coletadas na Fazenda A.....	33
Figura 6 - DNA das amostras de folhas coletadas na Fazenda B.....	33
Figura 7 - DNA das amostras de folhas coletadas na Fazenda C.....	33
Figura 8 - PCR com <i>primer</i> gene-específico para a espécie <i>A. alternata</i> nas amostras 1 a 8 da Fazenda A. Tamanho esperado para amplificação quando há presença de <i>A. alternata</i> : 118pb. O sinal “+” se refere aos controles positivos utilizados (DNA de cepa isolada de <i>A. alternata</i>), “M” se refere ao marcador de peso molecular.	35
Figura 9 - PCR com <i>primer</i> gene-específico para a espécie <i>A. alternata</i> nas amostras 1 a 8 da Fazenda B. Tamanho esperado para amplificação quando há presença de <i>A. alternata</i> : 118pb. O sinal “+” se refere aos controles positivos utilizados (DNA de cepa isolada de <i>A. alternata</i>), “M” se refere ao marcador de peso molecular.	35
Figura 10 - PCR com <i>primer</i> gene-específico para a espécie <i>A. alternata</i> nas amostras 1 a 8 da Fazenda C. Tamanho esperado para amplificação quando há presença de <i>A. alternata</i> : 118pb. O sinal “+” se refere aos controles positivos utilizados (DNA de cepa isolada de <i>A. alternata</i>), “M” se refere ao marcador de peso molecular.	36
Figura 11 - Aspecto das folhas 7 dias após a inoculação com <i>A. Alternata</i> na variedade Tainung. Destaque para a área da lesão e despigmentação foliar.	39
Figura 12 - Aspecto das folhas 7 dias após a inoculação com <i>A. Alternata</i> na variedade Feltrin. Destaque para área da lesão.	40
Figura 13 - Extensão dos danos causados por <i>A. alternata</i> em mudas da variedade Tainung 7 dias após inoculação. Os quadros em vermelho destacam as mudas que morreram (10 de 30).	41
Figura 14 - Extensão dos danos causados por <i>A. alternata</i> em mudas da variedade Feltrin 7 dias após inoculação. Os quadros em vermelho destacam as mudas que morreram (3 de 30).	42
Figura 15 - SDS-PAGE do extrato proteico das folhas da variedade Tainung. Bandas variando de 225 a 12 kDa. M – Marcador de peso molecular, I – amostras inoculadas, C – Amostras controle.	45

Figura 16 - SDS-PAGE do extrato proteico das folhas da variedade Feltrin. Bandas variando de 12 a 225 kDa. M – Marcador de peso molecular, I – amostras inoculadas, C – Amostras controle.45

Figura 17 - 1º Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Tainung. Os quadros em vermelho evidenciam bandas identificadas como diferencialmente expressas. M – Marcador de peso molecular; C – amostras controle; I – amostras inoculadas; 1- Banda presente no grupo controle; 2- Banda ausente no grupo inoculado; 3 – Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 4 – Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado; 5 - Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 6 - Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado.46

Figura 18 - 2º Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Tainung. Os quadros em vermelho evidenciam bandas identificadas como diferencialmente expressas. M – Marcador de peso molecular; C – amostras controle; I – amostras inoculadas; 1- Banda presente no grupo controle; 2- Banda ausente no grupo inoculado; 3 – Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 4 – Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado; 5 - Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 6 - Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado.47

Figura 19 - 1º Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Feltrin. M – Marcador de peso molecular; C – amostras controle; I – amostras inoculadas.49

Figura 20 - 2º Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Feltrin.50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Absorbância e concentração dos extratos proteicos da variedade Tainung obtidas em espectrofotômetro. O código “Tc” significa amostras Tainung grupo Controle, e “Ti” significa amostras Tainung grupo inoculadas.43

Tabela 2 - Absorbância e concentração dos extratos proteicos da variedade Feltrin obtidas em espectrofotômetro. O código Fc significa amostras Feltrin grupo Controle, e Fi significa amostras Feltrin grupo inoculadas.43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AME	<i>Alternariol Methyl Ether</i>
AOH	Alternariol
BDA	Batata Dextrose Ágar
CIA	<i>Chloroform:Isoamyl Alcohol 24:1</i>
CTAB	<i>Cetyl TrimethylAmmonium Bromide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide TriPhosphate</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
HR	<i>Hypersensitive response</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS	<i>Iternal Transcribed Spacer</i>
PB	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RNAse	Ribonuclease
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPM	Rotações por Minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEA	<i>Tenuazonic Acid</i>
TSB	<i>Trypticasein Soy Broth</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
°C	Grau Celsius
®	Marca Registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 A CULTURA DO MAMÃO E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	18
2.2 <i>Alternaria alternata</i> E A INFECÇÃO NO MAMOEIRO	18
2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	20
2.4 <i>PRIMERS</i> GENE-ESPECÍFICOS	20
2.5 PROTEÔMICA	21
2.6 INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO E RESPOSTA CELULAR	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	26
4.2 ANÁLISE GENÔMICA	26
4.2.1 Coleta das amostras	26
4.2.2 Extração de DNA das folhas do mamoeiro	27
4.2.3 Quantificação do DNA	27
4.2.4 Identificação molecular com <i>primers</i> gene-específico	27
4.2.5 Obtenção das imagens e análises.	28
4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA	28
4.3.1 Preparo das amostras.	28
4.3.2 Inoculação das amostras	30
4.3.3 Extração das proteínas	31
4.3.4 Quantificação das proteínas pelo método Bradford	31
4.3.5 Separação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE	31
4.3.6 Imagens e análise dos dados	32

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 AVALIAÇÃO GENÔMICA	33
5.1.1 Extração de DNA.....	33
5.1.2 Diagnóstico molecular da presença de <i>A. alternata</i>.....	34
5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	38
5.2.1 Inoculação das amostras e verificação dos sintomas.....	38
5.2.2 Extração e quantificação das proteínas.....	43
5.2.3 SDS-PAGE	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O mamão (*Carica papaya L.*), pertencente à família Caricaceae, é uma das frutas tropicais mais cultivadas e consumidas no mundo, é uma excelente fonte de nutrientes, com diversas propriedades funcionais e digestiva, e por isso, bastante recomendada para ser introduzida na dieta humana (VIVAS *et al.*, 2015). A contribuição brasileira para a produção global de mamão anual, é de 1.517.696 toneladas (EMBRAPA, 2019). Os principais estados produtores brasileiros são Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Bahia, Ceará e Minas Gerais, respectivamente (IBGE, 2017), que fazem o Brasil atingir o patamar de segundo maior produtor e terceiro maior exportador mundial de mamão (FAO, 2017).

Contudo, a expansão da cultura do mamão em termos de área cultivada e rendimento, apresenta sérias restrições sanitárias devido a existência de diversos fitopatógenos capazes de infectar o mamoeiro e seus frutos. Dentre os fitopatógenos de importância agrônômica no mamão, tem-se *Alternaria alternata*. Espécies do gênero *Alternaria* são conhecidos patógenos causadores de danos tanto no campo como no período pós-colheita, de frutos, leguminosas e cereais, resultando em grandes perdas econômicas na agricultura (GABRIEL *et al.*, 2017).

Os fenótipos de espécies de *Alternaria* são considerados de alta plasticidade morfológica, mostrando variações consideráveis sob diferentes ambientes e condições de cultivo, o que torna difícil a identificação baseada em características fenotípicas (ZHENG *et al.*, 2017). Os prejuízos causados por *A. alternata* e a dificuldade de identificação baseado na morfologia do fungo, tornam necessário um modo de diagnóstico rápido e sensível, que pode ser obtido a partir do uso de técnicas moleculares.

Os *primers* gene-específicos são ferramentas moleculares capazes de fazer a identificação de espécies fúngicas de forma robusta, segura e precisa, fornecendo resultados rápidos, quando comparados aos métodos tradicionais de identificação (MERGULHÃO *et al.*, 2014). A sequência destes *primers* é de extrema importância para a segurança do diagnóstico, quando é baseada em regiões conservadas, permitem a identificação de indivíduos em nível de espécie, e tem se mostrado bastante eficiente na identificação de diversos organismos. No gênero *Alternaria*, um alvo interessante para sequência do *primer* gene-específico é o gene Alt a 1, que apresenta regiões conservadas, e também sequências que divergem entre as diferentes espécies do gênero, tornando tal sequência ideal para o diagnóstico molecular de *Alternaria* spp. (PAVÓN *et al.*, 2010).

Além de métodos eficientes de identificação correta da espécie causadora de danos em uma cultura, é importante também, buscar métodos de contenção e remediação da doença causada. A aplicação direta de fungicidas tem sido a medida primária de controle de doenças foliares em campo. Todavia, o alto custo, os danos ambientais, a contaminação humana, e as barreiras comerciais no mercado da exportação que não aceitam resíduos de certos químicos agrícolas, são fatores que fazem com que seja necessário buscar alternativas de controle a patógenos (VIVAS *et al.*, 2015).

Atualmente, a estratégia mais sustentável e comercialmente atrativa para prevenção de perdas econômicas em várias culturas, é o desenvolvimento de variedades resistentes. Plantas geneticamente melhoradas têm sido produzidas em várias espécies de importância agrônômica para serem resistentes a herbicidas, insetos, doenças, etc. (GABRIEL *et al.*, 2017).

Análises proteômicas podem ser utilizadas para esclarecer mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade, fornecendo alvos para melhoramento de características de plantas comercialmente importantes, como por exemplo, indução de moléculas que dificultem o estabelecimento e a progressão da infecção, facilitando assim, a mediação da resistência vegetal. Estudos preliminares para a obtenção de espécies resistentes a adversidades bióticas, como fitopatógenos de origem fúngica, requerem um profundo conhecimento da interação planta-patógeno, desde o modo de infecção até as respostas moleculares desencadeadas pelo fungo no hospedeiro em diferentes estágios da patologia (SINHA; CHATTOPADHYAY, 2011).

A abordagem proteômica permite a revelação de alterações no padrão de expressão proteica em resposta a invasão fúngica, e o estudo dos fatores relacionados a essa expressão diferencial. A identificação de moléculas que tem sua expressão alterada na presença do fungo, são de extrema importância na identificação dos alvos com potencial para atribuir características melhoradas a planta (SHARMA *et al.*, 2007).

Dentre as ferramentas proteômicas capazes de identificar diferenças a nível de expressão proteica, uma das mais usadas é a SDS-PAGE, uma técnica baseada na separação de proteínas a partir de seu peso molecular, pela ação de um campo elétrico (MADROÑERO, 2014). A identificação de *spots* diferencialmente expressos em amostras controle e inoculada permitem a especulação de proteínas com expressão afetada pela presença de *A. Alternata*.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi fazer um diagnóstico molecular rápido e eficiente da presença do fungo *A. alternata* em cultivos de mamão, e investigar as proteínas diferencialmente expressas na folha do mamão sadio, em comparação com folhas infectadas

pelo fungo *A. alternata*, a partir de ferramentas baseadas na proteômica. Esse é o primeiro relato de diagnóstico molecular do fungo *A. alternata* sem a necessidade de cultivo fúngico, e também, do perfil proteico para identificação de produtos expressos na planta em resposta a infecção pelo mesmo fungo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MAMÃO E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma das frutas de grande importância nacional, devido ao seu alto valor nutricional e medicinal, e principalmente, devido à alta produção gerada no país (EMBRAPA, 2019). É um fruto amplamente cultivado e consumido, rico em vitaminas A e C, niacina, riboflavina, ferro, cálcio, e fibras, sendo considerado um fruto altamente nutricional. Além de alimento, o mamão serve também como fonte de moléculas tais como papaína e quimopapaína, utilizadas na indústria farmacêutica na composição de medicamentos, e na indústria alimentícia para amaciar carnes. Outras partes da planta como folha e raiz apresentam ainda aplicações medicinais (HUERTA-OCAMPO *et al.*, 2012). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão, com uma produção de 1.517.696 t/ano, situando-se entre os principais países exportadores, principalmente para o mercado europeu (EMBRAPA, 2019).

