



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**RODRIGO MAKOWIECKY STUART**

**Análise da interação entre citros e *Alternaria alternata* patótipo  
tangerina**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
RODRIGO MAKOWIECKY STUART  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Genética de  
Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

*M. Machado*

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marinês Bastiani

**Campinas, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
SÍLVIA CELESTE SÁLVIO – CRB8/7039  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

St91a	<p>Stuart, Rodrigo Makowiecky, 1980- Análise da interação entre citros e <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina / Rodrigo Makowiecky Stuart. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Marcos Antonio Machado. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Alternaria. 2. Tangerina. 3. Microscopia. 4. PCR em tempo real. 5. Espectrometria de massa. I. Machado, Marcos Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Analysis of the interaction between citrus and *Alternaria alternata*  
tangerine pathotype

**Palavras-chave em Inglês:**

Alternaria  
Mandarin orange  
Microscopy  
Real-time PCR  
Mass spectrometry

**Área de concentração:** Genética de Microrganismos

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Marcos Antonio Machado [Orientador]  
Carlos Alberto Labate  
Juliana Freitas Astúa  
Celso Eduardo Benedetti

Alessandra Alves de Souza

**Data da defesa:** 23-08-2011

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 23 de Agosto de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

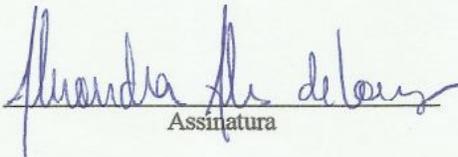
Prof. Dr. Marcos Antonio Machado (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

  
Assinatura

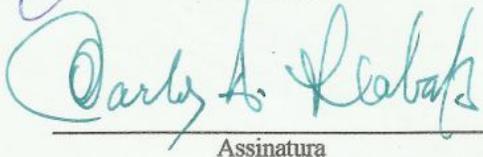
Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza

  
Assinatura

Profa. Dra. Juliana Freitas Astúa

  
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

  
Assinatura

Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka

Assinatura

Profa. Dra. Luciana Benchimol Rubiano

Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

Assinatura

*“A luta contra o erro tipográfico tem algo de homérico. Durante a revisão os erros se escondem, fazem-se positivamente invisíveis. Mas, assim que o livro sai, tornam-se visibilíssimos, verdadeiros sacis a nos botar a língua em todas as páginas. Trata-se de um mistério que a ciência ainda não conseguiu decifrar.”*

Monteiro Lobato

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos Antônio Machado pela oportunidade, apoio e confiança.

À Dra. Marinês Bastianel pela amizade e colaboração.

Ao Dr. Carlos Alberto Labate e sua equipe, em especial Alexander de Andrade, Fernanda Salvato, Matheus Bonatto e Thiago Fauda por toda disponibilidade, sugestões, ensinamentos e contribuições durante os experimentos com eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.

À Karen Sumire Kubo pelo amor, dedicação, e por sempre acreditar que era possível.

A minha mãe e meus avós por tudo o que sou.

Aos amigos Valéria Siqueira Mafra e Frank Magno da Costa pelo companheirismo, pelas idéias, e pela boa conversa durante as noites de trabalho.

A todos os amigos do Centro de Citricultura em especial Gaby, Kelly, Amélia, Sílvia, Juliana B., Beto, Kléber, Thiago, Lígia, Polyana, Kishi, Rosângela, Leonardo, Joadson, Renata e Fernanda, pela boa convivência e pelo respeito.

Aos novos e bons amigos do LABIM, Alessandro, Bruna, Carla, Camila, Marcela, Márcio, Tammy, Gislaine e Fabi pelo apoio nestes últimos cinco meses.

À AgroFresh por fornecer o 1-MCP para pesquisas.

À FAPESP (processo 2007/00117-4) pela bolsa de doutorado.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Unicamp pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 As tangerinas e sua importância econômica.....	1
1.2 O fungo <i>Alternaria alternata</i> em citros.....	2
1.2.1 A mancha marrom das tangerinas ( <i>A. alternata</i> patótipo tangerina).....	3
1.2.1.1 A toxina hospedeiro-seletiva (HSTs) do patótipo tangerina.....	5
1.3 Interação molecular entre plantas e fungos.....	7
1.3.1 Respostas de defesa mediadas por ácido salicílico (SA).....	9
1.3.2 Respostas de defesa mediadas por ácido jasmônico (JA) e etileno (ET).....	12
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos gerais.....	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	18
5. LITERATURA CITADA.....	21
6. CAPÍTULOS.....	29
Capítulo 1: The tangerine pathotype of <i>Alternaria alternata</i> asymptotically colonizes Pera sweet orange leaves.....	30
ABSTRACT.....	31
INTRODUCTION.....	31
MATERIALS AND METHODS.....	33
RESULTS .....	36
DISCUSSION.....	41
LITERATURE CITED.....	46
Capítulo 2: Modelo de resposta de defesa em plantas cítricas susceptíveis e resistentes à <i>A. alternata</i> obtido através da análise de transcritos por PCR quantitativo em tempo-real (RT-qPCR).....	48
RESUMO.....	48

INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS.....	56
DISCUSSÃO.....	62
LITERATURA CITADA.....	67
Capítulo 3: Avaliação de proteínas diferencialmente expressas em tangor 'Murcott' e laranja 'Pera' após inoculação com o fungo <i>A. alternata</i> .....	70
RESUMO.....	70
INTRODUÇÃO.....	71
MATERIAL E MÉTODOS.....	73
RESULTADOS.....	80
DISCUSSÃO.....	83
LITERATURA CITADA.....	88
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
ANEXOS.....	94

## RESUMO

### **Análise da interação entre citros e *Alternaria alternata* patótipo tangerina**

O patótipo tangerina do fungo *Alternaria alternata* produz a toxina hospedeiro específica ACT que afeta tangerinas e seus híbridos e causa a doença conhecida como mancha marrom de alternaria (MMA). A toxina ACT causa necrose em plantas susceptíveis, afetando ramos, folhas novas e frutos. Os sintomas incluem pontos marrons a negros circundados por um halo amarelado. Laranjas doces eram consideradas resistentes à doença uma vez que MMA nunca havia sido descrita no campo. Foi demonstrado que uma linhagem do fungo *A. alternata* produtor de toxina ACT é capaz de penetrar e colonizar de forma assintomática folhas de laranja ‘Pera’ sem perder a capacidade de causar necrose em genótipos susceptíveis. Microscopia óptica, inoculação e isolamento de *A. alternata* em plantas de laranja doce seguida pela inoculação cruzada em folhas susceptíveis de tangor ‘Murcott’, em adição a detecção por PCR do fungo em folhas assintomáticas de laranja doce no campo confirmam que laranja ‘Pera’ atua como hospedeiro assintomático do patógeno. A análise de genes (RT-qPCR) e proteínas (2DE) expressas durante a infecção com o fungo demonstrou que diferentes vias de sinalização foram ativadas em plantas de citros em resposta a *A. alternata*. Durante a resistência plantas responderam ativando as vias de sinalização mediadas por etileno e ácido jasmônico, as quais estão tipicamente envolvidas na defesa de plantas contra microrganismos necrotróficos. Aparentemente a produção de etileno também é requerida durante a susceptibilidade. Genes envolvidos na síntese de etileno aparecem induzidos durante a infecção e desenvolvimento de sintomas. Durante a infecção assintomática as plantas cítricas ativaram genes e proteínas associadas à síntese de fenilpropanóides, indicando o possível papel destes em plantas de laranja.

Palavras chave: mancha marrom de alternaria; citros, RT-qPCR, 2DE, resposta de defesa

## ABSTRACT

### **Analysis of the interaction between citrus and *Alternaria alternata* tangerine pathotype**

The tangerine pathotype of *Alternaria alternata* produces the host-specific ACT-toxin that affects mandarins and their hybrids and causes the disease known as *Alternaria* brown spot (ABS). ACT-toxin causes necrosis in susceptible plants, and the disease affects twigs, young leaves and fruits. The symptoms include brown to black necrotic spots that are surrounded by a yellow halo. Sweet oranges were considered resistant to the disease since ABS symptoms have never been reported in the field. It was demonstrated that an ACT-toxin-producing strain of *A. alternata* is able to penetrate and colonize Pera sweet orange leaves asymptotically without losing its ability to cause necrosis on susceptible genotypes. Light microscopy, inoculation and recovery of *A. alternata* from sweet orange leaves followed by subsequent cross-inoculation in susceptible leaves of Murcott tangor and PCR detection of the fungus in sweet orange symptomless leaves collected in the field confirmed that Pera sweet orange may act as an asymptomatic host for the pathogen. The analysis of genes (RT-qPCR) and proteins (2DE) expressed during fungal infection demonstrated that different signaling pathways were activated in citrus plants in response to *A. alternata*. During resistance, plants respond activating ethylene and jasmonic acid signaling pathways which are typically involved in plant defense against necrotrophic pathogens. Apparently the production of ethylene is also required during susceptibility. Genes involved in ethylene biosynthesis appear to be induced during infection and symptoms development. During asymptomatic infection, citrus plants activate genes and proteins associated to phenylpropanoids biosynthesis, indicating their possible role in sweet orange plants response to the disease.

Keywords: *Alternaria* brown spot, citrus, RT-qPCR, 2DE, defense response

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 As tangerinas e sua importância econômica

O Estado de São Paulo é principal produtor de laranja, tangerina e lima ácida ‘Tahiti’ no Brasil (BOTEON e NEVES, 2005). Apesar de ter como principal espécie produzida a laranja doce, as tangerinas e alguns de seus híbridos, especialmente os híbridos com laranja doce (tangores), possuem grande importância especialmente no mercado nacional de frutos *in natura* (BASTIANEL *et al.*, 2005), sendo que alguns deles podem ser processados pela indústria. Em São Paulo as duas variedades mais expressivas são a tangerina ‘Poncan’ (*Citrus reticulata* Blanco) e o tangor ‘Murcott’ (*C. sinensis* Osbeck x *C. reticulata* Blanco) (PIO *et al.*, 2005). Segundo o Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo (IEA/SP, 2006), em 2005 foram produzidos aproximadamente 400 mil toneladas de ‘Poncan’ e 210 mil toneladas de tangor ‘Murcott’. Nos Estados do Sul, as tangerinas do grupo da bergamota e das mexericas, têm maior expressão.

Em 2004, as exportações nacionais de tangerinas chegaram a 18 mil toneladas, representando um faturamento de aproximadamente oito milhões de dólares (SECEX, 2006). Embora as exportações tenham apresentado crescimento significativo nos últimos anos, barreiras fitossanitárias impostas por alguns países ainda representam um entrave para liberação das cargas brasileiras de laranja/tangerina para o mercado internacional (BOTEON e NEVES, 2005). No entanto, deve ser destacado que o principal mercado de tangerinas é o mercado interno, com participação acentuada de pequenos produtores, muitos deles de base familiar.

Além do faturamento gerado pela comercialização dos frutos, a citricultura brasileira representa grande importância econômica na geração de empregos. Estimativas

para o ano de 2002 indicavam a necessidade de 20 EDH<sup>1</sup>ha<sup>-1</sup> para a cultura da laranja, enquanto outras culturas que também utilizam tecnologias intensivas em capital, como soja e milho, não passavam de 5 EDH ha<sup>-1</sup> (NEVES *et al.*, 2002).

Sob a ótica comercial, o ponto forte da citricultura brasileira é seu custo competitivo de produção. Por outro lado, o ponto fraco encontra-se nos riscos a que seu principal ativo, os pomares, estão constantemente sujeitos. Nos últimos anos o aparecimento de severas doenças comprometeu o custo e a oferta dos frutos (BOTEON e NEVES, 2005). Neste contexto destaca-se a mancha marrom das tangerinas (*A. alternata*), comprometendo os pomares de tangerinas e seus híbridos, e inviabilizando a produção em várias regiões do país.

## 1.2 O fungo *Alternaria alternata* em citros

A maioria das espécies de *Alternaria* é considerada saprófita, sendo encontradas no solo e em tecidos vegetais mortos. Entretanto, alguns representantes do gênero são especializados como patógenos de plantas, causando um grande espectro de doenças com alto impacto econômico em uma gama enorme de hospedeiras agronomicamente importantes, incluindo ornamentais, oleaginosas, cereais, crucíferas, tubérculos, e frutos como tomate, citros e maçã (WALTON, 1996; THOMMA, 2003). Devido à ausência de um estágio teleomorfo definido para a maioria das espécies de *Alternaria*, este gênero é classificado artificialmente dentro da divisão dos fungos mitosporicos (KUSABA e TSUGE, 1994; THOMMA, 2003).

Dentre todas as espécies deste gênero, *A. alternata* se destaca por possuir sete variantes patogênicas, referidas como patótipos ou *formae speciales*, as quais produzem

---

<sup>1</sup> Equivalente dia-homem (EDH): medida que representa a demanda por força de trabalho por hectare-dia

toxinas hospedeiro-seletivas (*host selective toxins – HSTs*) responsáveis por causar doenças em hospedeiros determinados (ITO *et al.*, 2004).

Em citros, *A. alternata* causa a mancha marrom das tangerinas (patótipo tangerina), a mancha foliar do limão ‘Rugoso’ (patótipo limão ‘Rugoso’) e a podridão negra dos frutos pós-colheita (AKIMITSU *et al.*, 2003).

Apesar de pertencerem à mesma espécie, os patótipos de tangerina e de limão ‘Rugoso’ apresentam diferenças biológicas, bioquímicas e genéticas que podem ser utilizadas para sua diferenciação por marcadores moleculares, ensaios de patogenicidade ou produção de toxinas (PEEVER *et al.*, 2000, 2002).

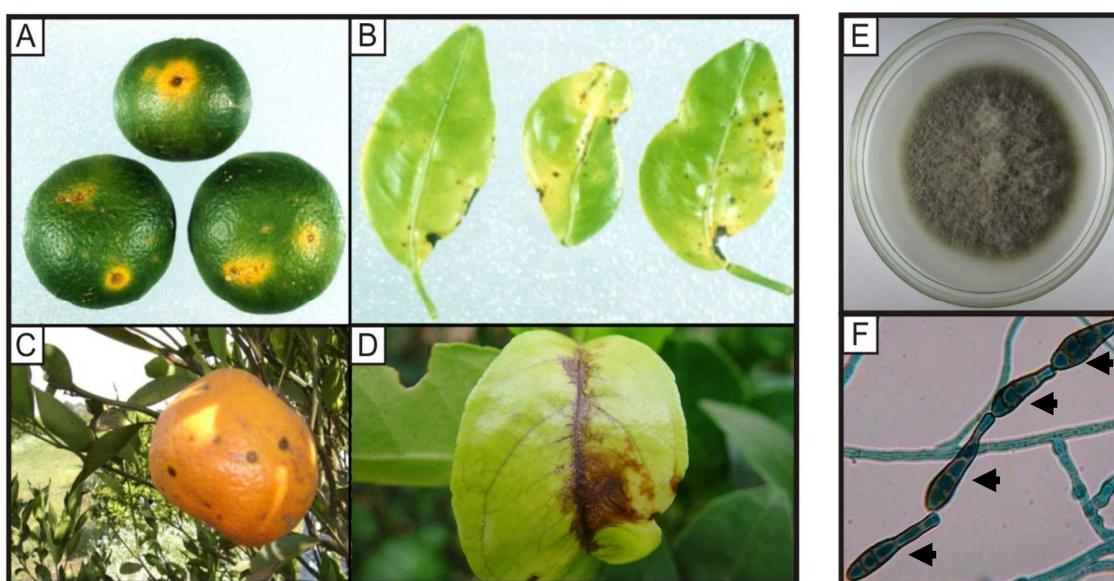
A especificidade dos patótipos tangerina e limão ‘Rugoso’ depende da produção de suas toxinas hospedeiro específicas denominadas ACT (Alternaria Citri Tangerine) e ACR (Alternaria Citri Rough lemon), respectivamente (KOHMOTO *et al.*, 1979; 1993; WALTON, 1996; AKIMITSU *et al.*, 2003). A toxina ACT é ativa contra tangerinas e alguns de seus híbridos, mas não afeta limão ‘Rugoso’, enquanto que a toxina ACR é ativa contra limão ‘Rugoso’, mas não afeta tangerinas (KOHMOTO *et al.*, 1991; 1993).

#### 1.2.1 A mancha marrom das tangerinas (*A. alternata* patótipo tangerina)

No Brasil, a mancha marrom das tangerinas foi confirmada nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo, afetando seriamente pomares formados de tangerina ‘Poncan’ e tangor ‘Murcott’, as principais variedades cultivadas no país, e em tangerina ‘Dancy’ (GOES *et al.*, 2001; PERES *et al.*, 2003; SPOSITO *et al.*, 2003).

Os sintomas incluem pequenos pontos necróticos de coloração escura em folhas, ramos, e frutos que podem ou não estar acompanhados de halos cloróticos (AKIMITSU *et*

al., 2003) (Figura 1A-D). As lesões aparecem em média entre dois a três dias após a infecção (REIS *et al.*, 2006), entretanto em alguns casos os sintomas podem aparecer em menos de 24 horas (AKIMITSU *et al.*, 2003). As lesões ocorrem principalmente os tecidos jovens, promovendo a abscisão de frutos e folhas imaturas, prejudicando o desenvolvimento da planta e conseqüentemente reduzindo a produção (AKIMITSU *et al.*, 2003; TIMMER *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Sintomatologia e morfologia do agente causal da mancha marrom de alternaria: *Alternaria alternata*. **A.** Manchas necróticas com halos cloróticos em frutos imaturos da variedade ‘Dancy’. **B.** Má formação foliar, necrose e clorose em folhas de tangerina ‘Dancy’. **C.** Manchas necróticas em fruto maduro de tangor ‘Murcott’. **D.** Má formação foliar e necrose da nervura central em folha de tangor ‘Murcott’. (Fontes: TIMMER *et al.*, 1992; BASTIANEL *et al.*, 2005). **E.** Morfologia da colônia de *A. alternata* em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) após uma semana de crescimento. **F.** Microscopia óptica de *A. alternata* demonstrando conídios em cadeia (setas) típicos da espécie.

O ciclo da doença é relativamente simples. Conídios (Figura 1F) são produzidos nas superfícies infectadas da planta, sendo dispersos pelo ar e depositados em tecidos saudáveis susceptíveis, onde podem germinar promovendo a infecção (REIS *et al.*, 2006). A liberação

dos conídios está relacionada com a ocorrência de chuvas ou mudanças bruscas na umidade relativa (TIMMER, 1998).

Os conídios germinam rapidamente na presença de umidade e iniciam a produção de toxinas mesmo antes de penetrarem o tecido vegetal (AKIMITSU *et al.*, 2003). A penetração do fungo na planta ainda é assunto controverso, sendo sugerida a entrada pelos estômatos ou através da formação de apressórios (SOLEL e KIMCHI, 1998; AKIMITSU *et al.*, 2003).

#### 1.2.1.1 A toxina hospedeiro-seletiva (HSTs) do patótipo tangerina

As HSTs são geralmente compostos de baixo peso molecular produzidos por alguns gêneros de fungos fitopatogênicos e são determinantes críticos para patogenicidade (MARKHAM e HILLE, 2001; WOLPERT *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004). O patótipo tangerina de *Alternaria alternata* produz a toxina denominada ACT (AKIMITSU *et al.*, 2003). Embora a maior forma da toxina ACT seja a toxina denominada ACT-I, outra toxina específica denominada ACTG também é produzida por este patótipo (KONO *et al.*, 1986). Entretanto, a toxina ACT-I é no mínimo dez vezes mais tóxica a citros e é basicamente a única toxina detectada durante a germinação dos conídios (KOHMOTO *et al.*, 1993). A estrutura da toxina ACT é muito relacionada às toxinas AK e AF, que são HSTs dos patótipos de *A. alternata* em Pera japonesa e morango, respectivamente (NAKASHIMA *et al.*, 1985; KOHMOTO *et al.*, 1993). Estas toxinas compartilham um mesmo motivo ácido 9,10-epoxi-8-hidroxi-9-metil-decatrienóico (NAKASHIMA *et al.*, 1985; KOHMOTO *et al.*, 1993). Assim como a toxina ACR do patótipo de limão, a toxina ACT causa necrose dos vasos condutores e a rápida perda de eletrólitos com extravasamento celular, entretanto seu modo de ação ainda é controverso (KOHMOTO *et al.*, 1993; AKIMITSU *et al.*, 2003).

Trabalhos com microscopia eletrônica de transmissão indicam que o sítio de ação primário da toxina ACT seja a membrana plasmática das células susceptíveis (KOHMOTO *et al.*, 1993), entretanto não foram realizados trabalhos posteriores confirmando esta hipótese.

O *cluster* gênico que controla a síntese da toxina ACT no patótipo tangerina foi identificado com a utilização de sondas heterólogas às seqüências do gene *AKT* que controla a síntese do motivo ácido 9,10-epoxi-8-hidroxi-9-metil-decatrienóico na toxina AK do patótipo da Pera japonesa (TANAKA *et al.*, 1999). Porções deste *cluster* utilizadas como sondas heterólogas detectaram muitos homólogos em diversos isolados de *Alternaria alternata* do patótipo tangerina, mas não detectaram homologia com isolados que não produziam a toxina ACT, como o patótipo de limão ‘Rugoso’ ou isolados que causam a podridão negra dos frutos pós-colheita (MASUNAKA *et al.* 2000).