Na região Nordeste, que é responsável por 59% de toda produção de mamão nacional (EMBRAPA, 2018), a cultura do mamoeiro contribui expressivamente nos aspectos econômicos e sociais, pois é uma cultura que necessita de renovação dos pomares de 3 em 3 anos, e que produz o ano inteiro, gerando empregos e absorvendo mão-de-obra durante todo o ano (SÁ *et al.*, 2013).

Dentre as características principais do cultivo do mamoeiro, destacam-se a grande densidade de plantas por hectare, seu rápido desenvolvimento e propagação, e uma alta produtividade anual. Entretanto, esta produtividade pode ser afetada por vários fatores, dentre eles, fatores edafoclimáticos, genéticos, e biológicos, que incluem um grande número de pragas e doenças. Durante o seu ciclo reprodutivo, o mamoeiro é suscetível a inúmeras doenças de etiologia fúngica; o oídio (*Streptopodium caricae*), a pinta-preta (*Asperisporium caricae*), a mancha-de-phoma (*Stagonosporopsis caricae*) e a mancha de alternaria (*Alternaria alternata*) são exemplos de doenças responsáveis por perdas econômicas dessa cultura (VIVAS *et al.*, 2013).

2.2 *Alternaria alternata* E A INFECÇÃO NO MAMOEIRO

Fitopatógenos de origem fúngica são capazes de causar os sintomas mais severos e as maiores perdas no rendimento de várias culturas de interesse agrônômico (ALI *et al.*, 2018). Fungos do gênero *Alternaria* são reconhecidos como espécies fitopatogênicas capazes de causar danos tanto no campo como no período pós-colheita em frutas, leguminosas e cereais (GABRIEL *et al.*, 2017).

A espécie *Alternaria alternata* é considerada ubíqua na natureza, um importante saprófago, que atua na decomposição de matéria orgânica, um patógeno oportunista humano, além de um fitopatógeno, capaz de infectar mais de 100 espécies vegetais (SICILIANO *et al.*, 2018), tais como: tomate, melão, pepino, pimenta, frutas cítricas, maçã, mamão, e outros (GABRIEL *et al.*, 2017). Sua capacidade parasitária está relacionada com sua habilidade de sintetizar toxinas, que podem ser do tipo inespecíficas, ou altamente específicas a um único hospedeiro (CHO, 2015). Algumas dessas toxinas são ainda moléculas alérgicas, capazes de afetar a saúde humana, especialmente em indivíduos com dificuldades respiratórias. Entre as toxinas produzidas por *A. alternata*, tem-se o Alt a 1, uma proteína específica, exclusiva do gênero, e por isso, um importante marcador filogenético (GABRIEL *et al.*, 2017), o alternariol (AOH), alternariol *methyl ether* (AME) e ácido tenuazoico (Tea), que são responsáveis por deterioração extensiva em folhas e frutos (PAVÓN *et al.*, 2010). Tais toxinas tem sido encontrada ainda estáveis em produtos vegetais naturais e também industrializados, como sucos, molhos, extratos concentrados e outros, sendo, portanto, resistentes a altas temperaturas e processos industriais (MEENA *et al.*, 2016).

No mamoeiro, os sintomas apresentados pela infecção por *A. alternata* são o surgimento de lesões ovais, de coloração negra na superfície do fruto, que podem progredir para podridão interna (DANTAS, 2016). Já nas folhas, os sintomas se caracterizam pelo aspecto de queima nas extremidades, progredindo ao longo da folha, podendo chegar até as nervuras e pecíolos, levando ao decaimento foliar. As folhas sintomáticas sofrem senescência mais rapidamente que as sadias (VIANA *et al.*, 2011).

As infecções de *A. alternata* podem ser controladas com fungicidas sintéticos, porém eles não têm eficiência elevada e são capazes de desenvolver no fungo resistência ao fungicida, induzindo seu uso em maior quantidade, e trazendo maiores riscos para a população consumidora do produto vegetal. Além disso, o uso de químicos agrícolas e os resíduos que eles deixam no alimento tem sido uma preocupação cada vez mais presente na sociedade, capaz de diminuir o valor de mercado do produto, principalmente no exterior (YUAN *et al.*, 2019).

Quanto as características morfológicas, é um fungo que apresenta conídios em forma de clava ou pêra invertidos, presença de septos transversais longitudinais ou oblíquos. As colônias são geralmente difusas, cinza a marrom escuras, ou com tonalidades verde oliva, o que dá a *Alternaria* uma elevada resistência a altas temperaturas e desidratação. (BELANI, 2010). Estas características morfofisiológicas têm sido responsáveis pela identificação dos fungos da espécie *Alternaria alternata*, porém devido à sua plasticidade morfológica, tanto o isolamento como a identificação das cepas é bastante difícil (ROTONDO *et al.*, 2012).

2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A correta identificação de fungos do gênero *Alternaria* é de grande importância para a fitopatologia. Muitas abordagens têm sido utilizadas para investigar a identidade de isolados de *Alternaria*, mostrando que as condições de cultivo podem influenciar bastante na morfologia do conídio, que é uma das principais características na avaliação morfofisiológica. A alta plasticidade verificada em algumas espécies do gênero e a grande quantidade de tempo dispendido para fazer uma identificação morfológica, faz com que a identificação molecular seja a mais adequada (SICILIANO *et al.*, 2018).

Análises em nível de DNA (*Deoxyribonucleic acid*) são capazes de esclarecer a identidade de espécies, a variabilidade intraespecífica de isolados e as relações filogenéticas entre eles. Tais análises são consideradas métodos seguros rápidos e eficientes na investigação de identidade de organismos (MERGULHÃO *et al.*, 2014). Esse campo de estudo tem ganhado bastante espaço nas últimas décadas, gerando um grande volume de informações, principalmente pelo uso de ferramentas como os marcadores moleculares. A detecção de espécies por meio de técnicas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem servido para aumentar a confiança nos diagnósticos de presença de organismos em variados ambientes (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.4 PRIMERS GENE-ESPECÍFICOS

A técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) permite, a partir do uso de *primers* gene-específicos, confirmar infecção microbiológica em tecidos vegetais na presença ou não de sintomas na planta. Esta técnica molecular oferece a possibilidade de uma

identificação correta e precoce de contaminação por *A. alternata*, podendo ser capaz de evitar perdas econômicas se utilizada corretamente (SINHA *et al.*, 2013).

Os *primers* são sequências curtas de DNA, desenhados com base em fragmentos da sequência genômica do organismo que se quer identificar. A especificidade do *primer* utilizado garante o sucesso na identificação do indivíduo. O gene Alt a 1 codifica a toxina alérgica termo-estável de mesmo nome, produzida pela espécie *A. alternata*, com 28 kDa, que se dissocia em duas subunidades de 14,5 e 16 kDa, sob condições redutoras. Sua função no fungo até o momento não é bem esclarecida, porém, há indícios de que tem relação com virulência e patogenicidade (GÓMEZ-CASADO *et al.*, 2014). Outras espécies do gênero *Alternaria* possuem genes homólogos ao Alt a 1. Como já mencionado anteriormente, a especificidade e exclusividade do alvo molecular do *primer* é crucial para um diagnóstico preciso. Comparações entre homólogos de Alt a 1 em diferentes espécies de *Alternaria*, têm revelado mais sequências divergentes do que comparações com outras regiões gênicas conservadas, como as regiões ITS, regiões de subunidades mitocondriais (mt SSU), e outras regiões gênicas usadas em trabalhos de identificação de espécies, tornando a sequência do gene Alt a 1 a mais adequada para o diagnóstico molecular de *Alternaria* spp. (PAVÓN *et al.*, 2010). Desse modo, *primers* baseados na sequência do gene Alt a 1 foram escolhidos como ferramenta para realização do diagnóstico molecular da espécie.

2.5 PROTEÔMICA

Proteínas são as moléculas efetoras primárias que realizam a maioria das funções celulares em organismos vivos, assim, qualquer resposta a mudanças ambientais, condições fisiológicas ou patológicas são refletidas por alterações na atividade ou concentração de proteínas (SINHA *et al.*, 2013). Metodologias que permitem análises qualitativa e quantitativa do padrão de acúmulo de proteínas estabelecem relações entre modificações a nível molecular e seus efeitos fenotípicos em células e organismos. Sendo essa a base de estudos da proteômica (SOARES *et al.*, 2017).

A proteômica é uma ferramenta importante para descrever as proteínas totais em diferentes condições biológicas, é caracterizada por quatro etapas principais: acondicionamento da amostra (coleta, armazenamento e disponibilização das proteínas); preparo da amostra (extração, concentração, purificação e armazenamento); métodos de

separação e quantificação; e identificação das proteínas via espectrometria de massas (SOARES *et al.*, 2017).

A partir da proteômica, é possível estudar o proteoma de organismos. O proteoma pode ser definido como o conjunto de todas as proteínas codificadas pelo genoma em um determinado momento metabólico. O proteoma é altamente dinâmico e dependente do estado atual da célula, mudando em resposta a qualquer alteração no seu ambiente (NOGUEIRA, 2010), sejam alterações causadas por mudanças físicas, como alteração do clima, ou mudanças biológicas, como doenças causadas por organismos patogênicos.

A obtenção do extrato proteico de boa qualidade é crítica na produção de resultados robustos, que forneçam informações confiáveis permitindo uma análise eficiente. Dentre as metodologias testadas descritas na literatura, a extração fenólica tem mostrado melhores resultados. O método de separação do extrato proteico pode ser feito a partir da técnica de SDS-PAGE, que faz essa separação de acordo com a massa molecular e a mobilidade eletroforética das amostras, na qual as proteínas menores irão migrar mais rápido que as proteínas maiores. Após a obtenção dos géis de separação, as proteínas podem ser visualizadas através da utilização de corantes como *comassie brilliant blue* (CBB), prata ou fluorescência (NOGUEIRA, 2010).

A proteômica tem progredido bastante na última década. É considerada uma ferramenta de alto rendimento, capaz de acessar a base molecular de muitos processos biológicos, incluindo resposta vegetal a diferentes estresses, sejam eles bióticos ou abióticos (TAKÁČ; ĽAMAJOVÁ; ĽAMAJ, 2017). Um dos estresses bióticos comumente enfrentados por plantas é a invasão por patógenos (SUPIAN *et al.*, 2017), que podem induzir a expressão de proteínas relacionadas ao desenvolvimento dos sintomas característicos da patogenia, ou relacionadas ao combate ao patógeno, caracterizando a planta como resistente (YU *et al.*, 2017).

Independente do estímulo gerado por essa invasão, a resposta vegetal geralmente é desencadeada em nível de gene e proteína (SUPIAN *et al.*, 2017), por isso é importante se fazer além de avaliações genômicas, avaliações proteicas no estudo da interação planta-patógeno.

2.6 INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO E RESPOSTA CELULAR

Organismos vegetais são constantemente atacados por vários micro-organismos patogênicos, os quais são capazes de comprometer a sobrevivência da planta, e/ou a qualidade física do vegetal e seus produtos. As plantas possuem dois principais mecanismos de defesa contra esses patógenos: imunidade molecular desencadeada por moléculas associadas a patógenos, onde a planta é capaz de reconhecer moléculas comuns associadas a patógenos através de receptores de reconhecimento padrão; e imunidade desencadeada efetora, onde a planta reconhece proteínas secretadas pelo patógeno através de receptores de resistência (ALI *et al.*, 2018).