Um estudo com isolados de *A. alternata*, produtores e não produtores de HSTs, demonstrou que todos as formas produtoras carregam pequenos cromossomos extras, enquanto os isolados não produtores não os possuem (AKAMATSU *et al.*, 1999). Estes cromossomos, denominados cromossomos supernumerários, não são essenciais para o crescimento dos fungos, sendo muitas vezes referidos como cromossomos condicionalmente dispensáveis, entretanto podem conferir vantagens adaptativas essenciais para a conquista de novos ambientes (THOMMA, 2003). O *cluster* gênico envolvido na síntese das toxinas AK, AF e ACT encontra-se em um pequeno cromossomo, supostamente supernumerário, que pode ter sido adquirido por transferência horizontal de genes (TANAKA *et al.*, 1999; WALTON, 2000). Teoricamente, um isolado saprófito de *A. alternata* pode se tornar patogênico por transferência horizontal de genes (WALTON, 2000), hipótese que é suportada, em teoria, pelo fato de que uma população de um único

patótipo não forma grupos monofiléticos (KUSUBA e TSUGE, 1994, 1995; PEEVER *et al.*, 2002).

Embora seja conhecida a estrutura da toxina ACT e o *cluster* gênico que controla sua biossíntese no patótipo tangerina, pouco se conhece sobre o sítio de ação da toxina e sobre as respostas induzidas na planta durante o processo de infecção.

### 1.3. Interação molecular entre plantas e fungos

Plantas respondem ao ataque de patógenos pela ativação de um grande número de mecanismos de defesa. Estas respostas normalmente têm início através do reconhecimento gene-a-gene do patógeno, cuja base molecular determina que um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno codifica para uma proteína elicitora (AVR) que é reconhecida na planta por uma proteína receptora codificada por um gene correspondente de resistência (*R*) (AGRIOS, 2005). Este reconhecimento resulta na rápida ativação de respostas de defesa que conseqüentemente limitam o desenvolvimento do patógeno. A resistência mediada por genes *R* está normalmente acompanhada da liberação rápida de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GLAZEBROOK, 2005). A produção de ROS é requerida por outro componente da resposta de defesa, a resposta de hipersensibilidade (HR) – uma espécie de morte celular programada que limita o acesso do patógeno às células vivas adjacentes ao sítio de infecção (GLAZEBROOK, 2005). A resistência mediada por genes *R* também está associada com a ativação de vias de sinalização dependentes de ácido salicílico (SA), que levam a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR – *pathogenesis related proteins*) que desempenham papel importante na resistência (AGRIOS, 2005). Outras respostas de defesa são controladas por mecanismos dependentes de etileno (ET) e/ou ácido jasmônico (JA). Tais respostas possuem sobreposição com respostas a ferimentos, as quais

também são controladas por ET/JA (BARON e ZAMBRYSKI, 1995). As respostas mediadas por SA e ET/JA são antagônicas entre si, sendo que a expressão de genes responsivos a SA inibe a expressão de genes associados a ET/JA, e vice-versa (KUNKELL e BROOKS, 2002).

Fungos fitopatogênicos podem ser agrupados em biotróficos e necrotróficos de acordo com sua interação com o hospedeiro. Por definição, microrganismos patogênicos biotróficos retiram seus nutrientes dos tecidos vivos de seus hospedeiros, enquanto microrganismos patogênicos necrotróficos utilizam tecidos mortos para se nutrirem (AGRIOS, 2005). É fácil imaginar que no caso de organismos biotróficos, a resistência mediada por genes *R* e a resposta associada à ROS, HR e SA resultem em resistência pela produção de necrose e limitação do desenvolvimento do patógeno. Entretanto, para microrganismos necrotróficos, a única consequência que tais respostas ocasionariam seria a de facilitar a colonização. Esta observação indica que as plantas possuem mecanismos de defesa distintos para cada tipo de interação (GLAZEBROOK, 2005). De fato, experimentos com mutantes de *Arabidopsis thaliana* para o gene *NPR1* (*nonexpressor of PR1*) e transgênicos com o gene *nahG* (*salicylate hydroxylase*) de *Pseudomonas* sp., os quais bloqueiam a sinalização por SA, resultaram na perda de resistência para o oomiceto biotrófico *Peronospora parasítica*, mas não surtiram nenhum efeito na resistência contra o fungo necrotrófico *Alternaria brassicicola* (THOMMA *et al.*, 1998). Por sua vez, mutações no gene *COI1* (*coronatine insensitive 1*), que bloquearam a sinalização por JA, comprometeram severamente a resistência contra *A. brassicicola*, mas não tiveram efeito na resistência contra *P. parasítica* (THOMMA *et al.*, 1998). Isto caracteriza que a via de sinalização associada à SA estaria voltada a defesa contra microrganismos biotróficos,

enquanto vias de sinalização mediadas por ET/JA estariam ligadas a defesa contra microrganismos necrotróficos (MCDOWELL e DANGL, 2000).

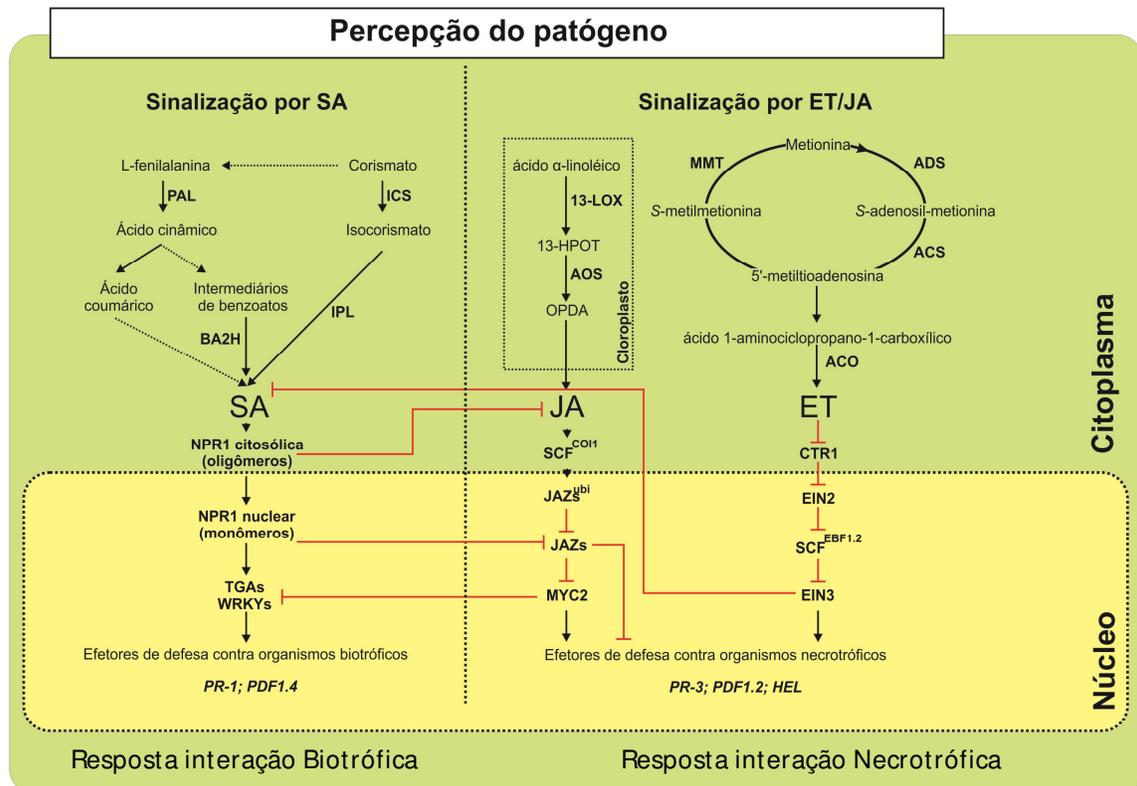
### 1.3.1 Respostas de defesa mediadas por ácido salicílico (SA).

A síntese de SA em plantas ocorre por duas vias enzimáticas distintas que requerem o metabólito primário corismato. L-fenilalanina derivada de corismato é convertida em SA via intermediários de benzoatos ou ácido coumárico através de uma série de reações enzimáticas que são inicialmente catalisadas pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (Figura 2) (WILDERMUTH, 2006). Corismato também pode ser convertido em SA via isocorismato em um processo de duas etapas envolvendo isocorismato sintase (ICS) e isocorismato piruvato liase (IPL) (STRAWN *et al.*, 2007; VEMBERNE *et al.*, 2000). Mutantes apresentando expressão reduzida de *PAL* ou com mutações em *SID2/EDS16* (transcreve ICS) ou *SID1/EDS5* (transcreve um membro da família de transportadores MATE requerida para a acumulação de SA) apresentam maior susceptibilidade a patógenos e são incapazes de expressar genes *PR* comumente associados à resistência mediada por SA (NAWRATH *et al.*, 2002; NAWRATH, 1999; PALLAS *et al.*, 1996). O acúmulo de SA nos tecidos ativa a expressão de *NPR1*. Quando os níveis de SA estão baixos, *NPR1* existe na forma oligomérica no citoplasma. Quando os níveis de SA aumentam, os oligômeros de *NPR1* dissociam-se em monômeros e entram no núcleo onde interagem com fatores de transcrição tipo TGA. TGAs 2, 5 e 6 são requeridos para ativação da expressão de *PR-1* por SA.

A família de proteínas conhecidas como PR-1 é extremamente conservada entre espécies vegetais. Todas as proteínas PR-1 são estruturalmente similares, possuindo quatro  $\alpha$ -hélices e quatro folhas- $\beta$  e compartilhando resíduos conservados, incluindo seis cisteínas

(VAN LOON *et al.*, 2006). Em fumo, ao menos 16 isoformas de PR-1 são encontradas, dentre estas, três proteínas ácidas (PR-1a, PR-1b e PR-1c) e uma básica (PR-1g) são induzidas durante a infecção por TMV (*Tobacco mosaic virus*). Em tomate, as PRs homólogas com alta similaridade genética com as três PRs ácidas de fumo (PR-1a, PR-1b e PR-1c) são básicas, indicando que PRs que são classificadas na mesma família com base em homologia de seqüências podem diferir substancialmente na atividade biológica (VAN LOON *et al.*, 1994). Embora sua função biológica não seja completamente entendida, as PRs-1 são utilizadas como marcadores de resposta de defesa mediada por SA (VAN LOON *et al.*, 1999).

O fator de transcrição *WRKY70* também é requerido para expressão de *PR-1* em resposta à infecção. A expressão de *WRKY70* é induzida por SA e dependente de *NPR1*. A expressão de *WRKY70* parece estar associada à característica antagônica da relação entre SA e ET/JA. Em *Arabidopsis thaliana*, a indução de *WRKY70* resultou na expressão constitutiva de genes *PR* responsivos a SA, aumentando a resistência contra o patógeno biotrófico *Erysiphe cichoracearum*, entretanto, reprimiu a expressão do gene marcador *PDF1.2*, responsivo a JA, comprometendo a resistência contra o patógeno necrotrófico *A. brassicicola* (LI *et al.*, 2004, 2006). Por outro lado, a repressão de *WRKY70* induz a expressão de *PDF1.2*, aumentando a resistência contra *A. brassicicola* (LI *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Representação esquemática das vias de sinalização mediadas por ácido salicílico (SA), etileno (ET) e ácido jasmônico (JA), em resposta a infecção por microrganismos biotróficos e necrotróficos em células vegetais com base na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Setas vermelhas indicam repressão; setas pretas indicam indução. Na sinalização por SA: PAL – fenilalanina amônia liase; ICS – isocorismato sintase; IPL – isocorismato piruvato liase; BA2H – ácido benzóico 2-hidroxilase; NPR1 – *nonexpresser of PR-1*; TGAs – família de fatores de transcrição *bZIP*; WRKYs – fatores de transcrição conservados WRKGQK; PR-1 – *pathogenesis related protein 1*; PDF1.4 – *plant defensin 1.4*. Na sinalização por ET/JA: 13-LOX – 13-lipoxigenase; AOS - óxido de aleno sintase; SCF<sup>COI1</sup> - *SKP1/Cullin/F-box protein E3 ubiquitin ligase complex associated to COI1 F-box protein*; JAZ – *jasmonate ZIM-domain protein family*; MYC2 - *helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor*; PR-3 *pathogenesis related protein 3* (quitinase básica); PDF1.2 – *plant defensin 1.2*; HEL – *hevein like protein*; MMT - metionina S-metil transferase; ADS – S-AdoMet sintase; ACS - 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase; ACO - ACC oxidase; CTR1 - *constitutive triple response (raf-like serine-threonine kinase)*; EIN2 – *ethylene insensitive 2 (Nramp like protein)*; SCF<sup>EBF1.2</sup> - *SKP1/Cullin/F-box protein E3 ubiquitin ligase complex associated to EBF1.2 F-box protein*; EIN3 – *ethylene insensitive 3*.

### 1.3.2 Respostas de defesa mediadas por ácido jasmônico (JA) e etileno (ET)

JA e seus derivados, coletivamente denominados de jasmonatos (JAs), são lipídeos originados de ácido  $\alpha$ -linoléico ( $\alpha$ -LeA) nas membranas dos cloroplastos (DELKER *et al.*, 2006).  $\alpha$ -LeA é o substrato para uma lipoxigenase (13-LOX) localizada nos cloroplastos, que catalisa a inserção de um oxigênio no carbono 13 do esqueleto carbônico, gerando ácido 13S-hidroperoxioctadecatrienóico (13-HPOT) (DELKER *et al.*, 2006) (Figura 2). Dos seis genes de LOX em *A. thaliana*, apenas *AtLOX2* (13-LOX) parece estar envolvido na síntese de JA (FEUSSNER e WASTERNAK, 2002). Após a conversão de  $\alpha$ -LeA em 13-HPOT, este é convertido pela óxido de aleno sintase (AOS) em um produto epóxido instável, ácido 12,13S-epoxioctadecatrienóico (12,13-EOT) (SCHALLER *et al.*, 2008; SCHALLER e STINTZI, 2008). Em meio aquoso, o 12,13-EOT decompõe-se rapidamente ou sofre reações que levam à formação de uma mistura racêmica de OPDA. AOS garante a formação do enantiômero de OPDA opticamente puro. O OPDA passa para o peroxissoma onde ocorrem três  $\beta$ -oxidações até a formação de JA. Somente o enantiômero 9S,13S-OPDA é um precursor biologicamente ativo do JA (WASTERNAK, 2007; SCHALLER e STINTZI, 2008).

Muitos estudos demonstram que ET e JA atuam de forma sinérgica na indução de expressão de genes relacionados à defesa contra patógenos necrotróficos (PENNINCKX *et al.*, 1998; THOMMA *et al.*, 2001; GLAZEBROOK, 2005). Análises de microarranjo demonstraram uma sobreposição no número de genes induzidos em ambas as vias (ET/JA) durante processo de infecção (SCHENK *et al.*, 2000). A sinalização dependente de JA segue através do aumento da síntese de JA em resposta ao ataque de patógenos e conseqüentemente aumenta a expressão de genes efetores de defesa, como *PDF1.2*. No caso de *PDF1.2*, o aumento da expressão requer ambos ET/JA. Em *A. thaliana*, a indução

de *PDF1.2* após inoculação com *A. brassicicola* foi inibida nos mutantes *coil* e *ein2*, indicando o papel dos genes *COI1* e *EIN2* na sinalização de resposta de defesa mediada por ET/JA (PENNINCKX *et al.*, 1998; THOMMA *et al.*, 2001). *COI1* transcreve uma proteína F-box envolvida na degradação de proteína mediada por SCF no proteossomo 26S, e é requerida para a maioria das respostas mediadas por JA (XIE *et al.*, 1998). Além de *COI1* e *EIN2*, outros genes como *JAR1* e *MYC2* são essenciais para a sinalização mediada por ET/JA. Durante a sinalização, o gene *JAR1* transcreve uma JA amino-ácido-sintetase, envolvida na conjugação de isoleucina ao JA, formando JA-Ile, que é considerada a molécula ativa percebida pelas plantas (STASWICK e TIRYAKI, 2004; THINES *et al.*, 2007). Proteínas contendo domínio jasmonato ZIM (JAZ), formam um complexo COI1-JAZ e atuam como receptor de JA-Ile em *Arabidopsis* spp. (KATSIR *et al.*, 2008). Proteínas JAZ são repressores da sinalização por JA e interagem com *MYC2* inibindo a expressão de genes responsivos a JA. JA-Ile promove a interação entre proteínas JAZ e a ubiquitina ligase SCF<sup>COI1</sup> direcionando as proteínas JAZ para ubiquitinação e degradação no proteossomo. A degradação de JAZ permite que fatores de transcrição como *MYC2* sejam ativados, levando à expressão de genes responsivos a JA (CHINI *et al.* 2007; THINES *et al.* 2007).

O papel de ET em respostas de defesa é muitas vezes controverso, atribuindo resistência em algumas interações (NORMAN-SETTERBLAD *et al.*, 2000; THOMMA *et al.*, 1999) e promovendo doença em outras (BENT *et al.*, 1992; LUND *et al.*, 1998; HOFFMAN *et al.*, 1999). Interessantemente, genes dependentes de JA como *PDF1.2*, *HEL* e *CHIB* também requerem genes específicos da via de ET como *EIN2*, demonstrando a dependência entre as duas vias (NORMAN-SETTERBLAD *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 1996).

A via de biossíntese de etileno nas células vegetais inicia-se através da conversão do aminoácido metionina (Met) em *S*-adenosil-metionina (AdoMet) pela enzima *S*-AdoMet sintase (ADS). AdoMet é o principal doador de grupo metila em reações de transmetilação, e um intermediário da síntese de biotina, poliamidas e de ET (RÉBEILLÉ *et al.*, 2006) (Figura 2). AdoMet é convertido pela enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) em 5'-metiltioadenosina (MTA) e novamente reconvertido em metionina através do ciclo da metionina e ao precursor de ET, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (BROEKAERT *et al.*, 2006). A reciclagem de Met a partir de MTA ocorre através da enzima Methionina *S*-metil transferase (MMT) e gera como produto *S*-metilmetionina (SMM) (MUD e DATKO, 1990; RÉBEILLÉ *et al.*, 2006). ACC produzido a partir de AdoMet é oxidado pela ACC oxidase (ACO) para formar ET (BROEKAERT *et al.*, 2006).

ACO é codificada por famílias multigênicas em praticamente todas as espécies vegetais estudadas (WANG *et al.*, 2002). Membros desta família são diferencialmente expressos durante o desenvolvimento da planta ou em resposta ao ataque de patógenos e estresse abiótico (COHN *et al.*, 2005; MOEDER *et al.*, 2002; NAKATSUKA *et al.*, 1998; NIE *et al.*, 2002). A análise da expressão de todos os genes de *Arabidopsis* que codificam ACO demonstrou regulação gênica em resposta a estresse biótico e abiótico para um grupo particular deles. ACO genes nos loci At1g62380 e At1g05010 apresentaram indução após tratamento das plantas de *Arabidopsis* com ET e com o fungo *Botrytis cinerea* (ZIMMERMAN *et al.*, 2004). A expressão diferencial de ACO sugere que o controle transcricional deste gene está associado à produção de ET (BROEKAERT *et al.*, 2006).

O sinal de etileno chega ao núcleo da célula através da ativação de EIN3 e fatores de transcrição do tipo-EIN3 (CHAO *et al.*, 1997). A modulação da atividade de EIN3 por ET não ocorre inicialmente pela regulação transcricional direta, mas sim pelo controle

proteolítico do complexo SCF (SKP1/Cullin/F-box protein) E3 ubiquitina ligase (CHAO *et al.*, 1997; GAGNE *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2003). Proteínas F-box EBF1 e EBF2 interagem fisicamente com EIN3 na ausência de ET e desestabilizam a estrutura protéica (GAGNE *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2003; POTUSCHAK *et al.*, 2003). Na presença de ET a degradação de EIN3 é suprimida, permitindo que os níveis da proteína EIN3 aumentem, dando continuidade a sinalização por ET (GAGNE *et al.*, 2004; POTUSCHAK *et al.*, 2003).

Além de sua associação com a via de sinalização mediada por SA, as proteínas relacionadas à patogênese (PRs) ocorrem também como efetoras de resposta de defesa comumente associados à sinalização por ET. Dentre elas destacam-se a  $\beta$ -1,3-glucanase (PR-2), a quitinase básica (PR-3), a proteína ácida tipo-heveína (PR-4) e algumas defensinas (PDFs; PR-12). O gene *AtPDF1.2* da defensina PDF1.2 (grupo das PR-12) de *Arabidopsis* é freqüentemente utilizado como marcador de resposta de defesa induzida por ET/JA (PENNINCKX *et al.*, 1996; 1998). Avanços na anotação do genoma de *Arabidopsis* revelaram a presença de 317 genes tipo-defensina (DELFs) (TOMMA *et al.*, 2001), entretanto, nem todos estes respondem a ET. Por exemplo, o gene *AtPDF1.2* é induzido tanto por ET quanto por JA, mas não por SA, enquanto *AtPDF1.4* não responde a ET ou JA, mas sim a SA (BROEKAERT *et al.*, 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

**A.** Ampliar o entendimento sobre a interação molecular entre o fungo *A. alternata* do patótipo tangerina e citros durante respostas de resistência e susceptibilidade do hospedeiro.

### 2.2 Objetivos específicos

**A.** Mapear por microscopia óptica o processo de infecção do patótipo tangerina de *A. alternata* em tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pera’.

**B.** Avaliar a expressão de genes associados às vias de sinalização por ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) durante o processo de infecção do patótipo tangerina de *A. alternata* em tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’, tangor ‘Murcott’, e laranja ‘Pera’;

**C.** Avaliar por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa as proteínas expressas em tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pera’ em resposta à infecção por *A. alternata*.

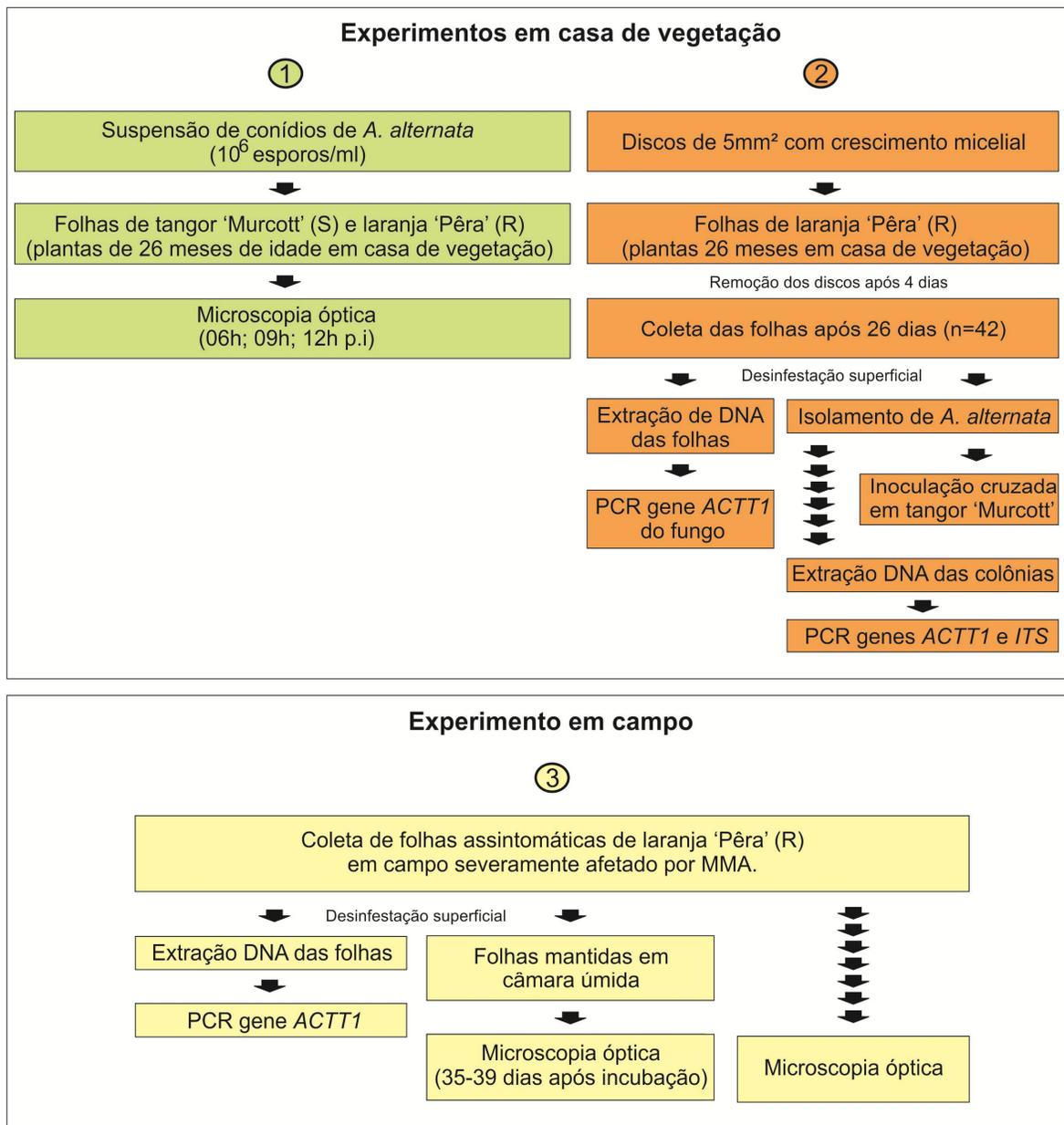
### 3. JUSTIFICATIVA

A mancha marrom de alternaria, causada pelo patótipo de tangerina do fungo *A. alternata*, representa um sério problema aos pequenos, médios e grandes pomares de tangerinas e seus híbridos no Estado de São Paulo e outros Estados brasileiros. Por atacar principalmente os tecidos jovens e causar abscisão foliar e de frutos, esta doença é responsável por uma redução considerável da produção de frutos, gerando grandes prejuízos à citricultura nacional.

Embora as pesquisas com a genética do fungo e a produção de sua toxina hospedeiro-específica (ACT) estejam relativamente avançadas, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-patógeno. A análise dos níveis de expressão dos genes de resposta de defesa em citros, assim como de suas proteínas, possibilita propor hipóteses sobre o mecanismo molecular ativo durante a infecção em plantas susceptíveis e resistentes. O entendimento destes mecanismos auxilia na escolha de genes alvos para melhoramento genético e fornece perspectivas de ação contra o patógeno.

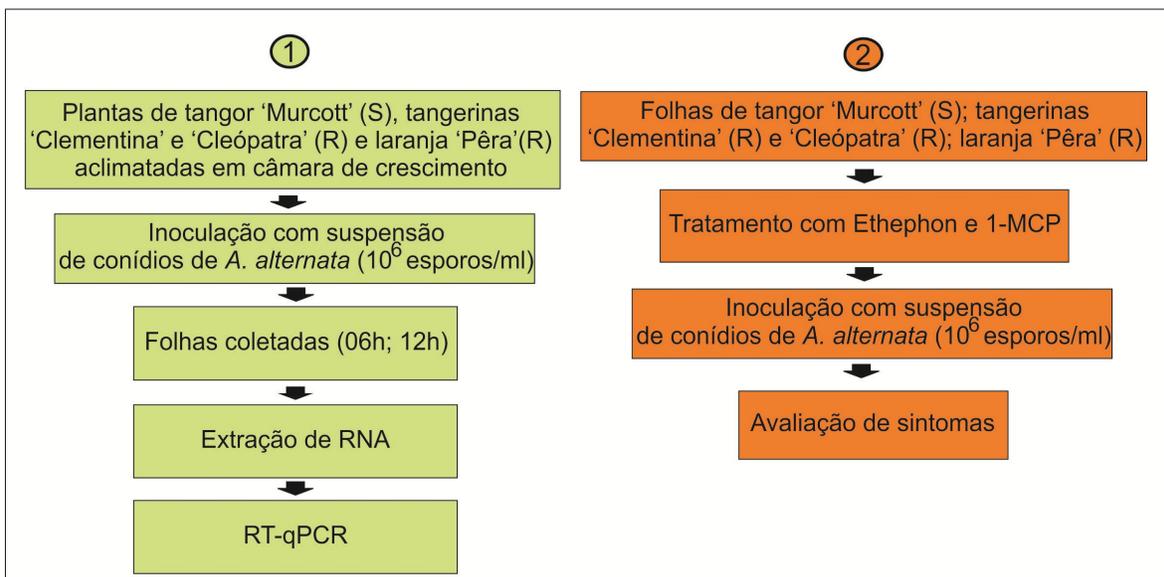
## 4. DESENHO EXPERIMENTAL

4.1 Capítulo 1 – The tangerine pathotype of *Alternaria alternata* asymptotically colonizes Pera sweet orange leaves.



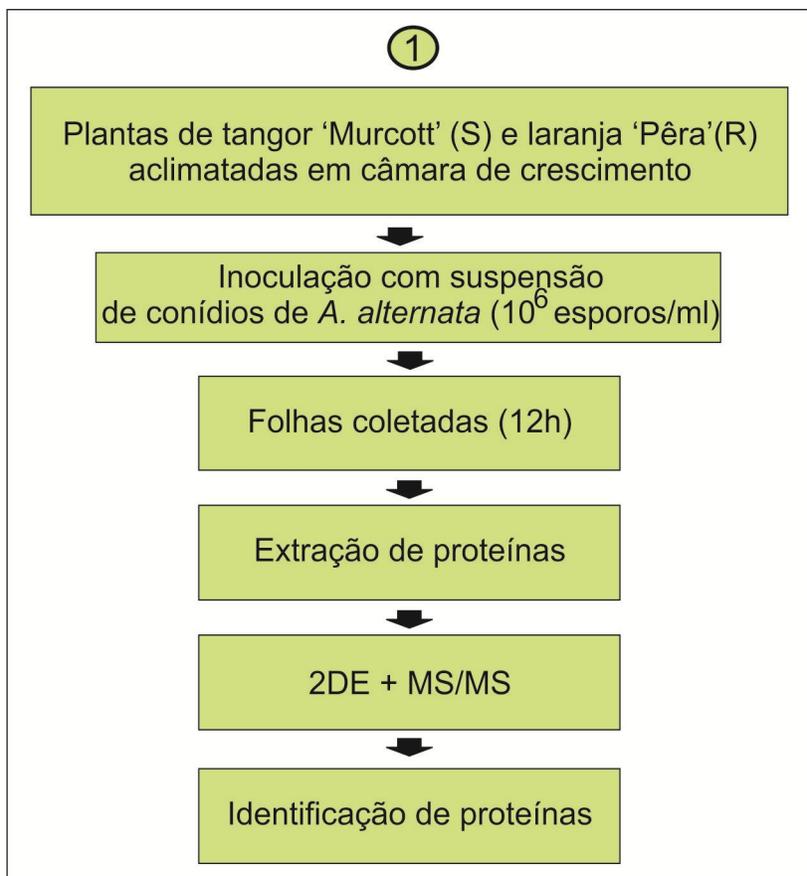
**Esquema experimental de trabalho.** 1. Microscopia óptica de folhas de laranja 'Pêra' (R) e tanger 'Murcott' (S) inoculadas com *A. alternata* em casa de vegetação. 2. Inoculação, detecção e isolamento de *A. alternata* em folhas de laranja 'Pêra' (R) em casa de vegetação, seguido de inoculação cruzada em tanger 'Murcott' (S). 3. Detecção de *A. alternata* em folhas assintomáticas de laranja 'Pêra' (R) no campo. (R) resistente. (S) susceptível. p.i – post inoculation.

4.2 Capítulo 2 – Modelo de resposta de defesa em plantas cítricas susceptíveis e resistentes à *A. alternata* obtido através da análise de transcritos por PCR quantitativo em tempo-real (RT-qPCR).



**Esquema experimental de trabalho.** 1. PCR quantitativo em tempo real de genes associados à resposta de defesa em folhas de tanger 'Murcott'(S), tangerinas 'Clementina' (R) e 'Cleópatra' (R), e laranja 'Pera' (R) após inoculação com *A. alternata* em câmara de crescimento. 2. Avaliação do tratamento das folhas de tanger 'Murcott'(S), tangerinas 'Clementina' (R) e 'Cleópatra' (R), e laranja 'Pera' (R) com ethephon e 1-MCP pré-inoculação com suspensão de conídios de *A. alternata*.

4.3 Capítulo 3 – Avaliação de proteínas diferencialmente expressas em tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pera’ após inoculação com o fungo *A. alternata*.



**Esquema experimental de trabalho.** 1. Avaliação das proteínas diferencialmente expressas em citros após inoculação com *A. alternata*. 2DE – eletroforese bidimensional; MS/MS – espectrometria de massa.

## 5. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. **Plant Pathology**. 948p. San Diego: Academic
- Akamatsu, H. M.; Taga, M.; Kodama, R. D.; Johnson, H. 1999. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. **Curr. Genet.**, 35: 647–656.
- Akimitsu, K.; Peever, T.L.; Timmer, L.W. 2003. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Mol. Plant Pathol.**, 4(6): 435-446.
- Baron, C.; Zambryski, P. C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? **Annu. Ver. Genet.**, 29: 107-129.
- Bastianel, M.; Azevedo, F.A.; Cristofani, M.; Machado, M. A. 2005. Mancha marrom de alternária: uma interação fungo, toxina, tangerina. **Laranja**, 25(2): 323-336.
- Bent, A. F.; Innes, R. W.; Ecker, J. R.; Staskawicz, B. J. 1992. Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. **Mol Plant Microbe Int.**, 5: 372-378.
- Boteon, M.; Neves, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: Mattos Jr., D. M.; Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e FUNDAG, 2005. p. 19-36.
- Broekaert, W. L.; Delauré, S. L.; Bolle, M. F. C.; Cammue, B. P. A. 2006. The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interaction. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 44:393–416.
- Chao, Q.; Rothenberg, M.; Solano, R.; Roman, G.; Terzaghi, W. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENEINSENSITIVE3 and related proteins. **Cell**, 89:1133–44.
- Chini, A.; Fonseca, S.; Fernandez, G.; Adie, B.; Chico, J.M.; Lorenzo, O.; Garcia-Casado, G.; Lopez-Vidriero, I.; Lozano, F. M.; Ponce, M. R. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. **Nature**, 448: 666–671.
- Cohn, J. R.; Martin, G. B. 2005. *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. **Plant J** 44:139–154.

- Delker, C.; Stenzel, I.; Hause, B.; Miersch, O.; Feussner, I.; Wasternack, C. 2006. Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* – Enzymes, Products, Regulation. **Plant Biol.** 8: 297–306.
- Feussner, I.; Wasternack, C. 2002. The lipoxygenase pathway. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 53: 275–297.
- Gagne, J. M.; Smalle, J.; Gingerich, D. J.; Walker, J. M.; Yoo, S. D. 2004. Arabidopsis EIN3- binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101:6803–8
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 43:205–27.
- Goes, A.; Montes De Oca, A. G.; Reis, R. F., (2001). Ocorrência de la mancha de alternaria em mandarina ‘Dancy’ en el Estado de Rio de Janeiro. **Fitopatol. Bras.**, 26: 386 (Suppl).
- Guo, H.; Ecker, J. R. 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**, 115:667–77
- Hoffman, T.; Schmidt, J. S.; Zheng, X.; Bent, A. F. 1999. Isolation of ethyleneinsensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. **Plant Physiol**, 119:935-949.
- IEA/SP – Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo. **Quantidade colhida.** Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>>. Acesso em: 10 jun. 2007.
- Ito, K.; Tanaka, T.; Hatta, R.; Yamamoto, M.; Akimitsu, K.; Tsuge, T. 2004. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism. **Mol. Microbiol**, 52(2): 399-411.
- Jackson, A. O.; Taylor, C. B. 1996: Plant–microbe interactions: life and death at the interface. **Plant Cell**, 8:1651-1668.
- Katsir, L.; Schillmiller, A. L.; Staswick, P. E.; He, S. Y.; Howe, G. A. 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 105: 7100–7105.

- Kohmoto, K.; Scheffer, R.P.; Whiteside, J.O. 1979. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. **Phytopathol.**, 69: 667-671.
- Kohmoto, K.; Akimitsu, K.; Otani, H. 1991. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathol.**, 81(7): 719-722.
- Kohmoto, K.; Ito, Y.; Shimomura, N.; Kondoh, Y.; Otani, H.; Kodama, M.; Nishimura, S.; Nakatsuka, S. 1993. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathol.** 83(5): 495-502.
- Kono, Y.; Gardner, J. M.; Takeuchi, S. 1986. Structure of the host-selective toxins produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins. **Agri. Biol. Chem.**, 50: 801-804.
- Kunkell, B. N.; Brooks, D. M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 5:325-331.
- Kusaba, M.; Tsuge, T. 1994. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host specific toxins. **Appl. Environ. Microb.**, 60: 3055-3062.
- Kusaba, M.; Tsuge, T. 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxin on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Curr. Genet.**, 28: 491-498.
- Li, J.; Brader, G.; Kariola, T. e Palva, E. T. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. **Plant J.**, 46:477- 491.
- Li, J.; Brader, G.; Palva, E. T. (2004). The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. **Plant Cell**, 16:319-331.
- Lund, S. T.; Stall, R. E ; Klee, H. J. 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen. **Plant Cell.**, 10(3): 371–382.
- Markham, J. E.; Hille, J. 2001. Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. **Mol. Plant Pathol.**, 2: 229-240.
- Masunaka, A.; Tanaka, A.; Tsuge, T.; Peever, T. L.; Timmer, L. W.; Yamamoto, M.; Yamamoto, H.; Akimitsu, K. 2000. Distribution and characterization of *AKT*

- homologs in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathol.**, 90: 762-768.
- McDowell, J. M.; Dangl, J. L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. **Trends Biochem. Sci.** 25:79–82.
- Moeder, W.; Barry, S. C.; Tauriainen, A. A.; Betz, C.; Tuomainen, J. 2002. Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. **Plant Physiol.** 130:1918–26
- Mud, S. H.; Datko, A. H. 1990. The S-Methylmethyonine Cycle in *Lemna paucicostata*. **Plant physiol.**: 93:623-630.
- Nakashima, Y.; Ueno, T.; Fukami, H.; Taga, T.; Masuda, H.; Osaki, K.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S. 1985. Isolation and structure of AK-toxin I and II, host-specific metabolites produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. **Agri. Biol. Chem.**, 49: 807-815.
- Nawrath, C.; Heck, S.; Parinthewong, N.; Métraux, J. P. 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. **Plant Cell**, 14:275–86.
- Nawrath, C.; Métraux, J. P. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. **Plant Cell**, 11:1393–404
- Neves, E. M.; Dayoub, M.; Dragone, D. S. 2002. Demanda por fatores de produção na citricultura: fertilizantes e defensivos agrícolas. **Laranja**: 23: 37-56.
- Nie, X.; Singh, R. P.; Tai, G. C. 2002. Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. **Genome**, 45:905–13
- Norman-Setterblad, C.; Vidal, S.; Palva, E. T. 2000: Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. **Mol. Plant Microbe In.**, 13:430-438.
- Pallas, J. A; Paiva, N. L; Lamb, C.; Dixon, R. A. 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic

- acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. **Plant J.**, 10:281–93.
- Peever, T. L.; Olsen, L.; Ibáñez, A.; Timmer, L. W. 2000. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. **Phytopathol**, 90: 407-414.
- Penninckx, I. A.; Eggermont, K.; Terras, F. R.; Thomma, B. P.; De Samblanx, G. W. 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, 8:2309–23.
- Penninckx, I. A.; Thomma, B. P.; Buchala, A.; Metraux, J. P.; Broekaert, W.F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 10:2103–13.
- Peres, N. A. R.; Agostini, J. P.; Timmer, L. W. 2003. Outbreaks of *Aternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Dis.**87: 750.
- Pio, R. M.; Figueiredo, J. O.; Stuchi, E. S.; Cardoso, S. A. B. Variedade de copas. In: Mattos Jr., D. M.; Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e FUNDAG, 2005. p.37-60.
- Potuschak, T.; Lechner, E.; Parmentier, Y.; Yanagisawa, S.; Grava, S. 2003. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. **Cell** 115:679–89
- Rébeillé, F.; Jabrin, S.; Bligny, R.; Loizeau, K.; Gambonnet, B.; Wilder, V. V.; Douce, R.; Ravanel, S. 2006. Methionine catabolism in *Arabidopsis* cells is initiated by a  $\gamma$ -cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. **PNAS**, 103 (42): 15687-15692.
- Reis, R. F; Goes, A.; Mondal, S. N.; Shilts, T.; Brentu, F. C.; Timmer, L. W. 2006. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of Brown Spot of Tangerine. **Plant Dis.**, 90(8): 1051-1054.
- Schaller, A.; Stintzi, A. Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. In: Schaller A, editor. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Stuttgart: Springer; 2008. pp. 349–366.

- Schaller, F.; Zerbe, P.; Reinbothe, S.; Reinbothe, C.; Hofmann, E.; Pollmann, S. 2008. The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*- localization and cyclization. **FEBS Journal**, 275: 2428-2441.
- Schenk, P. M.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J. P.; Richmond, T.; Somerville, S. C. 2000 Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **PNAS**, 97: 11655-11660.
- Secex – Secretaria do Comércio Exterior. **Balança comercial brasileira (1993 – 2003)**. Disponível em: <<http://www.portaldosexportador.gov.br>>. Acesso em: 15 out. 2007.
- Solel, Z.; Kimchi, M. 1998. Histopathology of infection of *Minneola* tangelos by *Alternaria alternata* pv. *citri* and the effect of the host and environmental factors on lesion development. **J. Phytopathol.**, 146: 557-561.
- Sposito, M. B.; Feichtenberger, E.; Pio, R. M.; Castro, J. L.; Renaud, M. S. A. 2003 Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatol. Bras.**, 28: 231 (suppl)
- Staswick, P. E., Tiryaki, I. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 16, 2117–2127.
- Tanaka, A.; Shiotani, H.; Yamamoto, M.; Tsuge, T. 1999. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific *AK*-toxin in the pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Mol. Plant Microbe In.**, 12: 691-702.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA e Browse J 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. **Nature**, 448: 661–665.
- Thomma, B. P. H. J. *Alternaria* spp. from general saprophyte to specific parasite. 2003. **Mol. Plant Pathol.**, 4(4): .225-236.
- Thomma, B. P. H. J.; Eggermont, K.; Penninckx, I. A. M. A.; Mauch-Mani, B.; Vogelsang R. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:15107–11.

- Thomma, B. P.; Eggermont, K.; Tierens, K. F.; Broekaert, W. F. 1999. Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiol.**, 121:1093-1102.
- Thomma, B. P.; Penninckx, I. A.; Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. 2001. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. **Curr. Opin. Immunol.**, 13:63–68.
- Timmer, L. W.; Solel, Z.; Gottwald, T. R.; Ibanez, A. M.; Zitko, S. E. 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. **Phytopathol.**, 88:1218-1223.
- Van Loon, L. C.; Pierpoint, W. S.; Boller, T.; Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Mol. Biol. Rep.**, 12:245–64.
- Van Loon, L. C.; Rep, M.; Pieterse, C. M. 2006 Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 44:135–162.
- Van Loon, L. C.; Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, 55:85–97.
- Verberne, M. C.; Verpoorte, R.; Bol JF, Mercado-Blanco J, Linthorst HJM. 2000. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nat. Biotech.**, 18:779–83.
- Xie, D.; Feys, B. F.; James, S.; Neito-Rostro, M. e Turner, J. G. (1998). *COII*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280:1091-1094.
- Walton, J. D. 1996. Host-selective toxins: agents of compatibility. **Plant Cell**, 8:1723-1733.
- Wang, K. L. C.; Li, H.; Ecker, J. R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, 14: S131–51.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Ann. Bot. London**, 1-17.
- Wildermuth, M. C. 2006. Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. **Curr. Opin. Plant Biol.** 9:288–96
- Wolpert, T. J.; Dunkle, L. D.; Ciuffetti, L. M. 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? **Ann. Rev. Phytopathol.**, 40: 251-285.