A interação planta-patógeno pode ocorrer de duas formas básicas: incompatível (grande maioria dos casos), quando ocorre uma infecção local seguido do confinamento e eliminação do patógeno, sem que haja uma infecção sistêmica ou maiores prejuízos ao hospedeiro (resistente ao patógeno); ou compatível, quando o patógeno obtém sucesso no processo infeccioso do hospedeiro (susceptível). A ativação dos receptores vegetais pode causar alterações em nível genômico, como metilação de histonas (proteínas que compõem o nucleossomo e estão envolvidas na condensação/descondensação das fitas de DNA, atuando na regulação gênica), modificação na cromatina, ativação de genes relacionados a imunidade, e consequentemente, a nível proteômico, promovendo uma modificação nos padrões de acúmulo de proteínas (SOARES *et al.*, 2017).

Dentre as proteínas de defesa vegetal, as mais estudadas são as proteínas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), proteínas de ligação cruzada a parede vegetal, proteínas associadas a atividades antimicrobianas, como fitoalexinas, e proteínas relacionadas a patógenos (proteínas PR) (ALI *et al.*, 2018). Os patógenos têm ao longo da evolução desenvolvido diferentes estratégias para superar o sistema de defesa das plantas. A *A. alternata* por exemplo, produz toxinas hospedeiro-seletivas capazes de matar as células do hospedeiro antes mesmo de conseguir invadi-lo e obter seus nutrientes (GAI *et al.*, 2019).

O ácido tenuazóico é uma dessas toxinas, sendo considerada a responsável pelo surgimento das manchas de *Alternaria* na superfície foliar. Toxinas e fitormônios podem interferir nos processos fisiológicos das plantas por diferentes modos de ação, afetando a integridade da biomembrana, alterando o balanço iônico, bloqueando vias de transferência de energia, induzindo apoptose, destruindo o citoesqueleto, alterando a expressão genética e induzindo morte celular (KANG *et al.*, 2017).

Proteínas em abundância na planta, como a RuBisCo (Ribulose- 1, 5-bifosfato carboxilase oxigenase) são também alvo de estudos em vegetais sob infecção por patógenos. A proteína RuBisCo catalisa a carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP), mediando a

fixação do dióxido de carbono da atmosfera em carbono orgânico durante a fotossíntese. Essa reação é de grande importância para a produção de toda biomassa vegetal (BHAT *et al.*, 2017).

A investigação das mudanças no proteoma acompanhadas pelas alterações ambientais, fornece informações valiosas sobre a resposta molecular específica que ocorre frente a um estresse biótico. Estresses causados por patógenos em plantas têm sido extensivamente estudados com base em ferramentas proteômicas na busca por uma melhor compreensão dos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem no hospedeiro (SHARMA *et al.*, 2007). A melhor compreensão destes eventos fornece ferramentas para o engenhieramento de plantas mais resistentes e produtivas.

3 OBJETIVOS

Diagnosticar de forma rápida a infecção de *A. alternata* em *C. papaya* e identificar *spots* de proteínas diferencialmente expressas em resposta à essa infecção.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o diagnóstico rápido da presença de *A. alternata*;
- Identificar *spots* diferencialmente acumulados em resposta à infecção de *Carica papaya* à *A. alternata*;
- Estabelecer o perfil proteômico de folhas de *C. papaya* sadias e infectadas por *A. alternata*;
- Discutir o papel das possíveis proteínas diferencialmente acumuladas no processo de interação *Alternaria*-Mamão, e sua relevância no fenômeno de resistência ao surgimento dos sintomas da queima de *Alternaria*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Biotecnologia Vegetal, e Fitopatologia II, e na casa de vegetação da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, localizado no município de Mossoró-RN.

4.2 ANÁLISE GENÔMICA

4.2.1 Coleta das amostras

Foram coletadas folhas de mamoeiros apresentando sintomas semelhantes aos descritos causados pela infecção do fungo *Alternaria alternata* em três fazendas, todas localizadas no estrado do Rio Grande do Norte. Estas fazendas foram identificadas como fazendas A, B e C.

As folhas foram selecionadas pela aparência com aspecto de “queima” (Figura 1), e foram retiradas de diferentes plantas ao longo das fazendas.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 1 - Folha de mamoeiro com sintoma de "queima" causado por *A. alternata*.

Após coletadas, as folhas foram transportadas ao laboratório de Biotecnologia, onde permaneceram em freezer até o momento da extração de DNA.

4.2.2 Extração de DNA das folhas do mamoeiro

A extração de DNA das folhas coletadas foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990) com modificações. As folhas foram maceradas em almofariz e pistilo na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. O material macerado foi transferido para microtubos Eppendorf de 1,5 mL onde foi adicionado o tampão de extração (CTAB 2%, EDTA 20mM, NaCl 1,4M, Tris-HCl 100mM pH 8,0, PVP 1% e β -mercaptoetanol 0,2%). As amostras foram aquecidas a 65°C em banho-maria, sendo homogeneizadas a cada 10 minutos, por um total de 30 minutos. Em seguida foram efetuadas duas lavagens com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Posteriormente, 2/3 de isopropanol gelado foi adicionado. Depois de 2 horas de repouso a -20°C, a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 10.000 rpm. Duas lavagens com álcool, 70% e 90% respectivamente, foram feitas. Depois de seco, o material foi ressuspense em água contendo 10 μ g/mL de RNase e aquecido a 37°C por 30 minutos. O material foi armazenado a -20°C.

4.2.3 Quantificação do DNA

A quantificação e a verificação da integridade do DNA extraído, foram realizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v), corado com brometo de etídeo, e visualizado em fotodocumentador de luz UV (Ultravioleta) AlphaImager® Mini. As amostras foram diluídas em água ultra-pura e padronizadas a concentração de 10 ng/ μ L.

4.2.4 Identificação molecular com *primers* gene-específicos

Os *primers* gene-específicos utilizados para identificação de *Alternaria alternata* são baseados na sequência do gene Alt a 1. O par AaltDA1a1 (CGCATCCTGCCCTGTCA)

/AinfIAlta1 (GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC) amplifica na referida espécie, um *amplicon* de 118 pares de base (pb). A temperatura de anelamento utilizada foi 50°C, e foi utilizado na concentração de 10 pmol (PAVÓN *et al.*, 2010).

Como controle positivo, foram utilizadas amostras do fungo identificado, isolado e cultivado, pelo Laboratório de Fitopatologia II da UFERSA. As amostras do controle positivo passaram pelos mesmo procedimentos e reações que as amostras teste.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20 µL. Cada mix de reação continha 10ng de DNA da amostra, 2mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 10 µM dos *primers* gene-específicos, e 1 U de Taq DNA polimerase. O programa da reação constou de: uma desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguida de 35 ciclos amplificações consistindo em 30 seg a 94°C para desnaturação, 30 seg 50°C para anelamento dos *primers* e 45 seg a 72°C para extensão do DNA. Uma extensão final a 72°C por 5 min foi realizada.

4.2.5 Obtenção das imagens e análises

Os produtos da PCR foram misturados com 2 µl de azul de bromofenol e analisados por eletroforese em gel de agarose 3%, contendo 1µg/ml de brometo de etídio. Foi realizada uma corrida eletroforética em TBE 1x a 90V por 70 min.

Em seguida o gel foi visualizado e fotografado em fotodocumentador com luz ultravioleta (UV) AlphaImager® Mini. O tamanho dos fragmentos foi comparado com marcador de peso molecular DNA Ladder Sinapse Inc de 100 pb, e analisado para obtenção dos resultados.

4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.3.1 Preparo das amostras

As amostras para análise proteica consistiram de mudas comerciais das variedades Tainung (Figura 2) e Feltrin (Figura 3). Elas foram obtidas com 30 dias após a semeadura, e após 45 dias aproximadamente, as mudas foram transferidas para recipientes contendo adubo Topstrato HT Hortaliças, e areia (1:2), onde permaneceram até o momento da inoculação, sendo regadas diariamente.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2 - Mudas comerciais da variedade Tainung.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3 - Mudas comerciais da variedade Feltrin, amostras na sementeira, e nos recipientes.

As amostras foram divididas em inoculadas e controle. Devido a necessidade de obter 250 mg de material por amostra, para uma extração bem sucedida das proteínas, cada amostra

foi formada pela junção das folhas de 3 plantas. Para cada variedade foram utilizadas 6 amostras inoculadas (18 plantas), e 3 amostras controle (9 plantas). O experimento foi realizado em duplicata.

4.3.2 Inoculação das amostras

O isolado fúngico da espécie *A. alternata* foi gentilmente cedido pelo pesquisador da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Agroindustrial Tropical, Francisco Marto Pinto Viana. As amostras foram obtidas e cultivadas em batata-dextrose-agar (BDA). O isolado foi renovado, e mantido a 28°C no Laboratório de Fitopatologia II.

Para inoculação, foi utilizada uma variação da metodologia descrita por Supian (2017). O isolado foi transferido para o meio caldo Soja Trypticaseína (TSB), e mantido a 25°C sob agitação por 7 dias. Nas folhas das mudas de mamão, foram feitas pequenas lesões com o auxílio de uma agulha estéril, nas lesões do grupo “inoculadas” foram colocadas gotas do meio TSB contendo o fungo homogeneizado crescido por sete dias, e nas lesões do grupo “controle” foram colocadas gotas do meio TSB estéril. As mudas foram mantidas em casa de vegetação sendo irrigadas manualmente durante sete dias. Após esse período, com o surgimento dos sintomas associados a queima de *Alternaria* (Figura 4), as folhas foram coletadas para posterior extração das proteínas.



Fonte: (VIANA et al., 2011)

Figura 4 - Aspectos das folhas com sintomas de queima de *Alternaria*.

4.3.3 Extração das proteínas

As proteínas foram extraídas segundo o método descrito por Rodrigues *et al.* (2012) com modificações. As folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, e pesadas para a obtenção de 250 mg de pó fino de material. Foi adicionado a cada amostra 0,8mL de Tampão Tris Phenol concentrado, pH 8,0, e 0,8mL de tampão SDS (Tris-HCl 0,1M pH 8,0, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, sacarose 30%, *phenylmethylsulfonyl fluoride* [PMSF] 1mM). As amostras foram vigorosamente agitadas por 10 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C. A camada superior resultante de fenol foi transferida para novos tubos. Três volumes de acetato de amônio 0,1M em metanol gelado foram utilizados para precipitação das proteínas. As amostras foram mantidas em repouso na presença dessa solução por 2h a -20°C, e posteriormente centrifugadas nas mesmas condições já descritas. Em seguida, o pellet foi lavado com a solução 0,1M de acetato de amônio em metanol gelado, e após, com solução de acetona 80% gelada. Na sequência, as amostras foram secas por 30 minutos em bomba a vácuo, adicionadas de tampão ureia/tiorureia 7M e 2M respectivamente. Depois de homogeneizadas, as amostras foram submetidas a sonicator Eco-Sonics duas vezes por 1 minuto. As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização da quantificação.

4.3.4 Quantificação das proteínas pelo método Bradford

A concentração dos extratos proteicos foi determinada pela metodologia segundo Bradford, (1976). Foi adicionado 10 μ l do extrato bruto, 90 μ l de água destilada, e 1 mL do reagente de Bradford. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220) a 595 nm. A solução padrão utilizada para o branco foi a água destilada. Os resultados obtidos de absorbância para cada amostra, foram plotados em uma curva de calibração obtida com leituras de diferentes concentrações da albumina bovina. Os dados de absorbância inseridos nessa curva são correlacionados com os dados das soluções padrões de albumina, determinando assim a concentração das amostras.