Zimmerman, P.; Hirsch-Hoffman, M.; Hennig, L.; Gruissem, W. 2004.  
GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox.  
**Plant Physiol.** 136:2621–32.

## **6. CAPÍTULOS**

## **CAPÍTULO 1**

**The tangerine pathotype of *Alternaria alternata* asymptotically colonizes Pera sweet orange leaves**

**Rodrigo M. Stuart** and **Karen S. Kubo**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas/Laboratório de Biotecnologia, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), SP, Brasil; **Thiago S. Simões**, **Marinês Bastianel** and **Marcos A. Machado**, Laboratório de Biotecnologia, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), SP, Brasil.

Corresponding author: R. M. Stuart

E-mail: rodrigostuart@centrodecitricultura.br

Aceito para publicação na *Plant Disease*

## **ABSTRACT**

Stuart, R. M., Kubo, K. S., Simões, T. S., Bastianel, M., Machado, M. A. 2011. The tangerine pathotype of *Alternaria alternata* colonizes asymptotically Pera sweet orange leaves. Plant. Dis.

The tangerine pathotype of *A. alternata* produces the host-specific ACT-toxin that affects mandarins and their hybrids and causes the disease known as Alternaria brown spot (ABS). Sweet oranges are considered resistant to the disease since ABS symptoms have never been reported in the field. Here we demonstrate that an ACT-toxin-producing strain of *A. alternata* is able to penetrate and colonize Pera sweet orange leaves asymptotically without losing its ability to cause necrosis of susceptible genotypes. Light microscopy, inoculation and recovery of *A. alternata* from sweet orange leaves followed by subsequent cross-inoculation of susceptible leaves of Murcott tangor and PCR detection of the fungus in symptomless leaves collected in the field confirmed that Pera sweet orange may act as an asymptomatic host for the pathogen.

Additional keywords: mandarins; asymptomatic infection; Alternaria brown spot

## **INTRODUCTION**

The tangerine pathotype of *Alternaria alternata* causes the disease known as Alternaria brown spot (ABS), affecting mandarins and several of their hybrids. The fungus produces the host-specific ACT-toxin, which causes necrosis in susceptible genotypes (1, 6, 7, 8, 12,

13). The mode of action of the ACT-toxin is not clear, but evidence suggests that it initially affects the plasma membrane of susceptible cells (9).

The disease infects young twigs, leaves and fruit. Symptoms include brown to black necrotic spots surrounded by a yellow halo. Chlorosis and necrosis continue to expand along the veins due to the spread of the toxin. Severe cases of ABS can lead to abscission of the fruits and leaves and death of the entire shoot. Depending on the fungal strain and plant susceptibility, symptoms can appear 16 to 48 h after inoculation (20).

The disease cycle of ABS appears simple. Conidiophores emerge through the lesions and/or stomata of infected leaves that remain on the tree or have fallen to the grove floor. Conidia are released by rainfall events or sudden changes in relative humidity (19). They are easily dispersed by wind currents and rain drops, being deposited on the surface of susceptible fruits and leaves. Conidia germinate in high moisture environments and penetration occurs through stomata or the formation of appressoria on both sides of leaf surface (1, 18). After penetration, necrotic halos are observed surrounding appressoria due to the rapid spread of ACT-toxin in susceptible tissues. Conidiophores produce conidia that are released and deposited on the surface of susceptible fruits and leaves, starting a new disease cycle.

Although necroses were reported when detached leaves of Valencia, Shamouti and Washington Navel sweet oranges were treated with ACT-toxin or an *A. alternata* conidial suspension (8, 18), research focusing on the resistance and susceptibility of citrus genotypes has demonstrated that sweet oranges are resistant to ABS under field conditions (4, 8, 15, 18).

In this study, we experimentally demonstrated that an isolate of *A. alternata* that produces the host-selective ACT-toxin and is pathogenic to Murcott tangor is able to penetrate and grow inside Pera sweet orange leaves without causing macroscopic disease symptoms. Our findings suggest that this species can act as asymptomatic host for the tangerine pathotype of *A. alternata*.

## MATERIALS AND METHODS

**Biological material.** The experiments were conducted with susceptible Murcott tangor (*Citrus sinensis* Osb. x *C. reticulata* Blanco) and resistant Pera sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osb.), both grafted onto Rangpur lime (*C. limonia* Osb.). Citrus budwood was obtained from the mother blocks of the Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC, Cordeirópolis, SP, Brazil. The inoculations were performed with strain AT4303 of the tangerine pathotype of *A. alternata*, previously obtained from a severely infected Murcott tangor fruit collected in Campo Alegre Farm, Aguaí, SP, Brazil.

**Light microscopy analysis of *A. alternata* colonization.** A conidial suspension ( $10^6$  spores / ml) was produced and sprayed onto young leaves (3-5 cm) following methods of Canihos and coworkers (3). Twenty six-month-old plants of Murcott tangor and Pera sweet orange were inoculated in February, 2010 during the Brazilian summer and the plants were maintained in a greenhouse under natural environmental conditions (20 – 32°C; 80% relative humidity; 14/10 LD cycle; sunrise at 06:00, sunset at 20:00). Leaves were removed and observed under a light microscope 6, 9 and 12 h post inoculation. For microscopic analyses, inoculated leaves were collected, and fixed/cleared in ethanol:glacial acetic acid (3:1 v/v) for at least 72 h. Subsequently, leaves were immersed in distilled water for 4 h to

remove the fixative and fungal structures were stained by immersing leaves in a lactophenol aniline blue solution (0.5% w/v aniline blue in equal volumes of lactic acid, glycerol, phenol and water) for 30 s followed by a final rinse in distilled water to remove excess dye. The leaf surfaces and hand-cut transverse sections of both genotypes were examined under the microscope.

#### **Inoculation and recovery of *A. alternata* from Pera sweet orange in the greenhouse.**

To evaluate the capability of *A. alternata* to asymptotically colonize Pera sweet orange, mycelial plugs (5 mm<sup>2</sup>) removed from the edge of a 7-day-old culture of *A. alternata* (4303) were placed onto leaves and removed after 4 days. A total of 42 young leaves (3-4 cm length) distributed on seven plants were inoculated and plants were maintained under greenhouse conditions. Murcott tangor plants were used as positive control. Twenty-six days after plugs were removed, leaves were collected and surface disinfested using serial washing in 70% ethanol for 1 min, sodium hypochlorite solution (2% available Cl<sub>2</sub>) for 3 min, 70% ethanol for 30 s and two rinses in sterilized distilled water. The efficiency of the disinfestation process was checked by plating aliquots of the sterile distilled water used in the final rinse on PDA. Two leaves per plant (total of 14) were collected for DNA extraction according to Murray and Thompson (14) and PCR amplification with specific primers for the *A. alternata* ACT-toxin gene cluster as described below. The remaining 28 leaves were cut into pieces 8 to 10 mm<sup>2</sup> in area (for a total of 224 leaf fragments) and aseptically transferred onto plates (six fragments per plate) containing PDA supplemented with 100 mgml<sup>-1</sup> of ampicillin and tetracycline to suppress bacterial growth; and 100 ppm of carbendazim to reduce fungal contamination and facilitate *A. alternata* isolation. The isolates that emerged from sweet orange leaves and were morphologically similar to *A.*

*alternata* were cross-inoculated in detached leaves of susceptible Murcott to confirm their capability to develop ABS symptoms. PCR amplification of rDNA, and ACT-toxin biosynthesis gene clusters was performed for the strain AT4303 and for the isolates recovered from Pera leaves.

**Fungal DNA extraction and amplification of rDNA and ACT-toxin biosynthesis gene clusters.** DNA was purified from fungal cultures according to Raeder and Broda (17). Amplification of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA was performed with the universal primer pair ITS5F (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') and ITS4R (5'TCCTCCGCTTA TTGATATGC3'). ACTT1 gene, from ACT-toxin biosynthesis gene cluster, was amplified using the primer pair ACTT1F2 (5'CACAGGCTATCTTCACATGC3') and ACTT1R2 (5'CGTAGCTCCATAGCATTGCT3') from Masunaka and coworkers (11). PCR consisted of 35 cycles corresponding to denaturing for 30 s at 94°C, primer annealing for 30 s at 55°C, and extension for 45 s at 72°C for both primers pairs. PCR products were visualized under UV light in 1.0% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide.

**Detection of the tangerine pathotype of *A. alternata* in symptomless leaves of Pera sweet orange collected in the field.** In order to detect the endophytic colonization of *A. alternata* in non-susceptible plants, DNA extraction and PCR amplification of the ACT-toxin biosynthesis gene cluster from field collected symptomless Pera sweet oranges leaves were performed. Forty-two leaves (5-10 cm length) of one sweet orange plant grown beside an ABS-affected Dancy mandarin (*C. reticulata* Blanco) in a severely affected area, were randomly collected, surface disinfested and the DNA was extracted as described previously. Infected Dancy leaves were used as a positive control. PCR was performed with 20 ng of plant DNA using the primers ACTT1F2 and ACTT1R2 as previously described.

To evaluate the capability of *A. alternata* to sporulate on symptomless leaves of Pera sweet orange, 25 leaves (5-8 cm long) were collected in the field and fixed directly for light microscopy, as described previously. Additionally, 25 other leaves were collected, washed in tap water, surface disinfested, and aseptically placed with the abaxial side facing up onto Petri dishes lined with filter paper disks. The paper disks were moistened with 700  $\mu$ L of autoclaved distilled water and the dishes were sealed with a plastic film and incubated at 27°C. The experiment was divided into five blocks, each block containing five leaves, in a randomized complete block design. To standardize the experiment, one leaf per block was collected arbitrarily and fixed for light microscopy between 35 and 39 days post incubation in a moist chamber. Leaves of a susceptible Dancy mandarin were also collected and fixed to compare the differences between genotypes.

## RESULTS

**Light microscopic analysis of *A. alternata* colonization.** Light microscopy of inoculated Pera sweet orange and Murcott tangor leaves showed that conidia of *A. alternata* germinated and germ tubes developed 6 h after fungal inoculation (data not shown). Appressoria were observed between 9 and 12 h post inoculation on the surfaces of Murcott and Pera leaves (Fig.1A-B, 1F-G).

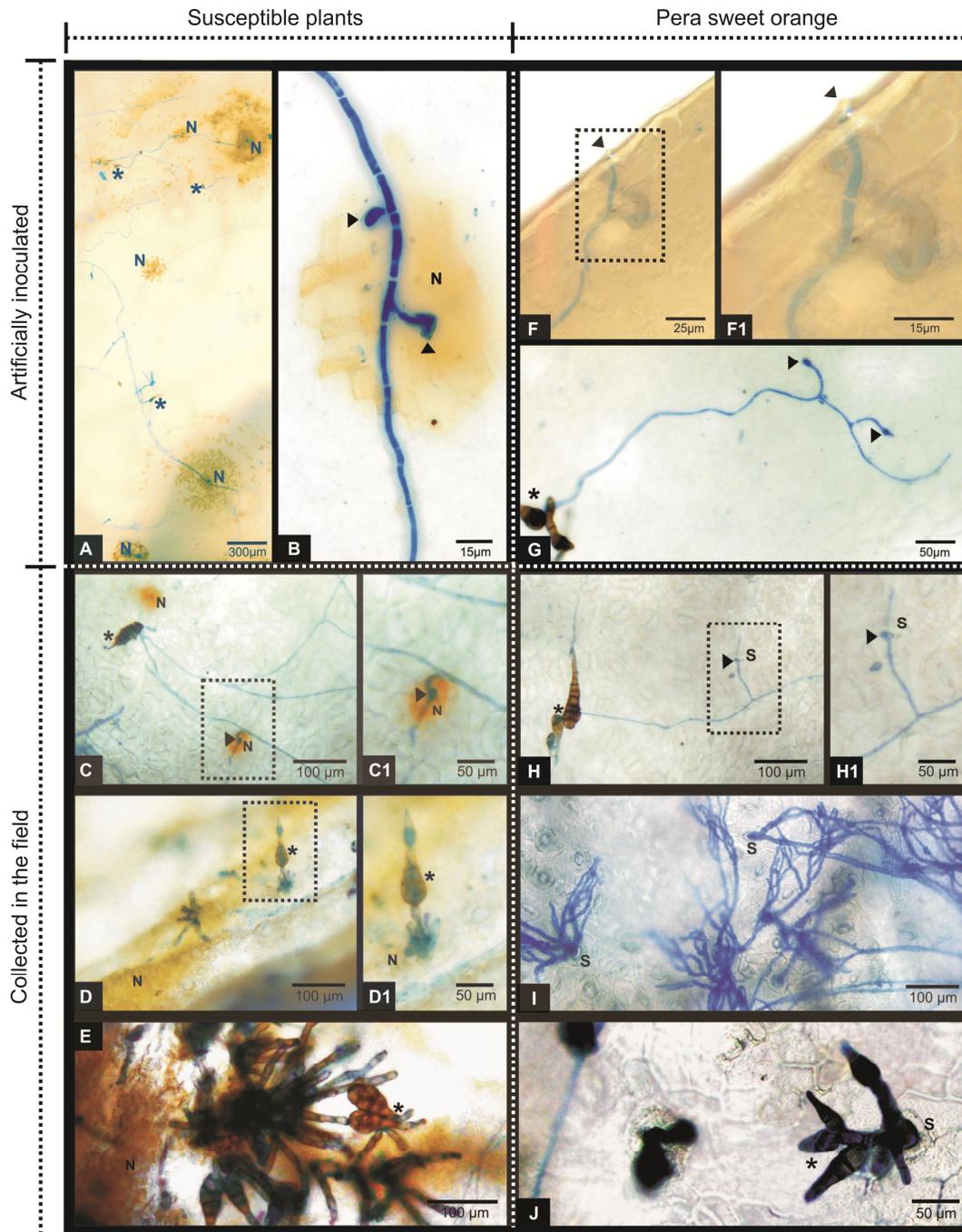
Necrosis began concomitantly with appressorium formation and occurred only in susceptible Murcott cells as expected (Fig.1A, 1B). Necrosis started to spread around appressoria and increased over time. Necrotic symptoms were not detected in Pera sweet orange cells (Fig.1G). Hand-cut transverse sections demonstrated that hyphae were able to penetrate leaf tissues without causing any disease symptoms (Fig.1F).

### **Inoculating and recovering *A. alternata* from Pera sweet orange in greenhouse.**

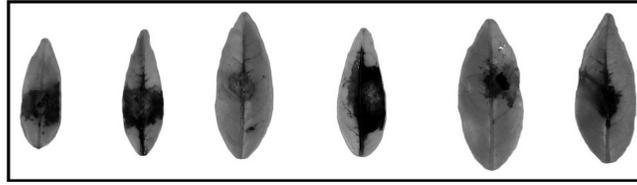
Symptoms of ABS or the hypersensitive response were not detected in Pera leaves even 30 days post-inoculation. Thirty-six of the 67 fungal colonies (53.7%) recovered from symptomless sweet orange leaves 30 days post-inoculation had showed typical *A. alternata* conidia under light microscopy. To confirm the identity of the isolated fungi as the tangerine pathotype *A. alternata*, the rDNA and ACT-toxin gene (*ACTT1*) were amplified and these isolates were cross-inoculated onto detached Murcott tangor leaves. Twenty-seven of the 36 isolates caused typical symptoms of ABS on Murcott leaves (Fig.2). The same 27 isolates showed positive amplification of ACT-toxin biosynthesis gene confirming their identity (supplementary material, S1; ANEXOS). The remaining 31 isolates that were not similar to *A. alternata*, and the nine *A. alternata* isolates that neither developed symptoms nor showed positive amplification of *ACTT1* gene, are probably non-pathogenic isolates that were present in leaves before inoculation.

We considered that the leaf surface disinfestation process completed prior to fungal recovery was efficient, since no fungal colonies were observed after plating aliquots of the water used in the final leaf rinse on PDA.

The *ACTT1* gene was detected in DNA extracted from the remaining artificially inoculated Pera leaves and revealed the presence of the pathogenic *A. alternata* in ten (71.4%) of the 14 asymptomatic leaves selected for analysis (supplementary material, S1; ANEXOS).



**Fig.1.** Light microscopy of citrus leaves infected with *Alternaria alternata*. **A** and **B**. Adaxial surface of susceptible Murcott tanger leaf after *A. alternata* inoculation. **C** – **E**. Leaf surface of diseased Dancy mandarin collected in the field. **F**. Hand-cut transverse sections of a Pera sweet orange leaf after *A. alternata* inoculation. **G**. Adaxial surface of Pera sweet orange leaf after inoculation. **H**. Abaxial surface of a Pera sweet orange leaf collected in the field. **I** and **J**. Abaxial surface of Pera sweet orange leaves collected in the field and maintained in moist chamber. Arrows indicate appressoria; letters followed by (1) indicate magnification of area in dashed boxes; (N) necrosis; (\*) conidia; (S) stomata.



**Fig.2.** Example of typical necrotic symptoms of *Alternaria* brown spot in susceptible leaves of Murcott tangerine after inoculation with *Alternaria alternata* recovered from Pera sweet orange.

As a control for the experiment, 14 leaves from non-inoculated sweet orange plants were collected and PCR was conducted to detect *A. alternata*. None of the leaves showed positive amplification of *ACTT1* gene.

**Detection of the tangerine pathotype of *A. alternata* in symptomless leaves of Pera sweet orange collected in the field.** *A. alternata* ACT-toxin biosynthesis gene was amplified from DNA extracted from symptomless Pera sweet orange leaves obtained from a plant grown beside a severely infected Dancy mandarin in the field. From seven (16.7%) of the 42 symptomless leaves collected in the field, the *ACTT1* gene was amplified indicating that *A. alternata* was present. (supplementary material, S1; ANEXOS).

The plant material collected in the field and directly observed by light microscopy did not show conclusive results regarding the release of *A. alternata* from Pera tissues. Although we found *A. alternata* conidia on Pera leaf surfaces, we were not able to find conidiophores, suggesting that the conidia came from adjacent environments. We observed germinated *A. alternata* conidia on both adaxial and abaxial leaf surfaces. *A. alternata* produced appressoria and penetrated Pera sweet orange tissues, as was observed during artificial inoculation. The only exception is that penetration through stomata was not

observed during artificial inoculation, whereas it was in leaves collected in the field (Fig. 1H). Necrosis was not observed surrounding appressoria formed on Pera leaves; in contrast, typical necroses were produced on susceptible Dancy mandarin around the appressoria (Fig. 1C).

To simulate leaf decomposition and try to observe the release of *A. alternata* from Pera sweet orange tissues, leaves were collected in the field, surface disinfested, and maintained in moist chamber. Leaves were observed every five days in order to find visual signs of fungal development or leaf decomposition. After 35 days, leaves were light green, and tiny brown spots were visible to the naked eye on the surface of almost all of the 25 leaves. The lesions corresponded to where the fungal mycelia have arisen from inside the leaves. Both adaxial and abaxial surfaces showed fungal development (supplementary material, S2; ANEXOS). Necroses were not observed surrounding spots and significant differences were not evident during the following four days. When observed by light microscopy, the growth of fungal mycelia was greater than the expected. Plant cell borders remained well defined and signs of cell death were not easily observed. Hyphae were observed arising from stomata (Fig. 1I), and conidia from other endophytic fungi were also observed (data not shown). In two leaves, conidiophores and conidia of *A. alternata* were observed on leaf surface, and arising from stomata without necrosis (Fig. 1J). In contrast, conidiophores and conidia of *A. alternata* were produced on necrotic sites in susceptible Dancy mandarin (Fig. 1D, E).

## DISCUSSION

Host-selective toxins (HSTs) are typically active only toward plants that serve as hosts for the pathogens that produce them (21). The toxin allows the fungus to overcome or suppress plant defense mechanisms during infection (10). Most toxin-producing pathogens, including those that produce HSTs, are necrotrophs (21). Necrotrophs not only kill their hosts by secretion of toxins or reactive oxygen species (ROS), but they usually secrete large amounts of cell wall-degrading enzymes and often cause significant tissue damage (5). This was clearly observed during the interaction between Murcott tangor and the ACT-toxin producer *A. alternata*, where necrosis was observed by light microscopy surrounding appressoria after their formation (Fig.1A, 1B). Surprisingly, when analyzing the interaction between Pera sweet orange and *A. alternata*, necroses were not observed. Our first hypothesis was that Pera was able to prevent the formation of penetration peg of *A. alternata* in the site of appressorium formation. However, transverse sections demonstrated that hyphae were able to penetrate leaf tissues without causing any symptom (Fig. 1F).

The asymptomatic infection of a pathogenic isolate of *A. alternata* in sweet orange tissues was supported after mycelial plug inoculation, confirming that the tangerine pathotype can persist inside Pera sweet orange leaves for at least 30 days without causing any visible disease symptoms. Instead of spraying conidial suspension onto leaves, mycelial plugs were used in attempt to encourage disease symptoms. Considering that the inoculation method can produce false positive ABS symptoms as a result of inoculum pressure, we expected to see symptoms in attached Pera leaves after plug inoculation. We conclude that even under optimal conditions for fungal infection, Pera did not show ABS symptoms, indicating its resistance to the toxin. The development of ABS symptoms in

leaves of susceptible Murcott tangerine, inoculated with isolates of *A. alternata* recovered from artificially inoculated sweet orange leaves indicates that the fungus was able to colonize sweet orange without losing its ability to cause disease in susceptible genotypes.

The presence of the tangerine pathotype of *A. alternata* in 16.7% of leaves collected from sweet orange grown under high inoculum pressure was confirmed by PCR. Considering that leaf surfaces were effectively disinfested prior to DNA extraction, we concluded the amplification of *ACTT1* gene occurred from fungal DNA present inside leaves. This corroborates the data obtained from experimental inoculations and indicates that fungus can asymptotically infect Pera sweet orange under natural conditions. However, based on these data, it is impossible to predict whether or not all of the 16.7% of the leaves were infected with the living fungus.