4.3.5 Separação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE

Amostras contendo entre 15 e 20 μ g do extrato de proteínas foram desnaturadas a 95°C por cinco minutos, em tampão de amostra (Tris HCl 1M pH 6,8; SDS 10%; glicerol 2%; azul de bromofenol). As amostras foram então aplicadas no gel de acrilamida, composto pelo *stacking* gel (gel de empilhamento) a 4% e pelo *main* gel (gel principal ou gel de separação) a 12,5%.

Para a eletroforese, foi utilizado o tampão de corrida Tris-Glicina (6,32g de tris-base, 3,99g de glicina, 1L de água destilada, 10mL de SDS 10%). As amostras correram inicialmente a voltagem de 100V enquanto as proteínas atravessavam o gel de empilhamento. No gel de separação, a voltagem foi ajustada para 120V. As bandas separadas foram visualizadas por coloração com *comassie brilliant blue* (CBB) R-250 (metanol 20%, ácido fosfórico 10%, sulfato de amônio 10%, *comassie blue* 0,12%). Os géis permaneceram na solução corante por no mínimo 24h, e então foram descorados com a solução descorante (ácido acético 10%, metanol 30%) por 4 a 5h, e depois deixados imersos em água destilada para melhor visualização das bandas (LAEMMLI, 1970).

4.3.6 Imagens e análise dos dados

As imagens dos géis foram obtidas usando a câmera fotográfica de 8 megapixels da marca Apple®. A detecção dos spots foi feita por comparação visual dos géis um a um, analisando bandas reprodutivas diferencialmente encontradas entre os grupos controle e inoculado.

A massa molecular das proteínas foi estimada por comparação com os padrões do marcador de peso molecular Amershan ECL Rainbow Marker, que contém uma mistura de proteínas individualmente coloridas de tamanho definido, variando de 225kDa a 12 kDa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO GENÔMICA

5.1.1 Extração de DNA

De cada fazenda foram coletadas 8 amostras de folhas sintomáticas, de onde foi extraído o DNA, e visualizado em gel de agarose a 1% para avaliação da integridade do mesmo (Figuras 5, 6 e 7).

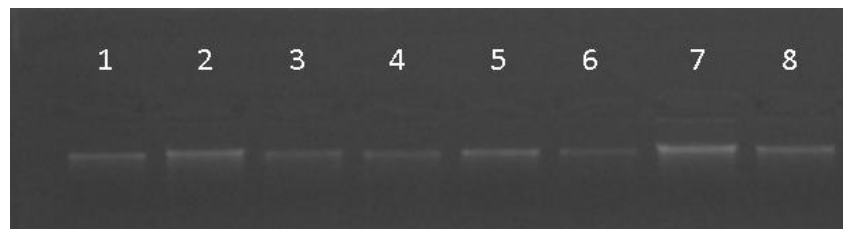


Figura 5 - DNA das amostras de folhas coletadas na Fazenda A



Figura 6 - DNA das amostras de folhas coletadas na Fazenda B

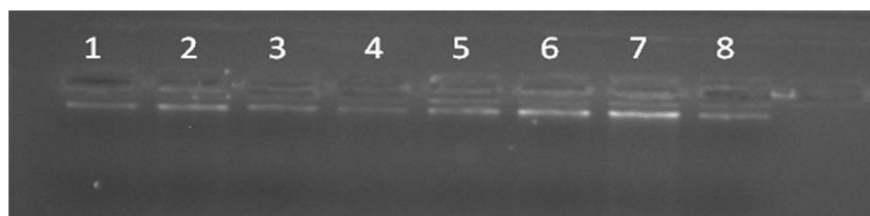


Figura 7 - DNA das amostras de folhas coletadas na Fazenda C

Pelas imagens apresentadas nas figuras anteriores, observou-se que nas Fazendas A e C, foi possível obter DNA de boa qualidade e em boa concentração, características essas evidenciadas pelas bandas nítidas, sem presença de arraste.

Já nas amostras de DNA oriundas da Fazenda B, percebe-se bandas muito claras, quase imperceptíveis (Figura 6). Tal fato pode ter sido ocasionado por problemas técnicos durante a realização da extração, problemas de acondicionamento, pois essa fazenda era mais distante e as folhas demoraram mais tempo para serem congeladas, ou ainda, pelo fato de a extração ter acontecido semanas após a coleta, e como se sabe, quanto mais fresco o material, melhor a qualidade das amostras para serem usadas em análises moleculares (FERES *et al.*, 2005).

5.1.2 Diagnóstico molecular da presença de *A. alternata*.

Nas três fazendas onde foram feitas as coletas de material vegetal para diagnóstico molecular da presença do fitopatógeno *A. alternata*, foi possível amplificar bandas de tamanho específico para tal espécie, como pode-se observar nas Figuras 8, 9, e 10. Pode-se afirmar, que este é um forte indicativo de presença do fungo nas áreas produtoras analisadas. O fungo é considerado presente, quando após amplificação com os *primers* gene-específicos AaltDAlta1/AinfIAIta1, há a presença de um *amplicon* de 118pb (PAVÓN *et al*, 2010).

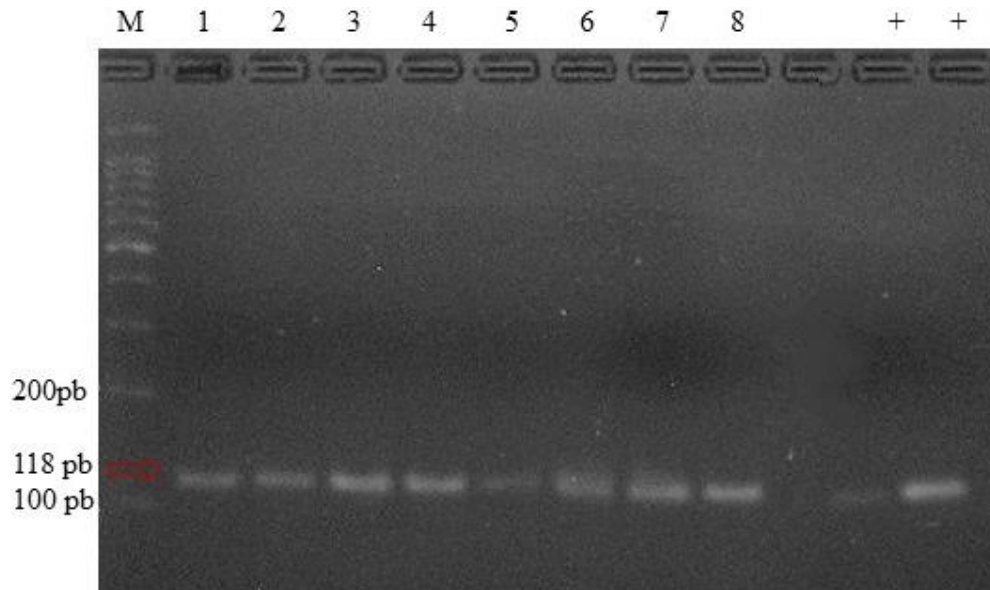


Figura 8 - PCR com *primer* gene-específico para a espécie *A. alternata* nas amostras 1 a 8 da Fazenda A. Tamanho esperado para amplificação quando há presença de *A. alternata*: 118pb. O sinal “+” se refere aos controles positivos utilizados (DNA de cepa isolada de *A. alternata*), “M” se refere ao marcador de peso molecular.

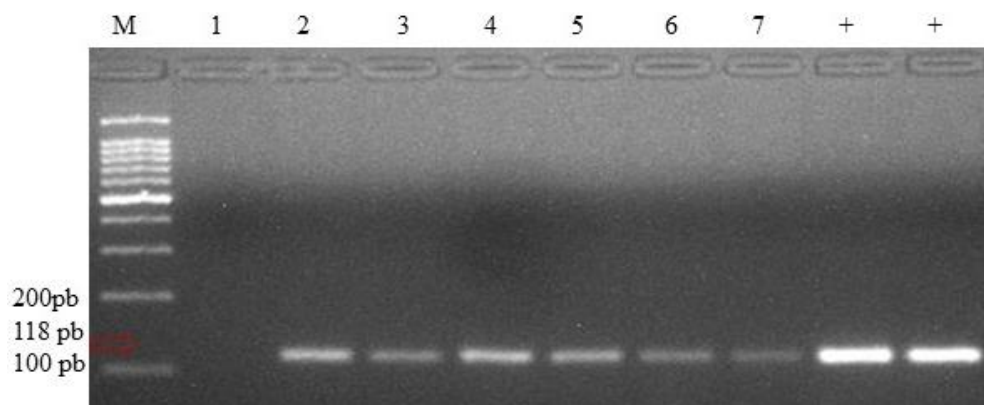


Figura 9 - PCR com *primer* gene-específico para a espécie *A. alternata* nas amostras 1 a 8 da Fazenda B. Tamanho esperado para amplificação quando há presença de *A. alternata*: 118pb. O sinal “+” se refere aos controles positivos utilizados (DNA de cepa isolada de *A. alternata*), “M” se refere ao marcador de peso molecular.

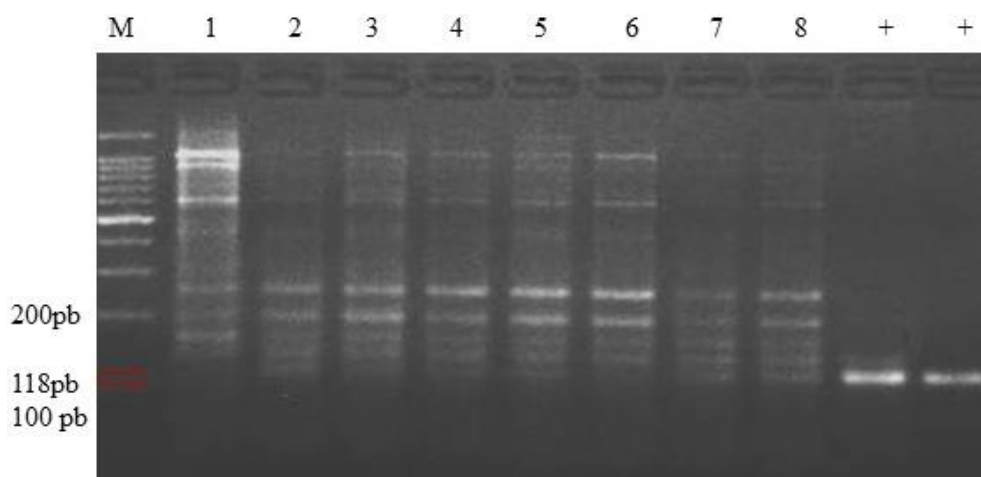


Figura 10 - PCR com *primer* gene-específico para a espécie *A. alternata* nas amostras 1 a 8 da Fazenda C. Tamanho esperado para amplificação quando há presença de *A. alternata*: 118pb. O sinal “+” se refere aos controles positivos utilizados (DNA de cepa isolada de *A. alternata*), “M” se refere ao marcador de peso molecular.

Na Figura 10, que corresponde a PCR realizada com DNA das amostras da Fazenda C, além da banda específica de 118pb, há também a presença de outras bandas inespecíficas. O mesmo resultado foi obtido após uma maior diluição das amostras, e aumento da temperatura de anelamento de 50°C para 55°C. Ferreira *et al.* (2011) sugerem que nesses casos o recomendado é remover e purificar a região do gel que contém a banda específica de tamanho esperado, e fazer o sequenciamento. De modo que o resultado não é invalidado pela presença das bandas inespecíficas, porém precisa ser investigado com o sequenciamento por exemplo.

Como os *primers* são os elementos responsáveis por guiar a síntese do DNA que resulta nas bandas vistas no gel, sugere-se que tal resultado foi observado devido a problemas no anelamento do *primer* à amostra. O fato de os controles positivos terem mostrado apenas as bandas adequadas ao tamanho esperado, leva a conclusão de que provavelmente as amostras da Fazenda C possuíam impurezas, gerando o resultado visto na Figura 10. Tais impurezas podem ser resultado de problemas na qualidade do DNA extraído, dificultando que o anelamento acontecesse de maneira correta. Requerendo assim, trabalhos de otimização para obtenção de amostras de melhor qualidade.

A confiança desse diagnóstico se dá pela especificidade dos *primers* escolhidos, tendo eles sido baseados na sequência do gene Alt a 1, pois essa sequência apresenta um alto nível de diferenciação entre espécies do gênero *Alternaria* (PAVÓN *et al.*, 2010).

A utilização de *primers* gene-específicos na identificação de *A. alternata* é encontrada

em diversos trabalhos que estudam esse patógeno, alguns pesquisadores optam por utilizar *primers* baseados em sequências conservadas evolutivamente, como regiões ITS, e outros se baseiam em sequências exclusivas do organismo (PAVÓN et al., 2012, ZHENG et al., 2017).

Zheng, (2017), confirmou a presença de *A. alternata* infectando trigo pela utilização dos *primers* baseados nas regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*), GAPDH (Glyceraldephide-3-phosphate dehydrogenase) e RPB2 (Segunda subunidade da RNA polimerase II). O autor justifica a utilização desse conjunto de *primers* pois a região de DNA ribossomal ITS apesar de ser considerada um marcador universal, não é tão eficiente na distinção de espécies fúngicas estreitamente relacionadas.

Da mesma forma, Mashima *et al.* (2018) ratifica a informação de que análises taxonômicas baseadas na região ribossomal 16S não é totalmente confiável para a distinção entre organismos proximamente relacionados, devido à alta similaridade das sequências conservadas dentro de organismos pertencentes a espécies do mesmo gênero. Sendo mais adequado utilizar genes exclusivos do gênero de interesse, que mostram um maior poder discriminatório entre organismos de diferentes espécies, mesmo quando pertencentes ao mesmo gênero.

O gene Alt a 1, codifica a proteína de mesmo nome, exclusiva a um restrito número de espécies de *Alternaria*. É considerado um importante marcador filogenético e tem sido usado em vários estudos de identificação. A presença desse gene detectado por PCR utilizando o *primer* gene-específico, é um indicador direto de contaminação fúngica, de qualidade alimentar, e de segurança para consumo humano, uma vez que essa proteína é também considerada um importante alérgeno humano (GABRIEL *et al.*, 2017).

Como esse é o primeiro relato de presença do fitopatógeno *A. alternata* encontrado em fazendas de mamão no Rio Grande no Norte, não foi possível encontrar estudos para corroborar essa informação. Porém, a amplificação utilizando o par de *primer* AaltDAlta1/AinflAlta1 nas amostras vegetais, resultou em fragmentos de 118 pares de bases, sendo exatamente esse o tamanho esperado do *amplicon* após reação com o *primer* baseado na sequência do gene Alt a 1. Desse modo, conclui-se que foram encontradas plantas infectadas pelo fitopatógeno *A. alternata* em todas as três fazendas analisadas.

5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

5.2.1 Inoculação das amostras e verificação dos sintomas

Uma semana após as amostras serem inoculadas, as folhas foram avaliadas a fim de verificar o surgimento ou não dos sintomas, para que as amostras seguissem para a etapa de extração proteica.

As plantas inoculadas com o fungo *A. alternata* começaram a mostrar sintomas de “queima” nas extremidades das folhas três a quatro dias após a inoculação. Tais sintomas foram os mesmos encontrados por Viana *et al.* (2011), que se caracterizaram por lesões na região da periferia do limbo, secando as pontas e posteriormente progredindo para o centro da folha. As amostras continuaram em observação até que se completasse sete dias.

Segundo Kang *et al.* (2017), o fungo *A. alternata* é capaz de causar lesões foliares rapidamente após a inoculação. Avaliando a infecção de *A. alternata* em *Ageratina adenophora*, estes autores observaram que em apenas 10h após a infecção, já houve surgimento de lesões, que afetavam diretamente a capacidade fotossintética da planta.

No presente estudo foi possível observar que as variedades Tainung e Feltrin tiveram respostas em intensidades diferentes frente a infecção por *A. Alternata*, como mostram as Figuras 11 e 12 respectivamente. Na variedade Tainung, as folhas das mudas ficaram mais despigmentadas e com lesões maiores, e muitas chegaram a morrer, provavelmente devido ao comprometimento da área foliar levando a redução da capacidade fotossintética da planta.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 11 - Aspecto das folhas 7 dias após a inoculação com *A. Alternata* na variedade Tainung. Destaque para a área da lesão e despigmentação foliar.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 12 - Aspecto das folhas 7 dias após a inoculação com *A. Alternata* na variedade Feltrin. Destaque para área da lesão.

Já as mudas da variedade Feltrin, apesar de mostrarem também os sintomas de queima, e de algumas mudas terem morrido, a extensão dos danos se deu em menor número, e de forma menos agressiva quando se compara as duas variedades, como é possível perceber nas Figuras 13 e 14.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 13 - Extensão dos danos causados por *A. alternata* em mudas da variedade Tainung 7 dias após inoculação. Os quadros em vermelho destacam as mudas que morreram (10 de 30).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 14 - Extensão dos danos causados por *A. alternata* em mudas da variedade Feltrin 7 dias após inoculação. Os quadros em vermelho destacam as mudas que morreram (3 de 30).

As lesões encontradas nas folhas das duas variedades, apesar de mostrarem intensidades diferentes, apresentam as mesmas características, tais como coloração variando do marrom ao amarelo, com margens irregulares na superfície das folhas, regiões de clorose, que progrediam e levavam a desfoliação e morte. Estas características também foram constatadas por vários trabalhos de avaliação dos danos foliares de *A. Alternata* em espécies como menta, grão de bico, laranja e outros, sendo consideradas como relativas a infecção em progresso (SINHA, CHATTOPADHYAY, 2011; GABRIEL *et al.*, 2017; GADHI *et al.*, 2018).

A infecção ocorreu de forma mais bem-sucedida na variedade Tainung. O maior número de mortes nessa variedade pode ser resultado de uma reação de hipersensibilidade (HR – *Hypersensitive response*) na planta, um mecanismo de defesa vegetal contra patógenos, que se caracteriza por necrose nos tecidos infectados, a fim de prevenir a disseminação nas células ao redor (MEENA *et al.*, 2016).

A maior susceptibilidade da variedade Tainung coincide com o resultado encontrado por Vivas *et al.* (2015), que fizeram testes com variedades obtidas de um banco de

germosplasma, avaliando a severidade de doenças fúngicas em mamão, entre elas doenças foliares. Neste estudo, foi percebido que a variedade Tainung mostrou sintomas mais severos do que a média de severidade das variedades testadas (50 genótipos) pela infecção do fitopatógeno foliar de mamão *Asperisporium caricae*, causador da mancha negra.

Estudos em diferentes genótipos são importantes pois quanto maior a variabilidade genotípica, maior o potencial para encontrar resistência a diferentes estresses (VIVAS *et al.*, 2015). O resultado encontrado no presente trabalho com os genótipos das variedades Tainung e Feltrin, sugerem que as mudas da variedade Feltrin são mais resistentes ao ataque por *A. Alternata*, por terem exibido uma sintomatologia mais leve. Desse modo, essa variedade se mostra mais promissora na obtenção de genótipos com resistência.

5.2.2 Extração e quantificação das proteínas

As Tabelas 1 e 2, mostram as concentrações dos extratos proteicos das amostras das variedades Tainung (Tabela 1) e Feltrin (Tabela 2) respectivamente.

Tabela 1 - Absorbância e concentração dos extratos proteicos da variedade Tainung obtidas em espectrofotômetro. O código “Tc” significa amostras Tainung grupo Controle, e “Ti” significa amostras Tainung grupo inoculadas.

Amostra	Absorbância	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Tc1	0,33	3,47
Tc2	0,31	3,19
Tc3	0,35	3,69
Ti1	0,28	2,69
Ti2	0,30	3,01
Ti3	0,28	2,69
Ti4	0,26	2,37
Ti5	0,29	2,92
Ti6	0,33	3,50

Tabela 2 - Absorbância e concentração dos extratos proteicos da variedade Feltrin obtidas em espectrofotômetro. O código Fc significa amostras Feltrin grupo Controle, e Fi significa amostras Feltrin grupo inoculadas.

Amostra	Absorbância	Concetração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Fc1	0,33	3,38

Fc2	0,33	3,11
Fc3	0,31	3,76
Fi1	0,32	3,23
Fi2	0,33	3,50
Fi3	0,31	3,14
Fi4	0,32	3,28
Fi5	0,33	3,45
Fi6	0,31	3,11

Nos extratos da variedade Tainung, foi obtido uma média de 3 μ g/ μ l de concentração proteica, e da variedade Feltrin, 3,3 μ g/ μ l. Foram obtidos 100 μ l de cada amostra, de modo que o rendimento proteico obtido com o protocolo de extração padronizado utilizado, foi de 1,2 e 1,32 mg de proteínas por grama de folha, respectivamente para as variedades Tainung e Feltrin.

Huerta-Ocampo (2012), e Nogueira (2010), ambos trabalhando com análise diferencial proteica de frutos de mamão em amadurecimento, obtiveram rendimentos de 1,48 mg/g e 1mg/g (mg de proteína por grama de folha) respectivamente. Já Sinha *et al.* (2013) trabalhando com menta, encontrou uma proporção em média de aproximadamente 3mg/g (mg de proteína por grama de folha).

O baixo rendimento proteico obtido quando se trabalha com mamão em relação a outras espécies, se dá devido à grande quantidade de carboidratos e fibras encontradas na espécie, o que dificulta a extração das proteínas (HUERTA-OCAMPO *et al.*, 2012).

5.2.3 SDS-PAGE

Os perfis proteômicos obtidos a partir dos extratos proteicos das plantas controle e inculada, das variedades Tainung e Feltrin, apresentaram bandas que variaram de 12 a 225 kDa aproximadamente, como é possível ver nas Figuras 15 e 16. Dois géis independentes foram analisados para cada tratamento.

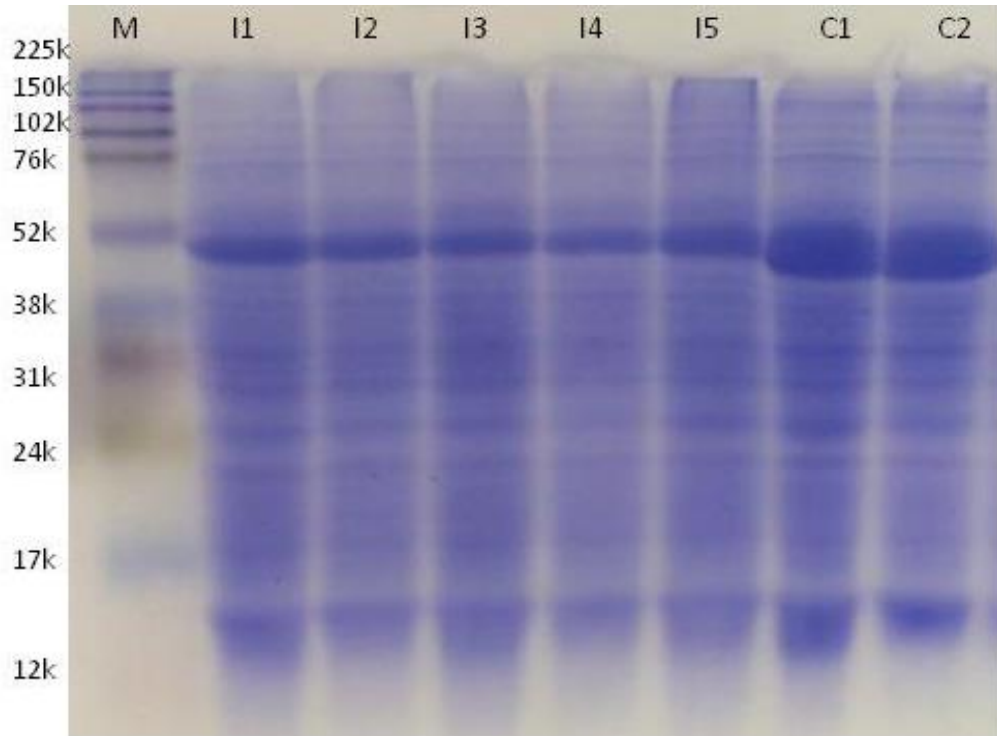


Figura 15 - SDS-PAGE do extrato proteico das folhas da variedade Tainung. Bandas variando de 225 a 12 kDa. M – Marcador de peso molecular, I – amostras inoculadas, C – Amostras controle.