Light microscopy of sweet orange leaves collected in the ABS-affected area was performed to identify how *A. alternata* was released from Pera tissues. From the leaf surfaces we observed *A. alternata* conidia germinating and the fungus penetrating the leaves as similarly observed during artificial inoculation. Additionally, leaves collected in the field showed the fungus penetrating through stomata without visible disease symptoms. Although, penetration was observed, signs of *A. alternata* sporulation were not, suggesting that conidia observed on leaf surface came from adjacent environments. When analyzing surface disinfested leaves maintained in a moist chamber, hyphae, conidiophores and conidia of fungal endophytes were observed emerging through stomata, as well as *A. alternata* conidiophores and conidia. Since we also isolated nonpathogenic *A. alternata* from sweet orange leaves, we cannot confirm that the conidia and conidiophores arising from stomata of senescent leaves belong to pathogenic *A. alternata*.

Although the disease cycle of ABS seems simple, the asymptomatic presence of *A. alternata* in sweet oranges could be epidemiologically significant for susceptible plants, since sweet oranges could act as fungal reservoir. The evidence presented here suggests that in alternative citrus hosts, conidiophores emerge from leaf litter on the grove floor, and conidia can be dispersed to adjacent plants. When finding genotypes susceptible to the ACT-toxin, *A. alternata* acts as a pathogen and causes disease; however when finding genotypes resistant/tolerant to the toxin, the fungus can act as an endophyte colonizing plant tissues asymptotically (Fig 3.). This hypothesis is supported by the fact that necroses were not observed in sweet orange tissues and that the fungus remained pathogenic to susceptible plants.

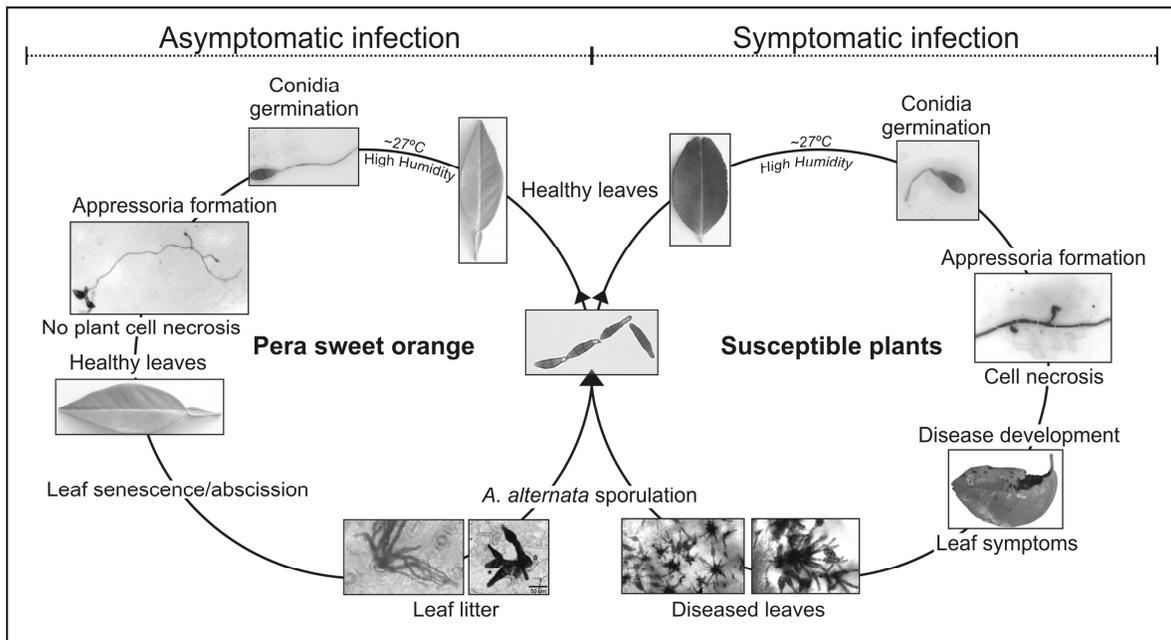


Fig.3. Presumed life cycle of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* in Pera sweet orange leaves and in susceptible plants.

It is well established that ACT-toxin is responsible for disease development in susceptible plants. Treatment of nonpathogenic spores of *A. alternata* (Tox<sup>-</sup>) with ACT toxin after they have been sprayed onto leaves did not alter percent spore germination, number of germ tubes per spore, or the percent appressoria per germ tube on susceptible or resistant plants; however, the percentage of infection hyphae per appressorium was higher on susceptible plants than in resistant ones, indicating that ACT-toxin favors infection in the first group (9). It was also observed that ACT-toxin induced the plasma membrane to invaginate near plasmodesmata in susceptible plants (9). Nevertheless, around 9% of nonpathogenic spores treated with ACT-toxin formed infection hyphae in resistant rough lemon plants indicating that they were able to infect resistant leaves in the presence of the toxin (9).

Since ABS was described, the macroscopic observation of symptoms has been used to infer pathogenicity. It is evident that disease manifestation demonstrates that plants are susceptible to both the toxin and the fungus. However, when considering the data demonstrated here, we conclude that the absence of symptoms just indicates that plants are resistant to the toxin, but does not exclude the possibility of an asymptomatic infection.

Our data are also consistent with a report by Peever and coworkers (16) in which they evaluated host specificity and population genetic structure of *Alternaria* spp. and found that the majority of isolates sampled from rough lemon lesions were pathogenic only to rough lemon and not to Minneola tangelo, although a few rough lemon isolates were able to induce disease on Minneola, but not on rough lemon. The authors suggested that these isolates were colonizing lesions of rough lemon as saprophytes or endophytes that were present in leaves prior to infection.

The occurrence of asymptomatic infection was also reported for the *Alternaria tenuissima* group when infecting *Amaranthus hybridus* leaves (2). When field-collected and artificially inoculated leaves of *A. hybridus* with isolates of *A. tenuissima* were analyzed, the fungus could infect and colonize leaves in a manner consistent with other endophytic fungi. That disease developed after leaf wounding suggesting that these fungi can act as latent leaf pathogens that emerge when the host is injured.

In our case, disease symptoms were not detected in Pera leaves even 30 days post-inoculation when the fungus was recovered. These plants were not wounded or otherwise stressed to encourage disease symptoms.

The *A. alternata* – citrus interaction is not yet fully understood. To our knowledge, this work represents the first demonstration that an *A. alternata* ACT-toxin producer can asymptotically colonize an alternative citrus host. In this case when the fungus colonizes Pera sweet orange, it adopts a lifestyle that is similar to an endophyte. Asymptomatic infection on alternative citrus hosts may have a role in the epidemiology of ABS. How long *A. alternata* can persist inside Pera leaves and what is the role of the asymptomatic infection is one of the questions that should be addressed in the future.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank V. S. Mafra and Dr. J. Freitas-Astúa for valuable discussions and critical review of the manuscript. We thank FAPESP (Proc. no. 07/00931-3 and 07/08698-6) for financial support.

## LITERATURE CITED

1. Akimitsu, K., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2003. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Mol. Plant Pathol.* 4:435-436.
2. Blodgett, J. T., and Swart, W. J. 2002. Infection, colonization and disease of *Amaranthus hybridus* leaves by the *Alternaria tenuissima* group. *Plant Dis.* 86:1199-1205.
3. Canihos, Y., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 1999. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. *Plant Dis.* 83:429-433.
4. Gardner, J. M., Kono, Y., and Chandler, J. L. 1986. Bioassay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 20:293-304.
5. Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., and Deising, H. B. 2010. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *J. Plant Physiol.* doi:10.1016/j.jplph.2010.06.014.
6. Kohmoto, K., Scheffer, R. P., and Whiteside, J. O. 1979. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. *Phytopathology* 69:667-671.
7. Kohmoto, K., and Otani, H. 1991. Host recognition by toxigenic plant pathogens. *Experientia* 47:755-764.
8. Kohmoto, K., Akimitsu, K., and Otani, H. 1991. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. *Phytopathology* 81:719-722.
9. Kohmoto, K., Itoh, Y., Shimomura, N., Kondoh, Y., Otani, H., Kodama, M., Nishimura, S., and Nakatsuka, S. 1993. Isolation and biological activities of two host-selective toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 83:495-502.
10. Markham, J. E., and Hille, J. 2001. Host-selective toxins as agents of cell death in plant–fungus interactions. *Mol. Plant Pathol.* 2:229–239.
11. Masunaka, A., Tanaka, A., Tsuge, T., Peever, T. L., Timmer, L. W., Yamamoto, M., Yamamoto, H., and Akimitsu, K. 2000. Distribution and characterization of AKT

- homologs in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 90: 762-768.
12. Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, A., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T. L., and Akimitsu, K. 2008. Functional analysis of a multicopy host-selective ACT-toxin biosynthesis gene in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* using RNA silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:1591-1599.
  13. Miyamoto, Y., Ishii, Y., Honda, A., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T. L., and Akimitsu, K. 2009. Function of genes encoding Acyl-CoA synthetase and Enoyl-CoA hydratase for host-selective ACT-toxin biosynthesis in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 99: 369-377.
  14. Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
  15. Pegg, K. G. 1966 Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal organism of brown spot of Emperor mandarin. *Queensl. J. Agric. Sci.* 23:15-28.
  16. Peever, T. L., Canihos, Y., Olsen, L., Ibañez, A., Liu, Y. C., and Timmer, L. W. 1999. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola tangelo* and rough lemon in Florida. *Phytopathology* 89:851-860.
  17. Raeder, U., and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.
  18. Solel, Z., and Kimchi, M. 1998. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. *J. Phytopathol.* 145:389-391.
  19. Timmer, L. W., Solel, Z., Gottwald, T. R., Ibañez, A. M., and Zitko, S. E. 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology* 88:1218-1223.
  20. Timmer, L. W., Peever, T. L., Solel, Z., and Akimitsu, K. 2003. *Alternaria* diseases of citrus—Novel pathosystems. *Phytopathol. Mediterr.* 42: 99-112.
  21. Wolpert, T. J, Dunkle, L. D, and Ciuffetil, L. M. 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:251-285.

## CAPÍTULO 2

### Modelo de resposta de defesa em plantas de citros susceptíveis e resistentes à *Alternaria alternata*

#### RESUMO

Para avaliar o comportamento de genes envolvidos em vias de resposta de defesa moduladas pelos hormônios vegetais ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), genes de *Arabidopsis thaliana* foram utilizados para buscar seqüências ortólogas em citros. As seqüências com maior similaridade foram utilizadas para o desenho de *primers* que foram utilizados para análise de genes transcritos por RT-qPCR 6h e 12h após a inoculação do fungo *A. alternata*. Para as análises foram utilizadas as variedades tangor ‘Murcott’ (susceptível), tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ (resistentes). Foi utilizada também laranja doce como hospedeiro assintomático do fungo. Três perfis de expressão foram identificados, sendo um referente à resposta na variedade susceptível, outro à resposta nas variedades resistentes, e o terceiro à resposta tolerante de laranja ‘Pera’. Os dados demonstraram que existe grande contribuição dos genes envolvidos nas vias de sinalização por JA/ET na resposta de plantas resistentes. A rápida indução da expressão de uma quitinase básica (*CitPR3 - pathogenesis-related gene 3*) após inoculação com o fungo parece estar diretamente relacionada à resistência em ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’. Enquanto em laranja ‘Pera’ a via de sinalização predominantemente ativada refere-se a síntese de flavonóides, com expressão dos genes que transcrevem para síntese das enzimas fenilalanina-amônia-liase (PAL) e chalcona sintase (CHS). Em plantas susceptíveis de ‘Murcott’ não houve indução das vias de sinalização por SA e JA após a inoculação com o fungo. Interessantemente, genes relacionados à transcrição de enzimas responsáveis pela

síntese de etileno, como metionina-S-metiltransferase (MMT) e 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO), apareceram induzidos após inoculação com o fungo, sugerindo participação de etileno no processo de infecção. Para testar esta hipótese, plantas foram tratadas com o precursor de etileno e seu competidor, ethephon e 1-metilciclopropeno (1-MCP), respectivamente. A aplicação de 1mM ethephon promoveu o aumento das lesões, enquanto a aplicação do competidor de etileno 1-MCP retardou o aparecimento dos sintomas, confirmando o papel de etileno no desenvolvimento da doença.

Palavras chave: sinalização molecular; necrotrófico; citros; Mancha marrom de alternaria

## **INTRODUÇÃO**

Em resposta ao ataque de microrganismos as plantas ativam cascatas complexas de sinalização que levam à produção local e sistêmica de um grande espectro de compostos antimicrobianos (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996). Hormônios vegetais como ácido salicílico (SA), etileno (ET) e ácido jasmônico (JA) aparecem como peças fundamentais na regulação destas respostas (DURRANT e DONG, 2004; GRANT e LAMB, 2006; VON DAHL e BALDWING, 2007). Vias dependentes de SA, ET e JA regulam respostas de defesa que são específicas para diferentes tipos de patógenos. De modo geral, patógenos que requerem células vivas do hospedeiro para completarem seus ciclos de vida (biotróficos) são mais sensíveis a respostas de defesa mediadas por SA, enquanto patógenos que matam as células do hospedeiro para se nutrirem (necrotróficos) são afetados principalmente por defesas mediadas por ET e JA (GLAZEBROOK, 2005; THOMMA, 2001). Existe ampla evidência da interação positiva ou negativa entre as vias

de sinalização mediadas por SA, ET e JA, garantindo que a sinalização requerida em cada modo de interação seja a mais efetiva para conferir resistência (GLAZEBROOK, 2003).

A maioria dos trabalhos descreve os modelos de interação planta-patógeno com base na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. No caso de plantas de citros (*Citrus* spp.), o pouco que se conhece dos modelos de interação se baseia em estudos de transcriptoma (bibliotecas de ESTs – *Expressed Sequence Tags*; e microarranjos) durante a interação citros-patógenos, tendo como alicerce os modelos descritos em *A. thaliana*. O pouco que se conhece sobre a interação entre citros e *A. alternata* refere-se à interação entre limão rugoso (*C. jambhiri*) e *A. alternata* não patogênico, onde através de RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*) foram identificados genes induzidos relacionados a uma lipoxigenase (*RemLOX2*), uma chalcone sintase (CHS) (GOMI *et al.*, 2001) e a uma miraculina (*RemMLP2*) (TSUKUDA *et al.*, 2006) durante o processo de infecção. No caso do patótipo tangerina do fungo *A. alternata*, estudos focando o mecanismo molecular da interação planta-patógeno são praticamente inexistentes. Desta forma, o presente trabalho visou identificar o modelo de resposta conferida em citros após a inoculação com o fungo *A. alternata* patótipo tangerina através da análise de genes modulados nas vias de sinalização por SA, ET /JA por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material biológico.**

Todos os experimentos foram conduzidos com plantas suscetíveis de tangor ‘Murcott’, resistentes de tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’, e plantas de laranja ‘Pera’. Todas as plantas foram enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osb.). As inoculações foram realizadas com isolado AT4303 de *A. alternata*.

### **Desenho de *primers*.**

O desenho de *primers* baseou-se em genes de *Arabidopsis thaliana* envolvidos nas vias de sinalização por ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), obtidos através da base de dados TAIR (*The Arabidopsis thaliana Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>) e utilizados como moldes para busca de seqüências ortólogas em citros através da ferramenta tBLASTn contra 110.912 unigenes presentes na base de dados do CitEST (*Citrus Expressed Sequence Tags*, <http://biotecnologia.centrodecitricultura.br/>). Os *primers* foram desenhados através do software Oligo Explorer v.1.1.2 (Teemu Kuulasmaa, University of Kuopio, Finland) para a amplificação de fragmentos com comprimento em torno de 100pb e temperatura de anelamento em torno de 60°C. A especificidade dos *primers* foi checada *in silico* contra o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta Primer-BLAST. Os *primers* selecionados foram testados por PCR e os *amplicons* foram seqüenciados (ABI 3730 – Applied Biosystems) para confirmar suas identidades. Um *amplicon* contendo uma região intrônica foi escolhido para o desenho de *primers* para o gene *CitUBQ* permitindo a verificação da ausência de contaminação por DNA genômico após a síntese de cDNA. A seqüência dos *primers*, suas eficiências e homologias são demonstradas na Tabela 1.

### **Inoculação das plantas com *A. alternata*.**

Quatro semanas antes da inoculação as plantas foram podadas para induzir a formação de novos ramos e brotações. Durante todo o experimento as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a  $27 \pm 1$  °C, com  $75 \pm 5\%$  de umidade relativa, sob luz fluorescente constante. A inoculação foi realizada em folhas jovens (3-5 cm) através de suspensão de esporos ( $10^6$  esporos/mL) de acordo com metodologia de Canihos e

colaboradores (1999). As folhas foram removidas 6h e 12 h após inoculação e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O experimento foi conduzido em cinco repetições biológicas para cada tempo em cada tratamento. As folhas congeladas foram armazenadas a -70°C para posterior extração de RNA, conforme descrito posteriormente.

#### **Efeito de ethephon e 1-metilciclopropeno (1-MCP) na infecção por *A. alternata*.**

Folhas de tangor ‘Murcott’, laranja ‘Pera’, tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ foram borrifadas com 1mM, 3mM, 7mM e 11mM de ethephon (Sigma) em água, e inoculadas com discos de micélio (5mm<sup>2</sup>) removidos das bordas de culturas de *A. alternata* (AT4303) cultivadas por sete dias. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e o diâmetro das lesões foi avaliado 24h, 48h, 72h e 96h após a inoculação com o fungo. Plantas não tratadas, porém inoculadas com o fungo, foram utilizadas como controle. As repetições biológicas foram compostas por cinco plantas por tratamento (quatro folhas por planta) em cada tempo amostral. Adicionalmente, para avaliar o efeito de ethephon sobre o desenvolvimento do fungo, cinco placas contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) foram borrifadas com as mesmas concentrações de ethephon descritas anteriormente e repicadas com disco micelial do fungo (5 mm Ø). Como controles foram utilizadas cinco placas não borrifadas. As placas foram incubadas a 27°C e o diâmetro das colônias foi medido diariamente durante sete dias.

**Tabela 1.** Genes de citros putativamente associados às vias de sinalização por ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), genes referência, suas similaridades com seqüências no TAIR e GenBank, e suas seqüências de *primers* utilizadas para avaliação da resposta por RT-qPCR frente à inoculação com *A. alternata*.

Gene name	CitEST	Acession	TAIR database			Genbank database			Primers		
			<i>A. thaliana</i> orthologous locus	<i>A. thaliana</i> anotation	Similarity (e-value)	Identity (%)	Genbank Accesion	Definition	Similarity (e-value)	Identity (%)	Sequence (5'-3')
CitPAL2	CAS-CR-205220	AT3G53260	Phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2)	0.0	84	CAB42794	Phenylalanine-ammonia lyase ( <i>Citrus clementina</i> x <i>C. reticulata</i> )	0.0	98	F - CACAAATTGAAGCACCATCC R - TTCTCAGGGCATAACGATCC	0.90 ± 0.005
CitCHS	CAS-CS-207154	AT5G13930	Chalcone synthase (AtCHS)	0.0	79	EU410483	Chalcone synthase ( <i>C. sinensis</i> cultivar ruby)	1e-68	96	F - AGTCTGAGGAAGCGAAA R - CAAGCTTTGATGGGGACACT	0.92 ± 0.008
CitNPR1	CAS-CR-215753	AT5G45110	NPR1-like protein 3	3e-83	78	XP_002322351	NPR1/NIM1-like regulatory protein ( <i>Populus trichocarpa</i> )	2e-102	70	F - TCTGGAGGGAGAAATGAGG R - TGTGGGAGGTGATAAAGGC	0.91 ± 0.009
CitPR1	CAS-CS-122258	AT2G14610	Pathogenesis-related gene 1 (AtPR1)	3e-68	57	NP_001152581	Pathogenesis-related PR-1 ( <i>Zea mays</i> )	5e-53	68	F - TTCGGAGAAGAAGTCGTATG R - ACACCTCTCCACAAAAC	0.90 ± 0.010
CitMKP1	CAS-CS-125760	AT3G55270	MAP kinase phosphatase (MKP1)	8e-48	61	BAE44440	MAP kinase phosphatase 1 ( <i>Solanum tuberosum</i> )	1e-58	60	F - GTTCAACTGAACCCCTTGA R - CACGGCATCACTCCCTAAAT	0.90 ± 0.008
RemLOX2*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	F - CCGTAAGCGGATTGATAGG R - TGGTGCCAACTTGAGAAAC	0.98 ± 0.005
CitCOI1	CAS-CS-107950	AT2G39940	COI1	1e-108	76	ABR45955	COI1 ( <i>A. thaliana</i> )	3e-106	81	F - CGATAACGGCTCTGTAATGG R - CAGACCAAACCGTCTTAGC	0.91 ± 0.010
CitMYC2	CAS-CR-200534	AT1G32640	AtMYC2	4e-79	64	XP_002519814	Transcription factor AtMYC2, putative ( <i>Ricinus communis</i> )	3e-89	66	F - GTTGTGTTGCTGTTGTTGG R - AGCCCTGTAATGAAGAACC	0.94 ± 0.010
RemMLP2**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	F - TAGCAACGTTTCAGCTCC R - GCCTGAATCCCAGTAACCAA	0.92 ± 0.006
CitPR3	CIT-CW-700833	AT3G12500	Pathogenesis-related gene 3 (PR3) basic chitinase	1e-140	70	BAG28346	Chitinase ( <i>C. unshiu</i> )	1e-148	99	F - AAAGCAGCTAGGTCCACA R - CTTACTGGATAGGGTGGAG	0.99 ± 0.006
CitMMT	CAS-PT-304207	AT5G49810	Methionine S-methyltransferase (AtMMT)	3e-15	67	ABI34094	Methionine S-methyltransferase ( <i>Medicago sativa</i> )	7e-23	77	F - TTGAGAACCTGAGGTCTG R - ATGGAATTGAGCCGGAG	0.91 ± 0.010
CitACO	CAS-PT-300839	AT1G05010	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase (ACO)	5e-61	88	AAG49361	ACC oxidase ( <i>C. sinensis</i> )	1e-67	99	F - GATACCTTCAAGTGCCT R - GGAGCGTCTGATAATCTTCG	0.87 ± 0.009
CitEIN3	CAS-CS-111258	AT3G20770	Ethylen-insensitive 3 (EIN3)	1e-163	82	ADI40102	Ethylene-insensitive 3-like 1 protein ( <i>C. sinensis</i> )	0.0	94	F - AAGTGTGAGGCGTAGACAC R - GTGTCTCAACACGGGAAATG	0.94 ± 0.011
CitPDF1.4	CAS-CL-700827	AT1G19610	PDF1.4	7e-15	57	NP_173391	PDF1.4 ( <i>A. thaliana</i> )	1e-12	57	F - ACAGAAGCAGCAAACCCAG R - CTGCTGCTGCTGCCTATTC	0.90 ± 0.013
CitHIN1	CIT-CW-700140	AT5G06320	NDR1/HIN1-like 3	7e-48	46	ABZ80409	Hairpin-inducing protein ( <i>Casuarina glauca</i> )	2e-55	61	F - CGTGGAACTTGACCTTGTTG R - TTCGTACGTGACTAATCTT	0.97 ± 0.009
CitUBQ	CAS-PT-300961	AT2G17190	Ubiquitin family protein (DSK2)	8e-69	60	XP_002521706	Plant ubiquitin, putative ( <i>R. communis</i> )	6e-79	77	F - GTTGCTGTGTTGACTGTG R - TTTGTGACATCCCCTCCGACT	0.91 ± 0.007
CitTUB8	CAS-LT-602290	AT5G23860	Tubulin Beta 8 (TUB8)	4e-98	99	XP_2872076	Tubulin Beta 8 ( <i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> )	8e-96	99	F - TCACCCTCTGAACATTTCC R - AGAGTATGCAGAGGAATGG	0.93 ± 0.010
CitCyp	CAS-PT-301483	AT2G36130	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2e-67	77	XP_002530534	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase <i>cypE</i> ( <i>R. communis</i> )	4e-89	86	F - GTCCTAACAGAAAGTCCGT R - GTCCTAACAGAAAGTCCGT	0.90 ± 0.013

\* from Gomi et al., 2001 / \*\* from Tsukuda et al., 2006 NA – Não Avaliado

1-MCP foi fornecido em pó denominado SmartFresh (AgroFresh, Rohm and Hass Química Ltda, Brasil) contendo 3,3% de ingrediente ativo. De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, foram misturados 11,9 mg do pó de 1-MCP em 1 mL de água para gerar 1000ppb de 1-MCP na forma gasosa em um recipiente selado de 20 litros. Para reduzir o espaço total necessário para a realização do experimento, o mesmo foi realizado em folhas destacadas das quatro variedades utilizadas anteriormente, no total de 20 repetições por tratamento. As folhas foram acondicionadas em placas de Petri forradas com discos de papel filtro previamente umedecidos com 700 $\mu$ L de água destilada autoclavada. As folhas foram inoculadas com discos de micélio do fungo (3 mm  $\varnothing$ ) e expostas ao gás de 1-MCP durante 24 horas. As placas foram incubadas a 27°C e o diâmetro das lesões foi medido 24h, 48h, 72h e 96h após inoculação. Folhas não tratadas, porém inoculadas, foram utilizadas como controle. Adicionalmente, para avaliar o efeito de 1-MCP no crescimento de *A. alternata*, placas com o meio de cultura BDA foram repicadas com o fungo e mantidas em sistema selado contendo o gás 1-MCP por 24h. Posteriormente as placas foram transferidas para estufa e incubadas a 27°C. O crescimento do fungo foi medido 24h, 48h, 72h e 96h após repique.

### **Extração de RNA total e Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)**

O RNA vegetal total foi extraído com QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração do RNA total extraído foi quantificada em um espectrofotômetro NanoDrop ND-8000 (ThermoScientific) e sua integridade foi conferida em gel desnaturante de agarose 1,5% (p/v) contendo formaldeído e brometo de etídio (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Amostras de RNA (1 $\mu$ g) foram

tratadas com DNase I, RNase-free (Fermentas) de acordo com recomendações do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) utilizando *primers* randômicos e um micrograma do RNA previamente tratado com DNase I, de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizada em um sistema Fast Real-time PCR ABI 7500 (Applied Biosystems) em reações de 15µL contendo 10µL de 2x Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 5µM dos *primers forward* e *reverse* e 3µL da diluição 1:100 do cDNA. A amplificação foi realizada em 40 ciclos, sendo cada ciclo composto de: desnaturação por 3s 95°C e anelamento de *primers* e alongação por 30s 60°C. A fluorescência foi adquirida durante a fase de anelamento/alongação em cada ciclo. A análise da curva de *melting* foi realizada ao final de 40 ciclos pela aquisição de fluorescência enquanto a temperatura foi aumentada gradativamente de 65°C a 95°C. Um único pico após análise da curva de *melting* confirmou a especificidade dos *primers*. Foram realizadas três repetições técnicas para cada repetição biológica analisada.

### **Análise dos dados**

A eficiência dos *primers* foi estimada em cada experimento através do software Miner (ZHAO *et al.*, 2005). Este software quantifica os resultados do qPCR com base na cinética da reação de PCR individualmente para cada amostra, sem a necessidade de uma curva padrão e independente de qualquer julgamento subjetivo, permitindo o cálculo direto de eficiência e CT de cada reação (ARTICO *et al.*, 2010). A análise e normalização da expressão dos genes foi realizada no software GenEx (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sweden) com base nas eficiências e CTs gerados pelo Miner. GenEx permite corrigir o nível de expressão com base na eficiência de cada *primer*, compensar as diferenças entre

corridas pela normalização com calibradores entre placas, e a normalização com genes de referencia endógenos (SCHAEFER *et al.*, 2010). Como genes de referência endógenos foram utilizados os genes *CitUBQ*, *CitTUB8* e *CitCyp*.

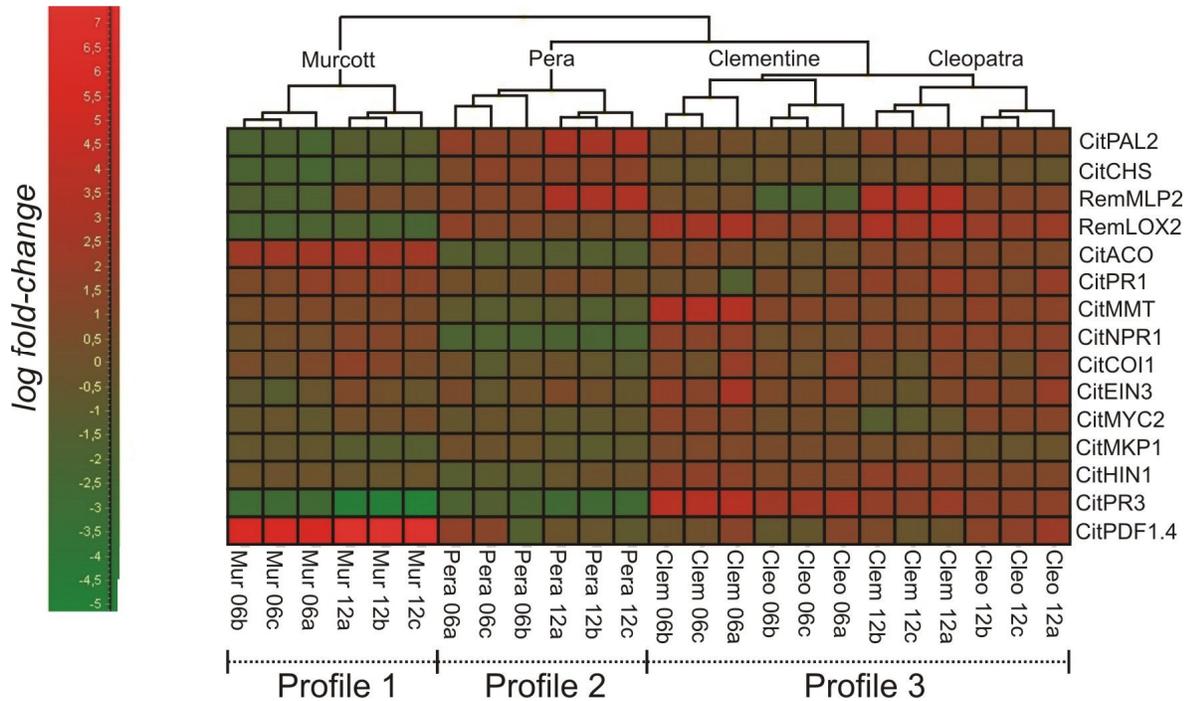
## RESULTADOS

### **Expressão de genes associados às vias de sinalização por ácido salicílico, Ácido jasmônico e etileno.**

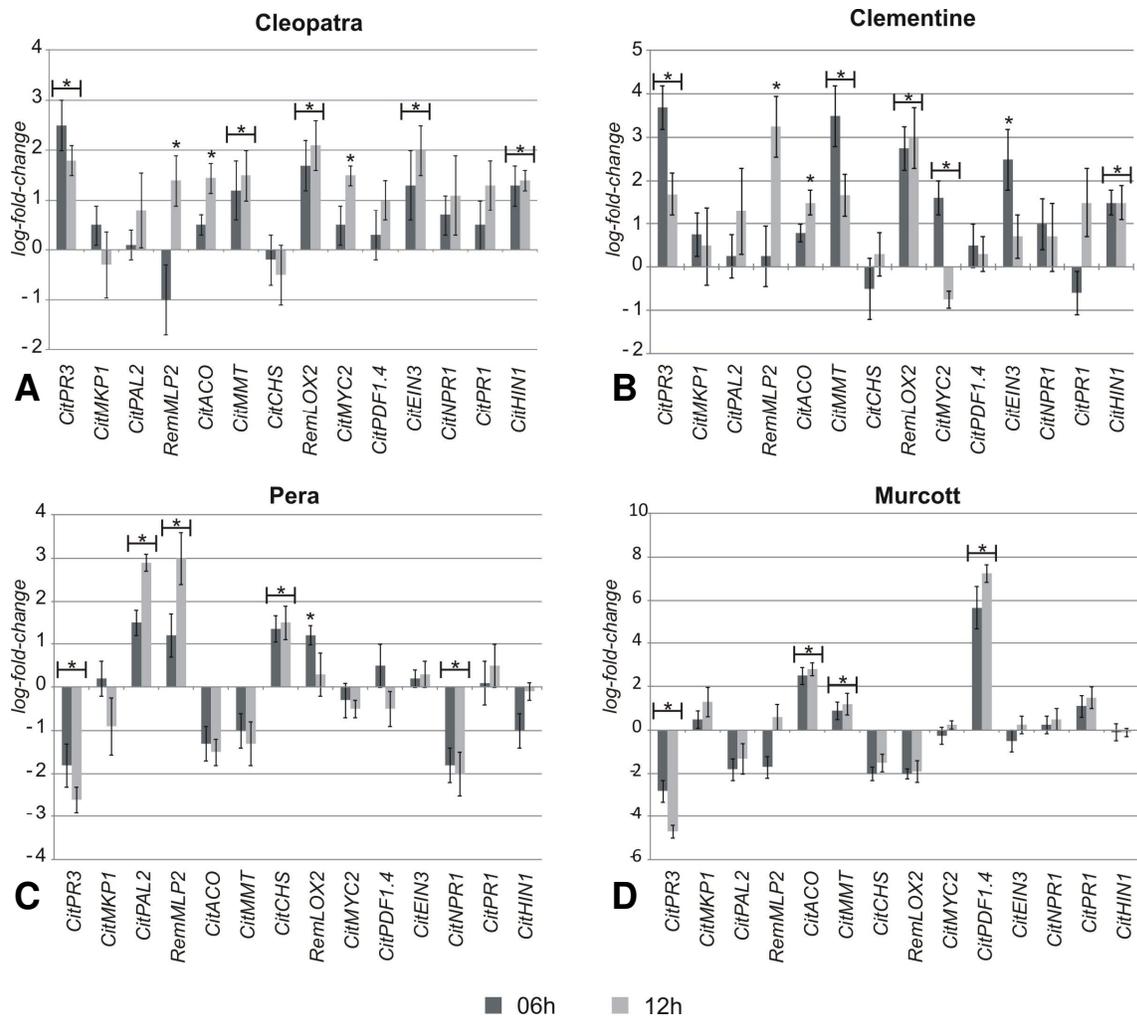
A clusterização do perfil de expressão de todos os genes avaliados permitiu identificar a presença de três padrões relacionados diretamente ao modelo de interação entre o hospedeiro e *A. alternata* (Fig. 1). Claramente o perfil de resposta expresso por plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’ (profile 1) é diferente do expresso por plantas resistentes de tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ (profile 3). Adicionalmente, plantas de laranja ‘Pera’, embora mais próximas do perfil apresentado por plantas resistentes, demonstraram uma resposta única frente à inoculação com *A. alternata* (profile 2).

A análise mais detalhada da expressão dos genes em tangerinas resistentes demonstra o aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) da expressão de genes associados às vias de sinalização JA/ET como *CitPR3*, *RemMPL2*, *CitACO*, *CitMMT*, *RemLOX2*, *CitMYC2*, *CitEIN3* (Figura 2A e B). As principais diferenças entre ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ remetem principalmente ao tempo de ativação dos genes. Genes como *CitMMT*, *CitMYC2* e *CitEIN3* apresentam maior expressão 6h após inoculação em ‘Clementina’, enquanto em ‘Cleópatra’ os maiores níveis de expressão para estes são encontrados 12h após inoculação. No caso de plantas de laranja doce ‘Pera’ ocorre indução significativa de genes associados a via de síntese de flavonóides, como *CitPAL* e *CitCHS* (Figura 2C). Ao contrário do observado em plantas resistentes, genes de respostas de defesa associados à via de ET não

foi induzida significativamente. Entretanto, a via de sinalização por JA demonstrou a indução de *RemLOX2* e *CitMLP2*. Houve repressão significativa do gene *CitPR3*, associado a transcrição de uma quitinase básica ativa contra fungos e associada a interação sinérgica de JA/ET.



**Figura 1.** Clusterização dos perfis de expressão dos genes avaliados em plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’, resistentes de ‘Cleópatra’ e ‘Clementina’, e em laranja doce ‘Pera’ seis e doze horas após inoculação com *A. alternata*. A escala é demonstrada em *log fold-change* em relação à expressão dos controles saudáveis não inoculados.



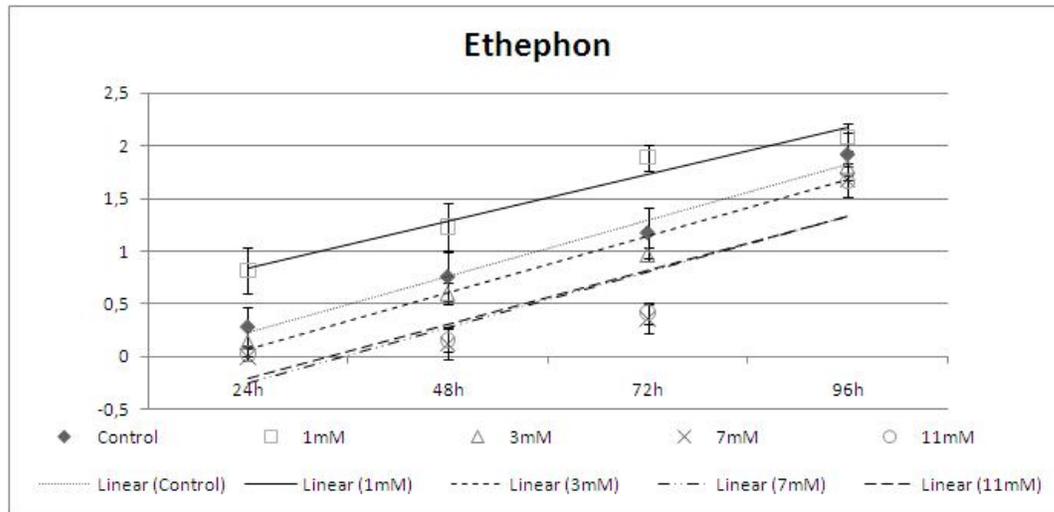
**Figura 2.** Expressão de genes associados às vias de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno em plantas resistentes de tangerinas ‘Cleópatra’ (A) e ‘Clementina’ (B), plantas de laranja ‘Pera’ (C), e plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’ (D), 6h e 12h após inoculação com fungo *A. alternata*. O nível de expressão foi normalizado com os controles endógenos *CitUBQ*, *CitTUB8* e *CitCyp* e apresentado em escala de *log-fold-change* em relação a expressão de plantas saudias não inoculadas. Barras de erros indicam desvio padrão entre a média das repetições biológicas. (\*) indica diferença significativa ( $p \leq 0,01$ ) pelo Teste t de Student, entre a comparação de expressão gênica em plantas saudias e seus respectivos tratamentos inoculados.

Com exceção de *CitNPR1*, que apresentou-se significativamente reprimido, genes da via de sinalização por AS não apresentaram diferença em relação ao nível de expressão de plantas não inoculadas de laranja ‘Pera’.

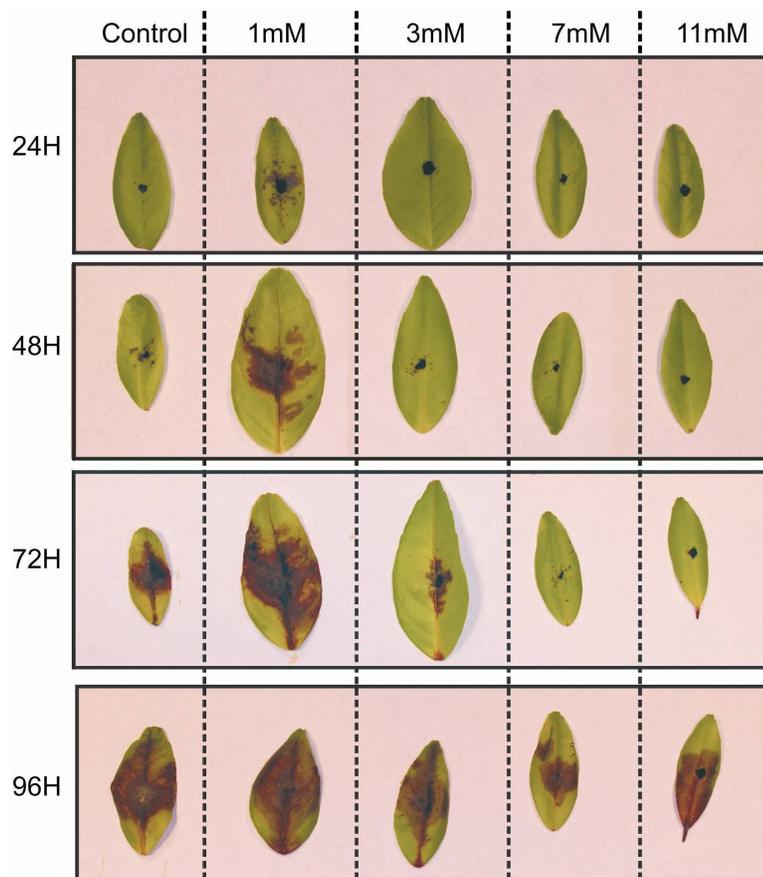
No caso de plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’, não houve indução das vias de AS e JA, entretanto genes associados à síntese de etileno como *CitMMT* e *CitACO* apareceram significativamente induzidos (Figura 2D). A indução destes genes indica a síntese de etileno. Entretanto, o genes *CitEIN3*, associado a percepção do aumento de etileno na célula e modulação de resposta de defesa, não demonstrou indução significativa. Isto sugere a participação do etileno em outro processo biológico. Assim como em laranja ‘Pera’, o gene *CitPR3* apresentou-se reprimido.

#### **Efeito de ethephon e 1-metilciclopropeno (1-MCP) na infecção por *A. alternata***

Plantas de tangor ‘Murcott’, laranja ‘Pera’, e tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ foram tratadas com concentrações crescentes do precursor de etileno, ethephon (1mM, 3mM, 7mM, 9mM e 11mM). Após tratamento e inoculação com o fungo, o desenvolvimento da doença foi acompanhado e o diâmetro das lesões foi medido 24h, 48h, 72h e 96h após a inoculação. O tratamento com 1mM de ethephon acelerou o aparecimento de lesões e aumentou o diâmetro das mesmas em plantas de tangor ‘Murcott’ entre 24h e 96h após a inoculação com o fungo, em comparação com plantas controle (Figuras 3 e 4). As concentrações de 3mM, 7mM e 11mM, retardaram o aparecimento de lesões e diminuíram o tamanho das mesmas de forma inversamente proporcional ao aumento da concentração em relação as plantas controle. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos e seus controles para as variedades de laranja ‘Pera’, e tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ (dados não demonstrados).