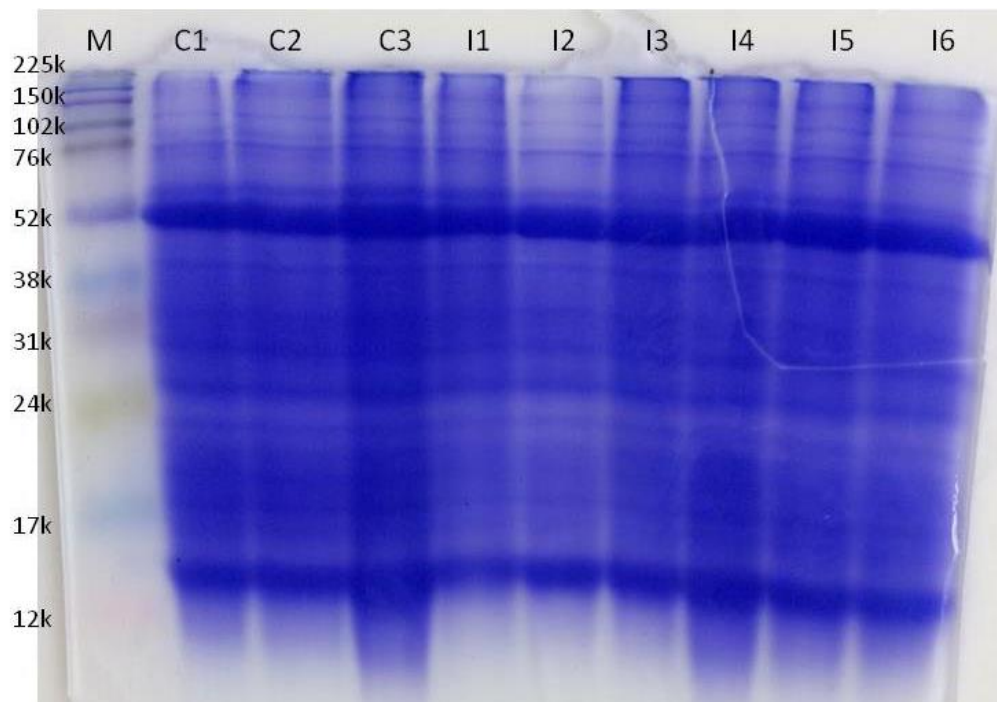


Figura 16 - SDS-PAGE do extrato proteico das folhas da variedade Feltrin. Bandas variando de 12 a 225 kDa. M – Marcador de peso molecular, I – amostras inoculadas, C – Amostras controle.

Na Figura 17, correspondente a variedade Tainung, é possível perceber que cada amostra do grupo controle apresentou 11 bandas, e do grupo inoculado, 10 bandas. Há uma banda de aproximadamente 200 kDa presente no grupo controle que se encontra ausente no grupo inoculado, e além disso, duas outras bandas que se encontram em maior concentração no grupo controle, quando comparado com o inoculado (diferencialmente expressa). Destes spots identificados, 14,2% foram considerados diferencialmente expressos.

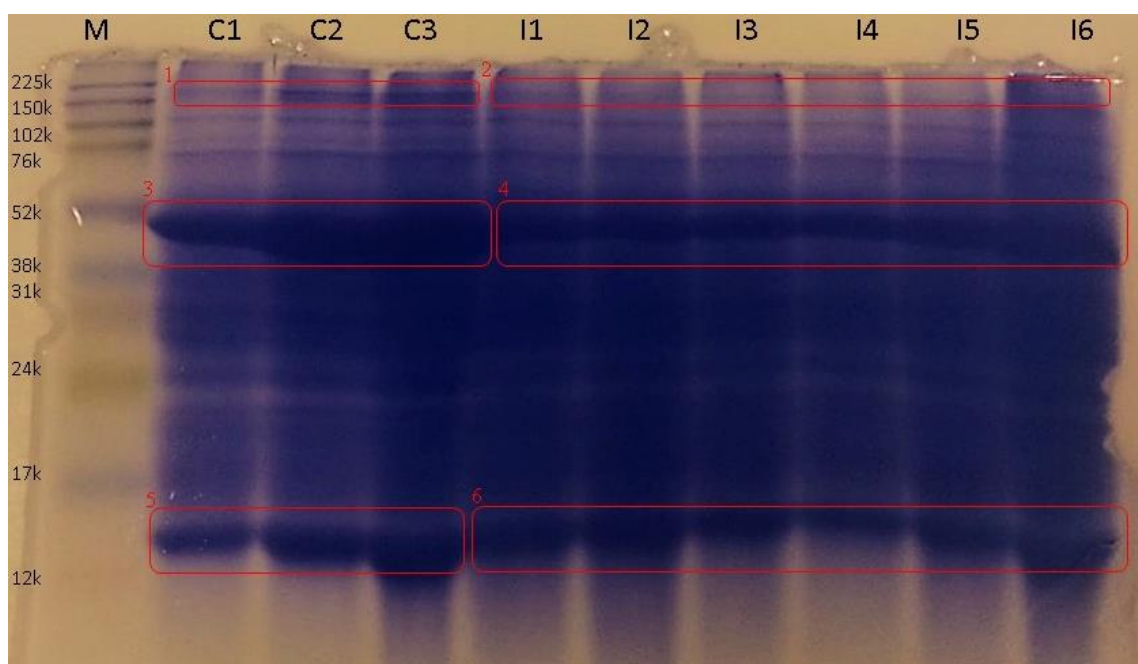


Figura 17 - 1º Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Tainung. Os quadros em vermelho evidenciam bandas identificadas como diferencialmente expressas. M – Marcador de peso molecular; C – amostras controle; I – amostras inoculadas; 1- Banda presente no grupo controle; 2- Banda ausente no grupo inoculado; 3 – Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 4 – Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado; 5 - Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 6 - Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado.

Huerta-Ocampo *et al.* (2012), trabalhando no estudo de proteínas diferencialmente expressas de mamão durante o amadurecimento, encontraram um total de 400 spots, onde destes, 27 foram identificados como diferencialmente expressos. O número de spots encontrado bem acima do relatado no presente trabalho, se dá devido a utilização da técnica de eletroforese bidimensional, que permite a separação não só por tamanho, mas também por ponto isoelétrico, o que favorece a identificação de mais spots (DORRI, 2018). Porém, apesar do maior número de bandas, a porcentagem das bandas diferencialmente expressas foi menor,

sendo apenas de 6,75%.

Percebe-se ainda, na Figura 18 da variedade Tainung, comparando-se as bandas dos grupos controle e inoculado, que as amostras controle tiveram uma expressão bem mais acentuada de duas bandas, nas posições próximas a 13 e 52 kDa. Em todas as amostras, foram observadas essa diferenciação entre os grupos. As posições dos spots identificados como diferencialmente expressos correspondem ao tamanho esperado para a enzima Ribulose bifosfato carboxilase (RuBisCo), que quando analisada em condições desnaturantes, é visualizada na forma de subunidade maior e menor, com peso molecular de 52kDa e 13 kDa respectivamente (SILVA; SOUZA, 2009). Todos os spots identificados neste estudo foram consistentemente detectados na replicata do gel.

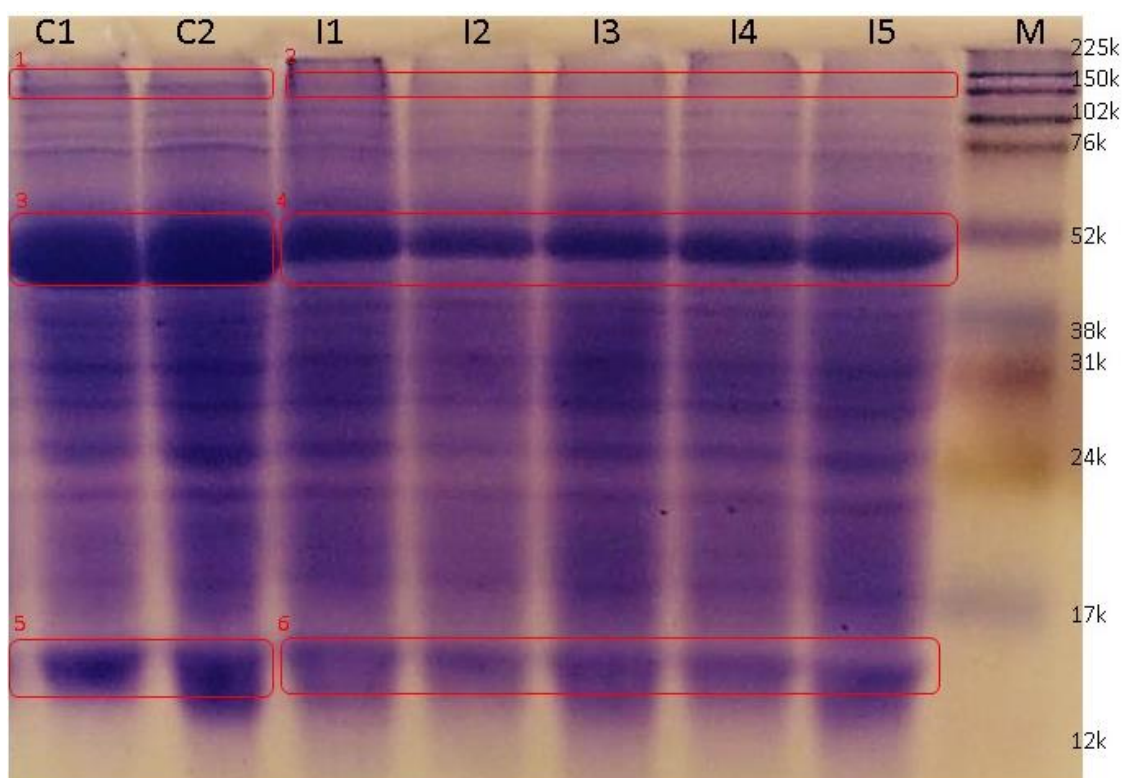


Figura 18 - 2º Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Tainung. Os quadros em vermelho evidenciam bandas identificadas como diferencialmente expressas. M – Marcador de peso molecular; C – amostras controle; I – amostras inoculadas; 1- Banda presente no grupo controle; 2- Banda ausente no grupo inoculado; 3 – Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 4 – Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado; 5 - Banda expressa em maior intensidade no grupo controle; 6 - Banda expressa em menor intensidade no grupo inoculado.

Kang *et al.* (2017) relatam que muitas toxinas secretadas por patógenos usadas para

matar células vegetais e obter seus nutrientes, podem se ligar em diferentes alvos moleculares da planta e inibir a atividade de várias enzimas do hospedeiro afetando a biossíntese de metabólitos primários. A fitotoxina TeA (ácido tenuazóico) produzida por *A. alternata* é um inibidor natural do fotossistema II, que bloqueia o transporte de elétrons inibindo a atividade da ATPase e da ferredoxina NADP redutase no cloroplasto, levando a destruição celular e necrose foliar.