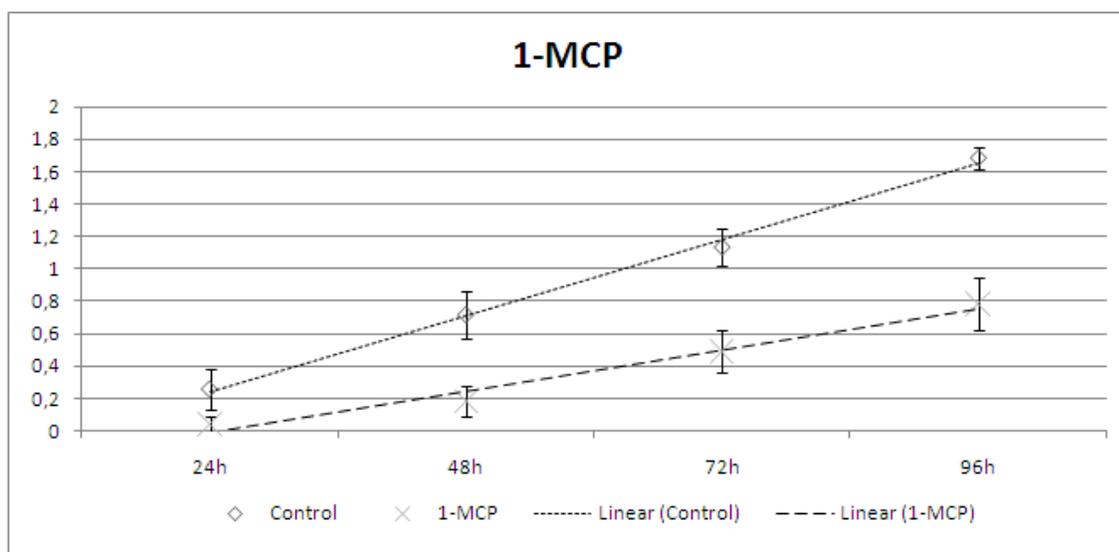
**Figura 3.** Média do diâmetro (cm) das lesões causadas por *A. alternata* ao longo do tempo em plantas susceptíveis de tanger “Murcot” após tratamento com o precursor de etileno ethephon. São demonstradas as linhas de tendência ao longo do tempo. Barras verticais representam desvio padrão da média das lesões em cada tratamento.



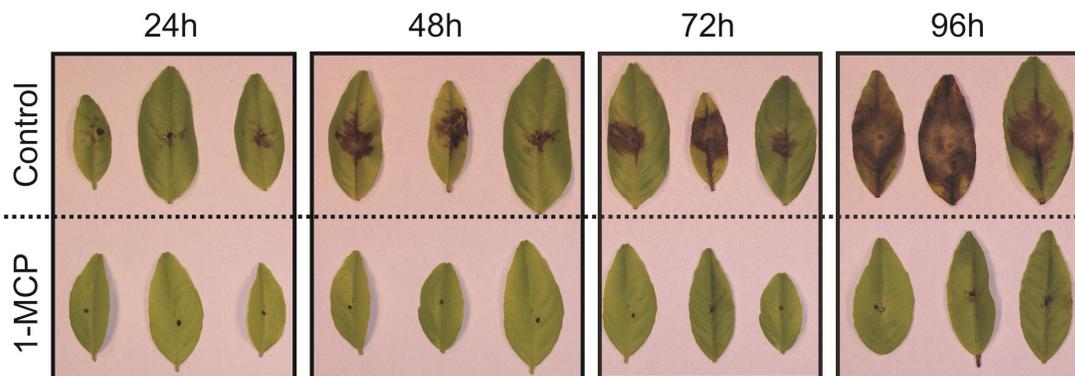
**Figura 4.** Efeito da aplicação de diferentes concentrações de ethephon em plantas de tanger ‘Murcott’ sobre o desenvolvimento de sintomas de mancha marrom ao longo do tempo.

O tratamento com 1000 ppb de competidor de etileno 1-MCP retardou consideravelmente o aparecimento de sintomas em folhas destacadas de tangor ‘Murcott’ (Figuras 5 e 6) em relação ao controle. Assim como o observado com a aplicação de ethephon, o 1-MCP não apresentou diferenças quanto à resposta de laranja ‘Pera’ e das tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ (ANEXO 1).

Tanto ethephon quanto 1-MCP não afetaram o desenvolvimento do fungo quando aplicados diretamente em placas de BDA repicadas com *A. alternata*.



**Figura 5.** Média do diâmetro (cm) das lesões causadas por *A. alternata* ao longo do tempo em plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’ após tratamento com o competidor de etileno 1-MCP. São demonstradas as linhas de tendência ao longo do tempo. Barras verticais representam desvio padrão da média das lesões em cada tratamento.



**Figura 6.** Efeito da aplicação de 1-MCP em folhas de tangor Murcott sobre o desenvolvimento da doença MMA ao longo do tempo.

## DISCUSSÃO

A análise dos genes expressos em plantas de tangor ‘Murcott’, laranja ‘Pera’, e tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ frente à inoculação com *A. alternata* demonstrou a presença de três padrões de resposta específicos. Um caracterizado pela resposta susceptível em ‘Murcott’, outro pela resposta resistente em ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ e o terceiro pela resposta de laranja ‘Pera’. A resposta de laranja ‘Pera’ indica um reconhecimento diferencial do fungo em relação às plantas resistentes e susceptíveis, podendo ser considerado um padrão de plantas tolerantes.

Ao analisar os dados de expressão em plantas resistentes, claramente observa-se a ativação de genes envolvidos nas vias de sinalização por JA/ET. A resposta de defesa contra organismos necrotróficos está relacionada a sinalização por JA/ET (GLAZEBROOK, 2005). Mutantes, tanto para vias de sinalização por etileno quanto para jasmonato, apresentam maior susceptibilidade a microrganismos necrotróficos (KNOESTER *et al.*, 1998; STASWICK *et al.*, 1998; THOMMA *et al.*, 1999). Etileno e jasmonato atuam regulando sinergicamente a expressão de genes relacionados a defesa, como *PR4* (hevein-like proteins), *PR5* (osmotin), *PDF1.2*, e *PR3* (XU *et al.*, 1994; PENNINCKX *et al.*, 1998; THOMMA *et al.*, 1998, 1999).

A indução da quitinase básica *PR3* em plantas resistentes indica sua participação na defesa contra *A. alternata*. As quitinases são enzimas que hidrolisam ligações  $\beta$ -1,4-glicoglycosídica presentes em biopolímeros de N-acetilglicosamina, em sua maioria quitina (KASPRZEWSKA, 2003). A quitina é parte essencial do esqueleto de carboidrato que compõem a parede de fungos. Desta forma, as quitinases possuem papel importante no processo de defesa, por degradar a parede dos fungos neutralizando a infecção.

Em plantas de laranja ‘Pera’, houve a predominância de resposta associada à síntese de flavonóides (*CitPAL* e *CitCHS*) e uma repressão do gene relacionado a síntese de quitinases básicas (*CitPR3*). Em uma resposta típica de defesa a organismos necrotróficos, como citado anteriormente, se esperaria um indução das vias de JA/ET, fato não observado. De fato houve indução dos genes associados à síntese de JA, como *RemLOX2* e *RemMLP2*. Estes genes foram previamente descritos em limão rugoso respondendo a inoculação com *A. alternata* não-patogênico, em relação a plantas não inoculadas (GOMI *et al.*, 2001; TSUKUDA *et al.*, 2006). Considerando a capacidade de *A. alternata* patogênico em causar infecção assintomática em laranja ‘Pera’, a não indução concomitante de JA/ET e a repressão de PR-3 sugerem outra forma de interação, permitindo a entrada do mesmo de forma assintomática.

Adicionalmente, a indução da síntese de flavonóides possui duplo papel, sendo tanto acionada em resposta a microrganismos endofíticos, quanto a microrganismos patogênicos (KOSKIMÄKI *et al.*, 2009). Poucos trabalhos foram feitos para demonstrar o papel diferencial dos flavonóides nestas situações, entretanto alguns relatos sugerem que exista resposta espécie-específica em relação ao tipo de composto produzido em cada uma das relações (KOSKIMÄKI *et al.*, 2009). As respostas promovidas por microrganismos endofíticos são normalmente mais rápidas e fortes que as produzidas por patógenos, sendo caracterizadas pela atividade elevada da enzima PAL (SCHULZ *et al.*, 1999). Embora os genes avaliados (*CitPAL* e *CitCHS*) representem os primeiros passos na síntese de flavonóides, as evidências apresentadas suportam a ocorrência de uma infecção assintomática em ‘Pera’.

Embora a via de sinalização por etileno tenha sido significativamente ativada em plantas susceptíveis de tanger ‘Murcott’, com indução dos genes *CitMMT* e *CitACO*, não

houve resistência, e as plantas apresentaram sintomas de doença. O gene *CitEIN3* (ortólogo de EIN3 de *A. thaliana*) não apareceu induzido. O gene EIN3 (*ETHYLENE INSENSITIVE 3*) foi identificado em mutantes de *A. thaliana* insensíveis a etileno (CHAO *et al.*, 1997; SOLANO *et al.*, 1998). Este gene transcreve uma proteína nuclear ativa como fator de trans-ativação durante um estágio *downstream* da via de transdução de sinal por etileno (YOKOTANI *et al.*, 2003). Desta forma, pode-se supor que a via de sinalização por etileno foi ativada em tanger 'Murcott' em seus passos iniciais até a produção do composto, porém, o acúmulo de etileno não foi percebido por seu sensor *CitEIN3*. Isto sugere que o etileno foi direcionado para outro processo biológico que não a resposta de defesa.

O papel do etileno no desenvolvimento de mancha marrom de alternaria foi previamente proposto por Ortunõ e colaboradores (2008). Estes mediram a produção de etileno endógeno em frutos após a inoculação com *A. alternata*, e demonstraram que quanto maior a produção mais susceptível eram os frutos. Foi observado que a produção de etileno endógeno aumentou nos frutos mais susceptíveis de zero nmol/g, imediatamente após a inoculação, para 0,6 nmol/g após 10 dias da infecção. Adicionalmente, quando os autores trataram os frutos com 1mM de ACC e 1mM de ethephon houve aumento do diâmetro de lesões nos frutos de variedades susceptíveis.

Para melhor entender o papel de etileno no desenvolvimento da doença, plantas susceptíveis e resistentes foram tratadas com concentrações crescentes de ethephon. No caso de laranja 'Pera' e das tangerinas 'Clementina' e 'Cleópatra' não foram encontradas diferenças entre tratamento e controle. Em plantas susceptíveis de tanger 'Murcott', a concentração de 1mM acelerou o aparecimento de sintomas e aumentou o diâmetro das lesões, corroborando o trabalho de Ortunõ e colaboradores (2008). Entretanto, as concentrações de 3mM, 7mM e 11mM, retardaram o aparecimento de lesões e diminuíram

o tamanho das mesmas de forma diretamente proporcional ao aumento da concentração. Este dado sugere que em concentrações mais altas de ethephon (e conseqüentemente etileno) possivelmente genes de resposta de defesa sejam ativados pré-imunizando a planta e retardando o aparecimento da doença.

Considerando ainda o papel do etileno, folhas das quatro variedades foram tratadas com o competidor de etileno 1-MCP. Não houve diferença significativa entre tratamento e controle para as folhas de laranja ‘Pera’ e tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’. No caso de tangor ‘Murcott’, houve retardo significativo no aparecimento de sintomas (ex. necrose). Uma vez que 1-MCP é uma molécula análoga ao etileno, e por sua vez competidor ao sítio de ligação do mesmo, pode-se supor que houve produção de etileno nas folhas, porém, o receptor de etileno não foi capaz de perceber o acúmulo do mesmo. Pôde-se comprovar que 1-MCP não alterou o crescimento do fungo em placas de Petri expostas a este composto. Entretanto, considerando que as folhas foram inoculadas e posteriormente tratadas, não podemos afirmar se houve, ou não, alteração na produção da toxina hospedeiro-seletiva.

Desta forma podemos levantar alguns pontos sobre o papel de etileno em plantas susceptíveis:

1. Considerando que após a inoculação das plantas houve aumento de genes associados à síntese de etileno, e que o possível acúmulo de etileno não foi percebido pelo sensor de etileno *CitEIN3*, podemos sugerir que o etileno endógeno produzido foi utilizado em outro processo biológico independente de resposta de defesa, e possivelmente associado à susceptibilidade.
2. O aumento crescente da concentração de etileno exógeno (ethephon) retarda o surgimento da doença, sugerindo que em altas concentrações ocorra saturação

de etileno no interior da célula ativando sensor de etileno *CitEIN3* e desencadeando resposta de defesa.

3. A aplicação de 1-MCP inibe o surgimento de sintoma. Considerando que 1-MCP é análogo ao etileno e se liga ao receptor do mesmo, 1-MCP não permite que seja ativada a resposta *downstream* na via de sinalização por etileno. Desta forma, as respostas dependentes de etileno não são ativadas, incluindo respostas de defesa. Fato que tornaria a planta mais susceptível. Por outro lado, a manifestação da doença remete a susceptibilidade à toxina e conseqüentemente a seus efeitos histopatológicos. Neste caso, podemos sugerir que etileno possui papel como co-ativador da resposta de susceptibilidade à toxina, seja na planta ou no fungo, o que justificaria a ausência de sintomas em folhas tratadas com 1-MCP.

Adicionalmente, plantas de tangor ‘Murcott’ mostraram uma indução significativa de uma defensina *CitPDF1.4* que não foi observada em nenhuma das outras variedades. As defensinas são pequenas proteínas com atividade antimicrobiana que tem um padrão de dobramento tridimensional característico, estabilizado por oito cisteínas ligadas por pontes dissulfeto (THOMMA *et al.*, 2002). Em *A. thaliana* PDF1.4 está associada a via de SA. (BROEKAERT *et al.*, 2006). Entretanto, em citros parece não ter relação com SA ou resistência, uma vez que foi induzida em plantas susceptíveis e sem a indução da via de sinalização dependente de SA.

## LITERATURA CITADA

- Artico, S.; Nardeli, S. M.; Brilhante, O.; Grossi-de-Sa, M. F.; Alves-Ferreira, M. (2010) Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biol.** 10:49-56.
- Broekaert, W. F., Delaure, S. L., De Bolle, M. F., Cammue, B. P. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. **Annu. Rev. Phytopathol** 44:393–416
- Canihos, Y., Peever, T. L., and Timmer, L. W. (1999) Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Dis.** 83:429-433.
- Chao, Q.; Rothenberg, M.; Solano, R.; Roman, G.; Terzaghi, W.; Ecker J.R. (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. **Cell** 89:1133–1144.
- Durrant, W. E.; Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 42:185–209.
- Glazebrook, J. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. **Plant J.** 34:217–228
- Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. (2005) **Annu. Rev. Phytopathol.** 43:205–227.
- Grant, M.; Lamb, C. (2006) Systemic immunity. **Curr. Opin. Plant Biol.** 9:414–420.
- Gomi, K; Yamamoto, H.; Akimitsu, K. (2001) Characterization of a lipoxygenase gene in Rough Lemon Induced by *Alternaria alternata*. **J. Gen. Plant Pathol.** 68(1):21-33.
- Hammond-Kosack, K. E.; Jones, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell** 8:1773-1791.
- Kasprzewska, A. (2003) Plant chitinases: regulation and function. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 8(3):809-24.
- Knoester, M.; Van Loon L.C.; Van Den Heuvel, J.; Hennig, J.; Bol, J.F.; Linthorst, H.J.M. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:1933–1937.

- Koskimäki, J. J.; Hokkanen, J.; Jaakola, L.; Suorsa, M.; Tolonen, A.; Mattila, S.; Pirttilä, A. M.; Hohtola, A. (2009) Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. **European Jour. of Plant Pathol** 125(4):629-640.
- Ortuño, A.; Nemsá, I.; Alvarez, N.; Lacasa, A.; Porras, I.; Garcia Lidon, A.; Del Rio, J.A. (2008) Correlation of ethylene synthesis in citrus fruits and their susceptibility to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 72:162–166.
- Penninckx, I. A. M. A.; Thomma, B. P. H. J.; Buchala, A.; Métraux, J. P.; Broekaert, W. F. (1998) Cooperative activation of jasmonate and ethylene response pathways in parallel is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 10: 2103–2114.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (3<sup>rd</sup> ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-087969577-4.
- Schaefer, A.; Jung, M.; Mollenkopf, H.; Wagner, I.; Stephan, C.; Jentzmik, F.; Miller, K.; Lein, M.; Kristiansen, G.; Jung, K. (2010) Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. **Int. J. Cancer.** 126:1166–1176.
- Schulz, B.; Rommert, A. K.; Dammann, U.; Aust, H.J.; Strack, D. (1999) The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycol. Research*, 103: 1275–1283.
- Solano, R.; Ecker, J.R. (1998) Ethylene gas: Perception, signaling and response. **Curr. Opin. Plant Biol.** 1:393–398.
- Staswick, P. E.; Yuen, G. Y.; Lehman, C. C. (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **Plant J.** 15: 747–754.
- Thomma, B. P. H. J.; Eggermont, K.; Tierens, K. F. M. J.; Broekaert, W. F. Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. (1998) **Plant Physiol.** 121:1093–1101.
- Thomma, B. P. H. J.; Nelissen, I.; Eggermont, K.; Broekaert, W. F. (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. **Plant J** 19: 163–171
- Thomma, B. P. H. J. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Curr. Opin. Immunol.** 13:63–68.

- Thomma, B. P. H. J.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K. (2002) Plant defensins. **Planta** 216: 193-202.
- Tsukuda, S.; Gomi, K.; Yamamoto, H.; Akimitsu, K. (2006) Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. **Plant Mol. Biol.** 60:125–136.
- Von Dahl, C. C.; Baldwin, I. T. (2007) Deciphering the role of ethylene in plant–herbivore interactions. **J. Plant Growth Regul.** 26:201–209.
- Xu, Y.; Chang, P.; Liu, D.; Narasimhan, M. L.; Raghothama, K. G. (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. **Plant Cell** 6:1077–1085.
- Yokotani, N.; Tamuram, S.; Nakano, R.; Inaba, A.; Kubo, Y. (2003) Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). **J. Exp. Bot.** 54 (393): 2775-2776.
- Zhao, S.; Ferdinand, R. D. (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **J Comput Biol.** 12:1047-1064

### **CAPÍTULO 3.**

#### **Avaliação de proteínas diferencialmente expressas em tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pera’ após inoculação com o fungo *A. alternata***

##### **RESUMO**

Para avaliar as proteínas envolvidas na interação citros-*A. alternata* durante a infecção assintomática em laranja ‘Pera’ e durante a resposta de susceptibilidade em tangor ‘Murcott’, foram realizados ensaios de inoculação em plantas, seguido por extração de proteínas, eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massa. Ao todo foram detectadas 21 proteínas ( $p \leq 0,01$ ) diferencialmente expressas em laranja ‘Pera’ e 26 ( $p \leq 0,01$ ) em tangor ‘Murcott’. A análise dos espectros obtidos por espectrometria de massa revelou que as proteínas e os mecanismos biológicos envolvidos durante a resposta em laranja ‘Pera’ são diferentes dos ativados em tangor ‘Murcott’, indicando uma resposta diferenciada para cada genótipo. Em laranja ‘Pera’ são ativados processos associados à síntese de terpenos e fenilpropanóides, enquanto em tangor ‘Murcott’ observa-se uma resposta voltada a remoção de espécies reativas de oxigênio. Observou-se também em tangor ‘Murcott’ a indução de uma MKP6 importante para a regulação da via de sinalização modulada pelos hormônios vegetais etileno e ácido jasmônico.

Palavras chave: 2DE, espectrometria de massa; resposta de defesa; citros

## INTRODUÇÃO

As plantas possuem muitos mecanismos de defesa que são ativados após a percepção da presença do patógeno pelo contato físico entre os elicitores derivados do patógeno e receptores nas membranas celulares das células vegetais (LEISTER *et al.*, 1996; NÜRNBERGER e BRUNNER, 2002). Este reconhecimento inicial desencadeia uma cascata de sinalização que normalmente envolve o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (STAB e EBEL, 1987), a alcalinização da matriz extracelular (FELIX *et al.*, 1993), e a presença de espécies reativas de oxigênio (LEGENDRE *et al.*, 1993). Muitas mudanças nas paredes celulares são induzidas visando deter a entrada do patógeno, como a inserção de glicoproteínas ricas em prolina e hidroxiprolina, reforçando as paredes celulares e formando uma barreira física (BRISSON *et al.*, 1994). Como evento final do reconhecimento planta-patógeno existe a produção de metabólitos secundários antimicrobianos como as fitoalexinas e a síntese e acúmulo de proteínas relacionadas à defesa, incluindo as proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas PR) (FRITIG *et al.*, 1998).

A maioria destes eventos de resposta foi descrita na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, e uma série de estudos, que incluem bibliotecas de EST (*Expressed Sequence Tags*) e microarranjos de DNA, vêm tentando caracterizar as alterações transcricionais induzidas pela interação de *A. thaliana* com seus patógenos (SCHENK *et al.*, 2000; MALECK *et al.*, 2004; ZIMMERLI *et al.*, 2004). Embora as análises de transcriptomas permitam uma visão global da regulação gênica, a acumulação e modificação das proteínas envolvidas nas respostas a patógenos só podem ser analisadas com base em estudos proteômicos (THRUSTON *et al.*, 2005).