O TeA é considerado um fator de virulência chave no estabelecimento da infecção de *A. alternata* em seus hospedeiros. A inibição de vias metabólicas associadas a fotossíntese causada pela ação do TeA, pode ser considerada uma causa para a redução da expressão de proteínas como a RuBisCo, diretamente envolvida na obtenção de energia por processos fotossintéticos (KANG *et al.*, 2017). Como mencionado por Gómez-vidal *et al.* (2009), para combater a infecção e ativar os mecanismos de defesa vegetal, é necessária energia extra, a redução da expressão de RuBisCo pode causar uma depreciação no conteúdo energético celular produzido pela planta, impedindo que a mesma possa se defender. Tal hipótese necessita de mais testes para ser confirmada.

Sharma *et al.* (2007) em estudos com linhagens resistentes e susceptíveis de colza a *A. alternata*, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional, encontraram na linhagem mais susceptível, 23 *spots* diferencialmente expressos, sendo 4 deles com intensidade aumentada, e 19 com intensidade diminuída, estabelecendo uma tendência de redução no conteúdo proteico vegetal como resultado da infecção. A redução de expressão em *spot* proteico no grupo inoculado devido a infecção por *A. alternata*, corrobora ainda com os estudos de Sinha *et al.* (2013), que relataram uma redução quantitativa significativa de proteínas comparando extratos proteicos de folhas de menta sadias com folhas infectadas com *A. alternata*. Em seu estudo, Sinha *et al.* (2013) obtiveram uma redução de 50% do conteúdo proteico sendo expresso nas amostras inoculadas. Esses resultados vão de encontro com o apresentado neste trabalho, onde a infecção por *A. alternata* no mamão causou uma redução da expressão de certos *spots* em amostras inoculadas com o fungo.

Neste estudo, como não foi feita a análise por espectrometria de massas, não foi possível identificar o *spot* de aproximadamente 200 kDa, encontrado apenas nas amostras controle. Essa diferença na expressão pode estar relacionada a alteração em proteínas de defesa da planta, a fatores de transcrição e síntese proteicas, entre outros, já que são alvos conhecidos por serem afetados em condições de estresse (SINHA *et al.*, 2013).

Estes pontos diferencialmente expressos são os melhores candidatos a serem selecionados para identificação em espectrometria de massas com o objetivo de estabelecer suas identidades (SHARMA *et al.*, 2007). Esta variação encontrada, sugere uma alteração a nível proteômico causado em resposta a presença do fitopatógeno *A. alternata*, indicando que o fungo é capaz de inibir vias metabólicas do metabolismo primário da planta, como é o caso da enzima RuBisCo, que está diretamente ligada ao fotossistema de produção da biomassa e nutrientes vegetais, uma vez que é um determinante primário da capacidade fotossintética das plantas (SMITH *et al.*, 2019).

Já na variedade Feltrin, tanto nas amostras do grupo controle, como do grupo inoculado, foram encontradas 12 bandas em cada amostra. Não houve variação no número de bandas, e nem na intensidade com que as bandas foram expressas, como é possível ver na Figura 19.

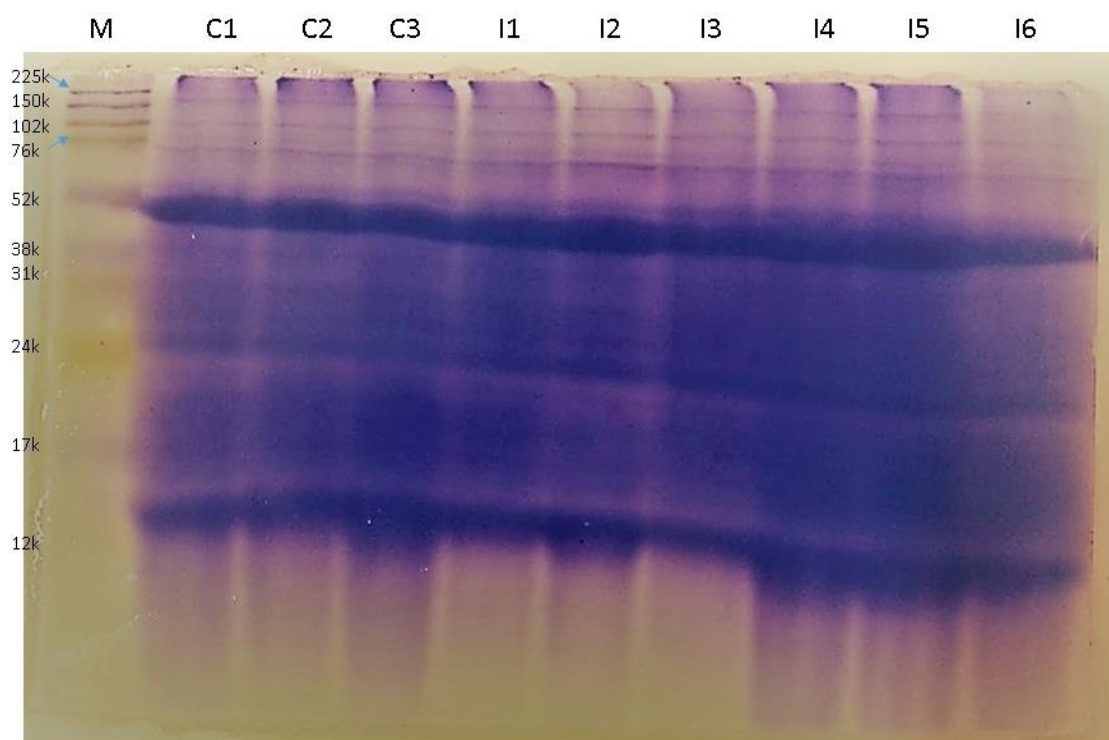


Figura 19 - 1º Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Feltrin. M – Marcador de peso molecular; C – amostras controle; I – amostras inoculadas.

Aparentemente, a variedade Feltrin se mostra mais resistente à infecção por *A. alternata* quando comparado com a variedade Tainung. Tanto a gravidade das lesões foi menor, como o número de mortes; e também, houve ausência de proteínas diferencialmente expressas no gel

de SDS, mostrado na Figura 20.

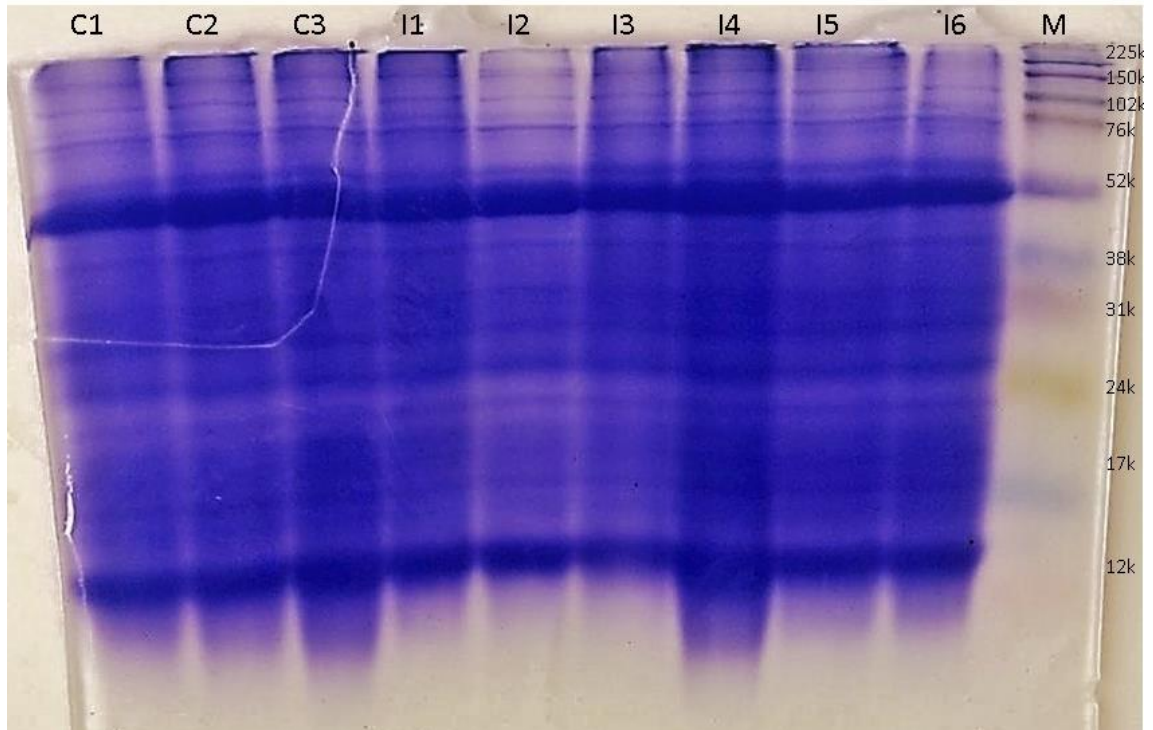


Figura 20 - 2° Gel SDS-PAGE do extrato proteico obtido a partir da variedade Feltrin. M – Marcador de peso molecular; C – amostras controle; I – amostras inoculadas.

As plantas podem se defender pela ativação de uma grande variedade de rotas metabólicas de resposta a infecções por patógenos. Estas rotas são capazes de ativar a expressão de genes que codificam um grupo de proteínas conhecidos como proteínas relacionadas a patógenos (proteínas PR), que induzem mecanismos capazes de amenizar estresses ambientais tanto de origem abiótica como biótica (GUO *et al.*, 2016). Apesar de não ter sido verificado no gel nenhuma alteração nos padrões de bandas entre os diferentes tratamentos, isso não significa que o fungo não foi capaz de induzir uma resposta na planta. Estudos mais aprofundados precisam ser feitos a fim de se encontrar a razão pela qual apesar de apresentar sintomas, com a técnica utilizada, não foi visto alteração proteômica.

Vários fitopatógenos, inclusive de diferentes espécies do gênero *Alternaria*, produzem proteases extracelulares capazes de degradar componentes da cutícula epidérmica vegetal, penetrando nas células dos organismos hospedeiros e estabelecendo a infecção. (CHANDRASEKARAN; SATHIYABAMA, 2013). Para o sucesso da infecção de *A.*

alternata em seus hospedeiros, é necessário que proteases produzidas pelo fungo causem danos na membrana celular, a fim de penetrar na célula, levando a indução de moléculas reativas de oxigênio que ativam diferentes vias de sinalização (MEENA et al., 2016). É possível que por motivos desconhecidos, a variedade Feltrin apresente uma cutícula mais resistente na superfície da folha, de modo que impeça a entrada e infecção do fungo, fazendo com que os sintomas não sejam desenvolvidos, ou sejam dificultados. O que explicaria ausência de alteração no padrão de expressão visto no gel de SDS dessa variedade (Figuras 19 e 20).

A ausência de expressão diferencial percebida, pode ainda ser resultado de limitações na metodologia utilizada. Em estudos proteômicos a preparação da amostra é de extrema importância. No gel obtido com as mudas da variedade Feltrin, apesar de ter mostrado uma boa concentração de proteínas, a análise do gel revelou um número pequeno de bandas e com mais arraste, o que pode indicar maior presença de contaminantes e impurezas, dificultando a visualização de bandas, e impedindo separação adequada para uma avaliação do padrão de bandas gerado (NOGUEIRA, 2010).

Correlacionando-se os dados da extensão dos danos causados nas variedades Tainung e Feltrin, com os perfis proteômicos obtidos dessas variedades, pode-se sugerir que a enzima RuBisCo esteja envolvida com os processos metabólicos associados ao surgimento dos sintomas causados pela infecção por *A. alternata*, uma vez que a variedade Tainung se mostrou mais susceptível, e apresentou uma redução da expressão da referida enzima quando inoculada com o patógeno *A. alternata*. A redução da concentração da enzima RuBisCo parece estar relacionada com a progressão das lesões foliares que acabam levando a planta a morte.

Soares *et al.* (2017) trabalhando com plantas de mamão infectadas pelo vírus PMEV (*Papaya Meleira Vírus*) relata uma drástica mudança nos padrões de acúmulo de proteínas nas plantas infectadas, proteínas estas que foram identificadas por espectrometria de massa, e revelaram ser, em sua maioria, relacionadas ao metabolismo de carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos, além de acúmulo de proteínas envolvidas em resposta a estresse, como moléculas ROS (Espécies reativas de oxigênio), sinalização, transporte e parede celular. Tal resultado confirma o relato de Sharma et al. (2007), que afirmam que proteínas com papéis importantes na mediação de tolerância aos patógenos, muitas vezes podem estar envolvidas em vias metabólicas primárias, como é o

caso da RuBisCo.

Estudos futuros utilizando outras ferramentas de análise, poderão permitir a obtenção de extratos proteicos a partir de diferentes métodos de extração, obtenção das imagens por diferentes corantes, obtenção de géis bidimensionais, ou ainda, sequenciamento em espectrômetro de massas, favorecendo a obtenção de mais bandas e de melhor qualidade, para uma avaliação e identificação mais precisa

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo possibilitou a realização de um diagnóstico molecular do fitopatógeno *A. alternata* sem a necessidade de cultivo fúngico, oferecendo assim resultados mais rápidos que as formas convencionais. A eficiência do método proposto para identificação molecular foi testada e confirmada com sucesso em folhas de mamão. Os resultados mostrados neste trabalho, sugerem que o teste baseado em PCR utilizando *primers* gene-específicos de *A. alternata*, compõe uma ferramenta sensível, simples e valiosa para verificar a ocorrência do fungo em áreas produtoras.

A análise genômica foi eficiente na detecção da contaminação do fungo *A. alternata* em três áreas produtoras do estado do Rio Grande do Norte. O método de detecção utilizado tem potencial para reduzir perdas econômicas na cadeia produtiva do mamão.

Neste estudo foi visto ainda uma maior susceptibilidade da variedade Tainung à infecção por *A. alternata*, de modo que se sugere então, a variedade Feltrin como mais promissora em futuros estudos de desenvolvimento de genótipos resistentes aos sintomas causados por *A. alternata*.

Além disso, foi possível fazer uma investigação inédita de proteínas potencialmente envolvidas na interação planta-patógeno da mancha de *Alternaria* em folhas de mamão. Dada a importância do cultivo e magnitude dos prejuízos causados pela infecção por *Alternaria*, somadas a inexistência de genótipo de *C. papaya* resistente à doença, a identificação das proteínas envolvidas na maquinaria de defesa da planta oferece um potencial biotecnológico promissor na construção de mamoeiros modificados para o aumento das proteínas de defesa específicas suprimidas pelo fungo.

Na análise proteômica apresentada neste trabalho, são fornecidos alvos moleculares potencialmente capazes de esclarecer mais sobre o processo infeccioso de *A. alternata* no mamão. Investigações mais direcionadas aos mecanismos de inibição utilizados pelo fungo para reduzir a expressão da enzima RuBisco, e possivelmente, do metabolismo energético, suprimindo as respostas imunes da planta podem fornecer medidas para reduzir os sintomas da infecção, ou ainda, formas de mediação de resistência a tais sintomas.

REFERÊNCIAS

- ALI, S. *et al.* Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**. [s.l.], v. 212, n. 213, p. 29-37. 2018.
- BELANI, A. M. M. **Levantamento, sobrevivência e controle de *Alternaria alternata* sementes de trigo**. 2010. 42 f. Tese (Doutorado) - Curso de Produção Vegetal, UESC, Lages. 2010.
- BHAT, J. Y. *et al.* Mechanism of Enzyme Repair by the AAA+ Chaperone Rubisco Activase. **Molecular Cell**, v. 67, p. 744-756. 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein tilizing the principle of proteindye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.
- CHANDRASEKARAN, M.; SATHIYABAMA, M. Production, partial purification and characterization of protease from a phytopathogenic fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer. **Journal Of Basic Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 8, p.763-774. 2013.
- CHO, Y. How the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola* Kills Plant Cells Remains an Enigma. **Eukaryotic Cell**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.335-344. 2015.
- DANTAS, A.M.M. **Controle alternativo de doenças pós-colheita em mamão formosa ‘Tainung 01’**. 2016. 66f. Dissertação (Mestrado) – Fitotecnia, UFERSA, Mossoró. 2016.
- DORRI, Y. Two-Dimensional Gel Electrophoresis: Vertical Isoelectric Focusing. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.291-302, 14 nov. 2018.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.
- EMBRAPA. **Produção Brasileira de mamão em 2017**. 2018. Disponível em: < http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/mamao/b1_mamao.pdf >. Acesso em: 09 jan. 2019
- EMBRAPA. **Mamão**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao> >. Acesso em: 09 jan. 2019.
- FAO. **FAOSTAT - Countries by commodity**, Rankings, 2017. Disponível em :<http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>. Acesso em: 24 jan. 2019.

FERES, F. *et al.* Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de Savanas Neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasileira de Botânica**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.277-283. 2005.

FERREIRA, Dennis C. *et al.* Identification of Herpesviruses Types 1 to 8 and Human Papillomavirus in Acute Apical Abscesses. **Journal Of Endodontics**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.10-16. 2011.

GABRIEL, M. F. *et al.* The major *Alternaria alternata* allergen, Alt a 1: A reliable and specific marker of fungal contamination in citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, Vitoria, v. 257, n. 18, p. 26-30. 2017.

GADHI, M. *et al.* In-vitro efficacy of bio-control agent and essential oils against leaf blight of chickpea caused by *Alternaria alternata*. **Acta Ecologica Sinica**. 2018.

GAI, I. *et al.* The methionine biosynthesis regulator AaMetR contributes to oxidative stress tolerance and virulence in *Alternaria alternata*. **Microbiological Research**, v.219, p. 94-109. 2019

GÓMEZ-CASADO, C. *et al.* Alt a 1 from *Alternaria* interacts with PR5 thaumatin-like proteins. **Febs Letters**, [s.l.], v. 588, n. 9, p.1501-1508. 2014.

GÓMEZ-VIDAL, S. *et al.* Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 30, n. 17, p.2996-3005. 2009

GUO J. *et al.* Expression of the LePR5 gene from cherry tomato fruit induced by *Cryptococcus laurentii* and the analysis of LePR5 protein antifungal activity. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 337-344. 2016

HUERTA-OCAMPO, J. A. *et al.* Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. **Journal of Proteomics**, [s.l.], v. 75, p. 2160-2169. 2012.

IBGE. **Censo agro 2017**, 2017. Maiores produções de Mamão // Brasil. Disponível em : <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?loalidade=0&tema=76343>. Acesso em 24/01/2019.

KANG, Y. *et al.* TeA is a key virulence factor for *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler infection of its host. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 73-82. 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-686, 1970.

MADROÑERO, L. J. **Análise transcriptômica da interação mamoeiro-papaya Meleira Virus**. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

MASHIMA, I. *et al.* Establishment of a species-specific primer pair for detecting *Veillonella infantium* based on the 70 kDa heat shock protein gene dnaK. **Anaerobe**, v. 52, p. 79-82. 2018.

MEENA, M. *et al.* Comparative Evaluation of Biochemical Changes in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Infected by *Alternaria alternata* and Its Toxic Metabolites (TeA, AOH, and AME). **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 7, p.1-14. 2016.

MERGULHÃO, A. C. E. S. *et al.* Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil. **Hoehnea**, Recife, v. 3, n. 41, p.393-400. 2014.

NOGUEIRA, S. B. **Análise diferencial do proteoma da polpa de mamão durante o amadurecimento utilizando eletroforese bidimensional**. 117f. Tese (Doutorado) – Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, J. A. *et al.* Sequências de gene mitocondrial para identificação de espécies animais. **Rev. Colombiana Cienc. Anim.**, Dourados, v. 2, n. 5, p.396-407, 2013.

PAVÓN, M. A. *et al.* ITS-based detection and quantification of *Alternaria spp.* in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.165-171. 2012.

PAVÓN, M. A. *et al.* PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. **Food Control**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.1745-1756. 2010.

RODRIGUES, E. P. *et al.* A simple, economical and reproducible protein extraction protocol for proteomics studies of soybean roots. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 348-352. 2012.

ROTONDO, F. *et al.* Comparison of *Alternaria* spp. Collected in Italy from Apple with *A. mali* and Other AM-Toxin Producing Strains. **Phytopathology**, [s.l.], v. 102, n. 12, p.1130-1142. 2012.

SÁ, F. V. S. *et al.* Produção de mudas de mamoeiro irrigadas com água salina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 17, p.1047-1054. 2013.

SHARMA, N. *et al.* Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. **Plant Science**, Edmonton, v. 172, p. 95-110. 2007.

SICILIANO, I. *et al.* Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic *Alternaria* species isolated from basil. **Food Microbiology**, v. 73, p. 264-274. 2018.

SILVA, R. S.; SOUZA, C. R. B. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Acta Amazônica**, p. 255-260. 2009.

SINHA, R. *et al.* Leaf proteome profiling of transgenic mint infected with *Alternaria alternata*. **Journal of Proteomics**, [s.l.], v. 93, p. 117-132. 2013.

SINHA, R.; CHATTOPADHYAY, S. Changes in the leaf proteome profile of *Mentha arvensis* in response to *Alternaria alternata* infection. **Journal of Proteomics**, [s.l.], v. 74, p. 327-336. 2011.

SMITH, N. G. *et al.* Global photosynthetic capacity is optimized to the environment. **Ecology Letters**, [s.l.], p.1-10. 2019.

SOARES, E. A. *et al.* Label-free quantitative proteomic analysis of pre-flowering PMeV-infected *Carica papaya* L. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 275-283. 2017.

SUPIAN, S. *et al.* Antioxidant-mediated response of a susceptible papaya cultivar to a compatible strain of *Erwinia mallotivora*. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 98, p.37-45. 2017.

TAKÁČ, T.; ĽAMAJOVÁ, O.; ĽAMAJ, J.. Integrating cell biology and proteomic approaches in plants. **Journal Of Proteomics**, [s.l.], p.1-11. 2017.

VIANA, F. M. P. *et al.* **Queima-das-Pontas-das-Folhas-do-Mamoeiro: Nova Doença da Cultura e Instruções de Controle**. Fortaleza, EMBRAPA-Agroindústria Tropical, 2011. 6p. (EMBRAPA-AT. Comunicado Técnico, 170).

VIVAS, M. *et al.* Herança da resistência do mamoeiro a doenças fúngicas com base em análise dialética de Hayman. **Bragantia**, [s.l.], v. 72, n. 4, p.332-337. 2013.

VIVAS, M. *et al.* Resistance to multiple foliar diseases in papaya genotypes in Brazil. **Crop Protection**, [s.l.], v. 71, p.138-143. 2015

YU, L. *et al.* Label-free quantitative proteomics analysis of Cytosinepeptidemycin responses in southern rice black-streaked dwarf virus-infected rice. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], p.1-7. 2017.

YUAN, S. *et al.* Characterization of defense responses in the 'green ring' and 'red ring' on jujube fruit upon postharvest infection by *Alternaria alternata* and the activation by the elicitor treatment. **Postharvest Biology and Technology**, v.149, p. 166-176. 2019.

ZHENG, Li *et al.* Identification of a Novel *Alternaria alternata* Strain Able to Hyperparasitize *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, the Causal Agent of *Wheat Stripe Rust*. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-10. 2017