Os estudos proteômicos vêm demonstrando uma série de alterações na população de proteínas expressas pelas células vegetais na presença de patógenos. O estudo com

sementes de milho na presença do fungo *Fusarium verticillioides* demonstrou que muitas classes de proteínas foram reguladas positivamente, como as proteínas PR, enzimas antioxidantes e proteínas envolvidas na síntese, dobramento e estabilização de outras proteínas (CAMPO *et al.*, 2004). A interação de arroz com o fungo *Magnaporthe grisea* demonstrou a presença de oito proteínas reguladas positivamente, sendo dois receptores do tipo quinase (RLK), duas  $\beta$ -1,3-glucanases (Glu1, Glu2), uma proteína tipo-*thaumatin* (TLP), uma peroxidase (POX 22.3), uma *probenazole-inducible protein* (PBZ1), e uma proteína relacionada à patogênese em arroz (OsPR-10) (KIM *et al.*, 2004). O estudo com variedades de canola (*Brassica napus*) susceptíveis e tolerantes ao fungo *Alternaria brassicae* demonstrou que 48 proteínas foram significativamente afetadas nas variedades tolerantes, sendo 41 reguladas positivamente e sete negativamente, enquanto nas variedades susceptíveis 23 proteínas foram afetadas, sendo quatro aumentadas e 19 diminuídas. Das 48 proteínas alteradas nas plantas tolerantes, 38 puderam ser identificadas e estavam relacionadas principalmente a produção e sinalização de espécies reativas de oxigênio, a sinais de transcrição para produção de auxinas e sinalização de rotas metabólicas (SHARMA *et al.*, 2007). Estes resultados demonstram claramente que a análise proteômica é extremamente funcional para a detecção das respostas pós-traducionais frente à presença de patógenos, fornecendo assim maiores subsídios para o entendimento dos mecanismos de sinalização e reposta de defesa da planta.

No caso do patossistema citros-*A. alternata* pouco se conhece a respeito da interação molecular entre patógeno e hospedeiro. As análises de microscopia óptica e RT-qPCR demonstradas anteriormente sugerem que em laranja ‘Pera’ o fungo é capaz de colonizar a planta em uma espécie de interação “amigável” sem causar danos aparentes, enquanto em plantas susceptíveis como tangor ‘Murcott’ o mecanismo molecular proposto para infecção

envolve a participação do hormônio vegetal etileno. Desta forma, com intuito de melhor entender a interação molecular envolvida na colonização do hospedeiro assintomático laranja 'Pera' e no hospedeiro susceptível tangor 'Murcott' optou-se pelo estudo das proteínas expressas durante o processo de infecção nas duas variedades.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material biológico.**

Todos os experimentos foram conduzidos com plantas suscetíveis de tangor 'Murcott' e resistentes de laranja 'Pera'. Todas as plantas foram enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osb.). As inoculações foram realizadas com o isolado AT4303 de *A. alternata*.

### **Inoculação das plantas com *A. alternata*.**

Antes da inoculação as plantas foram podadas para induzir a formação de novas brotações e ramos. Durante todo o experimento as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a  $27 \pm 1$  °C, com  $75 \pm 5\%$  de umidade relativa, sob luz fluorescente constante. A inoculação foi realizada em folhas jovens (3-5 cm) através de suspensão de esporos ( $10^6$  esporos/mL) de acordo com metodologia de Canihos e colaboradores (1999). O experimento foi conduzido em cinco repetições biológicas (plantas) em cada tratamento, sendo que cada repetição biológica foi constituída de um pool de cinco folhas inoculados. As folhas foram removidas 12 h após inoculação e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As folhas congeladas foram armazenadas a -70°C para posterior extração de proteínas, conforme descrito posteriormente. Como controles foram utilizados plantas sadias não inoculadas das duas variedades.

### **Extração de proteínas de citros.**

A extração de proteínas totais de folhas de citros das variedades estudadas foi realizada através do protocolo de extração fenólica de Hurkman e Tanaka (1986) com modificações, como segue:

**A.** Três gramas de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubos de centrífuga Nalgene ®; **B.** Foram adicionados 15 mL de tampão de extração [0,7M de sacarose; 0,5M de Tris base; 0,1M de KCl; 50 mM de EDTA; 1mM de PMSF; 1% (p/v) de PVPP; 2% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol; pH 7,5] por amostra; **C.** As amostras foram homogeneizadas por 30 min. a 4 °C em mesa agitadora; **D.** Foram adicionados 15 mL de fenol saturado em Tris-HCl (pH 7,5) por amostra; **E.** As amostras foram novamente homogeneizadas por 30 min. a 4 °C em mesa agitadora; **F.** Os tubos foram centrifugados por 30 min., 4°C, 10.000g; **G.** O sobrenadante obtido após centrifugação foi transferido para um tubo Nalgene ® novo; **H.** Os passos de **B** a **G** foram repetidos três vezes e os sobrenadantes da mesma amostra transferidos para o mesmo tubo; **I.** Por amostra foram adicionados cinco volumes da solução gelada de acetato de amônio (0,1M) em metanol; **J.** Os tubos ficaram descansando *overnight* a -20°C para precipitação das proteínas; **K.** Os tubos foram centrifugados por 30 min., 4°C, 10.000g; **L.** O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de proteínas lavado três vezes com 15 mL de acetato de amônio (0,1M) em metanol gelado, e uma vez em 15 mL de acetona 80% (v/v) gelada. Em cada lavagem os tubos ficaram descansando por 40 minutos à -20°C, sendo posteriormente centrifugados a 10.000g por 30 minutos 4°C, descartando o sobrenadante entre as lavagens. **M.** Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco em geladeira por dois dias. **N.** Os *pellets* foram solubilizados em 1 mL de tampão de

solubilização [7M de uréia; 2M de tiuréia; 100mM de DTT; 0,8% (v/v) Triton X100; 4% (p/v) CHAPS].

Após extração as proteínas foram quantificadas de acordo com método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o *Kit BioRad Protein Assay* (BioRad) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a quantificação das proteínas, estas foram submetidas à verificação de qualidade através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE (LAEMMI, 1970).

### **Focalização isoeétrica e eletroforese bidimensional (2DE)**

A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada com aproximadamente 700µg de proteínas solubilizadas por fita de pH imobilizado (*Immobiline DryStrip* pH 3-10NL, 18 cm; GE Healthcare). As fitas de pH imobilizado foram reidratadas passivamente diretamente com a amostra e 1% de anfólitos *overnight* a temperatura ambiente. A IEF foi realizada em um IPGphor III (GE Healthcare) a 20°C e 50µA/fita, conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Programa para focalização isoeétrica de proteínas de folhas de citros.

<b>Passos</b>	<b>Modo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Voltagem (V)</b>
1	<i>Step-and-hold</i>	1	100
2	<i>Step-and-hold</i>	8	200
3	<i>Step-and-hold</i>	1	400
4	<i>Step-and-hold</i>	1	700
5	<i>Step-and-hold</i>	1	1000
6	<i>Gradiente</i>	2	5000
7	<i>Step-and-hold</i>	4	7000
8	<i>Gradiente</i>	até 85000 Vh	7000

Após focalização, as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio [50mM Tris-HCl, pH 8.8; 6M uréia; 30% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS; traço de azul de bromofenol; 2% (p/v) DTT] por 15 min. e no mesmo tampão com 4% (p/v) de iodoacetamida e sem DTT por outros 15 min. A eletroforese bidimensional foi realizada em gel contínuo SDS-PAGE 12,5% (160 x 200 x 0,75 mm) em uma cuba Protean Cell II xi (BioRad) com tampão padrão Tris-Glicina-SDS [25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS]. A eletroforese começou a 16 mA/gel e após 30 min. foi alterada para 32 mA/gel até o fim. Os géis foram fixados [40% (v/v) etanol; 10% (v/v) ácido acético] por no mínimo 30 min. sob agitação, e posteriormente corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250* coloidal por 90 min. Os géis foram descorados com solução de descoloração [20% (v/v) etanol; 5% (v/v) ácido acético], e digitalizados em scanner Imagenscanner III (GE Healthcare) em resolução de 300 dpi. As imagens foram analisadas utilizando software Image Master 2D platinum V7.0 (GE healthcare). Para a análise dos géis e detecção dos *matches*, foram calculados os valores de tendência central, com base no cálculo de variação média (localização média entre os extremos de duas amostras), e dispersão, com base no cálculo de desvio padrão absoluto (cálculo do padrão de diferença absoluta entre cada valor e a tendência central). Uma vez que os valores de variação média são severamente afetados pelos extremos, foram desconsiderados 10% dos valores máximos e 10% dos valores mínimos dos spots detectados a fim de eliminar esta influência. Triplicatas técnicas foram realizadas para cada extração de proteínas e 2DE.

## **Digestão das proteínas diferencialmente expressas e espectrometria de massa por CalpLC-MS/MS**

As proteínas diferencialmente expressas, obtidas através de 2DE, foram submetidas à digestão *in gel* com a enzima tripsina (*Sequencing grade modified Trypsin* – Promega). Para tanto, os *spots* contendo as proteínas foram removidos do gel, cortados em pedaços de aproximadamente 2mm<sup>3</sup>, transferidos para um microtubo de 1,5 mL e digeridos conforme metodologia descrita por Celedon *et al.* (2007), com as seguintes modificações:

Remoção do corante – Aos microtubos contendo os fragmentos de gel, foram adicionados 500 µL de solução descorante (50% v/v acetonitrila; 25mM bicarbonato de amônio). Os microtubos foram agitados por 15 minutos e a solução foi descartada. O processo foi repetido até a completa descoloração dos fragmentos de gel (em média 5 lavagens). Após a completa remoção do corante, os fragmentos de gel foram desidratados com duas lavagens de 10 minutos em 500 µL de acetonitrila 100%. A acetonitrila foi descartada e os fragmentos de gel foram completamente secos à temperatura ambiente.

Redução e alquilação – Os fragmentos de gel foram hidratados e reduzidos em 500 µL de solução de DTT/AMBIC (20 mM ditioneitol; 50mM bicarbonato de amônio) à 56°C por 40 min. A solução DTT/AMBIC foi descartada, e foi adicionada aos fragmentos a solução IAA/AMBIC (55 mM iodoacetamida; 50 mM bicarbonato de amônio). Os fragmentos de gel foram incubados à temperatura ambiente, por 30 minutos, no escuro. A solução IAA/AMBIC foi removida e os fragmentos foram lavados uma vez em 25mM de bicarbonato de amônio, sendo posteriormente desidratados em acetonitrila 100%. A acetonitrila foi descartada e os fragmentos de gel foram completamente secos à temperatura ambiente.

Digestão das proteínas – Os fragmentos de gel foram hidratados em 15 µL de solução 25 mM bicarbonato de amônio contendo 150 ng de tripsina. Após 10 minutos, foram adicionados 10 µL de solução 25 mM de bicarbonato de amônio. Os fragmentos foram mantidos por 14 horas à 37°C. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (50% v/v acetonitrila; 5% v/v ácido fórmico).

Extração dos peptídeos – Os peptídeos foram extraídos dos fragmentos de gel com três lavagens de 15 minutos com 100 µL de solução de eluição (50% v/v acetonitrila; 1% v/v ácido fórmico), e duas lavagens com 100 µL de acetonitrila 100% à 40°C sob sonicação. Ao final de cada lavagem, a solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. A solução contendo os peptídeos foi liofilizada e as amostras armazenadas à -80°C.

Os peptídeos foram solubilizados em 20 mM de formiato de amônio, e submetidos à espectrometria de massa em um equipamento híbrido Q-TOF-Ultima API (ESI-MS/MS *quadrupole/aceleração orthogonaltime-of-flight*; Waters) acoplado a um sistema on-line de HPLC capilar (CalpLC; Waters).

A separação dos peptídeos foi realizada em uma pré-coluna C18 (Sentry Guard Column C18; Waters) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry C18 5 µm 0,32 x 150 mm; Waters). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% v/v H<sub>2</sub>O, 5% v/v acetonitrila e 0,1 % v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v H<sub>2</sub>O, 5% v/v acetonitrila e 0,1 % v/v ácido fórmico). Durante a corrida, o fluxo de injeção utilizado foi de 5 µl.min.<sup>-1</sup> nos primeiros 15 min., 2 µl.min.<sup>-1</sup> entre 15 e 40 min., e novamente 5 µl.min.<sup>-1</sup> entre 40 e 45 min.. A variação do gradiente do tampão B foi de 10% a 15% (v/v) por 5 min., 15% a 35% (v/v) por 20 min., 35% a 45% (v/v) por 5 min., 45% a 80% (v/v) por 5 min., mantidos a 80% (v/v) por 5 min., e a 100% (v/v) nos últimos 5 min..

A ionização por *electrospray* foi realizada a 3 KV, com a temperatura do cone ajustada para 90°C na presença de 5 psi de nitrogênio. A fragmentação dos peptídeos foi realizada na câmara de colisão com 15 psi de gás argônio. Os parâmetros foram definidos através do programa *MassLynx* v.2.1 (Waters).

Todas as aquisições foram calibradas com peptídeo padrão GLU<sup>1</sup>-fibrinopeptide B (GFP, Sigma) na concentração de 100 fmol.µl.min.<sup>-1</sup>.

### **Análise dos espectros de massa e identificação das proteínas**

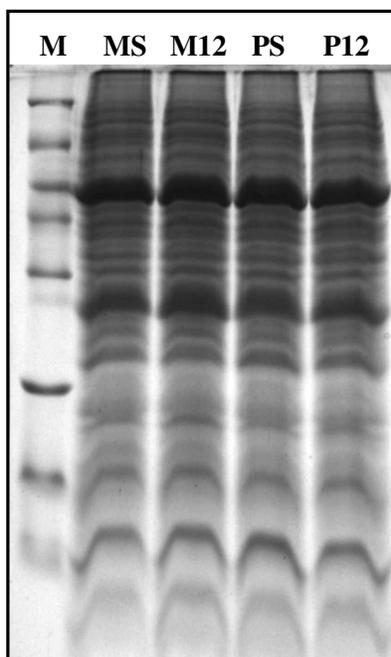
Os espectros obtidos foram processados através dos programas *MassLynx NT BioLynx* v.4.0 e *ProteinLyn* v.2.1 (Waters). Os arquivos obtidos foram confrontados com os bancos de dados Swissprot e Plants\_EST através do software MASCOT 2010 (<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros utilizados para os bancos previamente mencionados foram: *taxonomy: Viridiplantae (Green plants); fixed modifications: Carbamidomethyl (C); variable modifications: Oxidation (M); peptide tolerance: 50 ppm; data format: Micromass (.PKL); instrument: ESI-QUAD-TOF.*

Os resultados foram avaliados de acordo com os maiores escores, taxa de cobertura e número de peptídeos, bem como correspondência de peso molecular e ponto isoelétrico teórico e experimental.

## RESULTADOS

### Detecção de proteínas de citros diferencialmente expressas em resposta ao patótipo tangerina do fungo *A. alternata*.

A extração de proteínas de folhas de citros através do protocolo modificado de Hurkman e Tanaka (1986) apresentou rendimento médio de 15mg/g de tecido fresco processado. Não foram observadas diferenças no perfil dos géis de SDS-PAGE entre variedades e entre seus tratamentos (Figura 1).



**Figura 1.** SDS-PAGE de aproximadamente 15  $\mu$ g de proteínas totais extraídas de folhas jovens da variedade de laranja ‘Pera’ sadia (PS) e 12 horas após inoculação com fungo *A. alternata*, e tangor ‘Murcott’ sadia (MS) e 12 horas após inoculação com o fungo *A. alternata* (M12). (M - marcador de peso molecular *Broad Range* Bio-Rad). O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* G250.

Para eletroforese bidimensional foram realizadas três repetições técnicas de cada uma das cinco repetições biológicas para cada um dos tratamentos, totalizando 15 géis por tratamento. Para a análise foram considerados somente os *spots* presentes em todas as

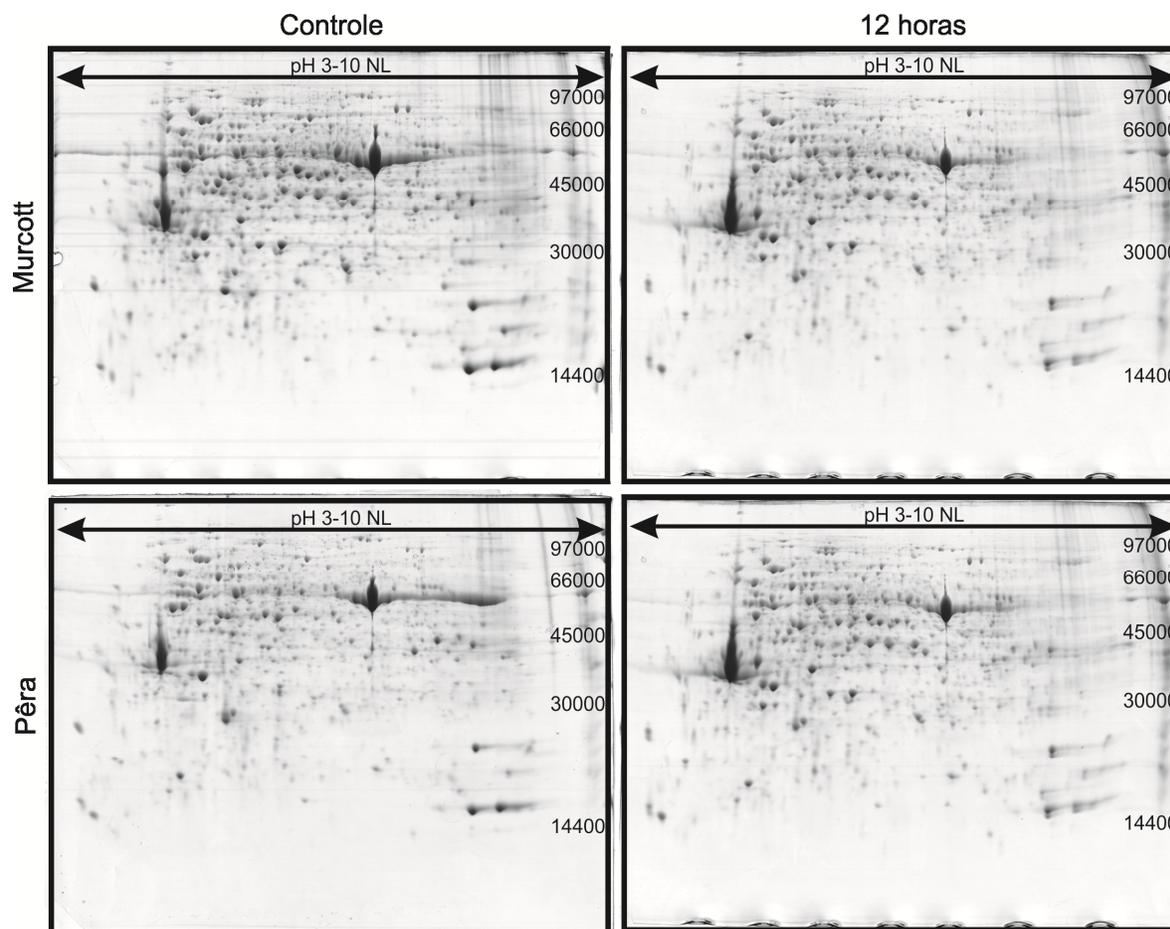
repetições técnicas de cada tratamento. Para as análises foram comparadas somente plantas inoculadas com seus respectivos controles dentro da mesma variedade. O número médio de spots detectados está apresentado na tabela 2. A figura 2 demonstra o perfil de eletroforese bidimensional das proteínas obtidas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pera’.

**Tabela 2.** Média de *spots* detectados em folhas de plantas tolerantes de laranja ‘Pera’ e em plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’ com a média do coeficiente de correlação entre as repetições

<b>Tratamento</b>	<b>Média de <i>spots</i> detectados</b>	<b>Média do coeficiente de variação (R)</b>
Laranja ‘Pera’ sadia	384	0,94
Laranja ‘Pera’ inoculada (12h)	406	0,89
Murcott ‘tangor’ sadia	375	0,86
Murcott ‘tangor’ inoculada (12h)	395	0,91

Após análise estatística (ANOVA) foram identificados 21 spots em laranja ‘Pera’ que tiveram seu volume significativamente alterado, sendo que destes, 14 apresentaram aumento de volume e sete apresentaram redução ( $p \leq 0,01$ ). Em tangor ‘Murcott’ foram identificados 26, sendo que 11 apresentaram aumento de volume e 15 apresentaram redução ( $p \leq 0,01$ ). Os *spots* significativamente aumentados ou diminuídos em laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ foram submetidos à espectrometria de massa para identificação de identidade (TABELA 1, ANEXOS). Destes, dois *spots* de tangor ‘Murcott’ não apresentaram similaridade com nenhuma proteína presente nos bancos de dados do SWISS PROT ou NCBI. A ausência de similaridade pode ser decorrente da ausência destas proteínas nos bancos de dados, ou referente à baixa qualidade dos espectros obtidos após espectrometria de massa. A falta de qualidade dos espectros por sua vez pode estar

relacionada a pouca quantidade de amostra ionizada ou ainda dificuldades de ionização inerentes as propriedades físicas de cada amostra (WESTERMEIER e NAVEN, 2002).



**Figura 2.** Exemplo do perfil de eletroforese bidimensional de 750µg de proteínas totais extraídas de folhas das variedades de tanger 'Murcott' e laranja 'Pera' sadias (Controle) e 12 horas após inoculação com fungo *A. alternata* (12 horas). A focalização isoeétrica foi realizada em tiras de pH 3-10 não-linear e os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G250*.

Após análise dos espectros e identificação dos processos biológicos em que cada proteína estava envolvida, pode-se notar que em plantas susceptíveis de tanger 'Murcott' ocorreu alteração em proteínas associadas principalmente à resposta de hipersensibilidade (HR), eventos de estresse oxidativo e morte celular (TABELA 1, ANEXOS), como:

*Peroxiredoxin-2E-1, chloroplastic, Mitogen-activated protein kinase 6, Aspartyl protease family protein/CDR1 (constitutive disease resistance 1), ribose-5-phosphate isomerase, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1 e L-ascorbate peroxidase, cytosolic.*

Surpreendentemente, nenhuma proteína relacionada à resposta de defesa, estresse oxidativo ou hipersensibilidade, mostrou-se induzida ou reprimida em laranja ‘Pera’. A síntese de terpenos e fenilpropanóides aparece induzida pela ação de *Abietadiene synthase*, *Phenylalanine ammonia-lyase* e *O-methyltransferase*.

## DISCUSSÃO

Nítidamente os processos regulados em plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’ são diferentes dos regulados no hospedeiro assintomático laranja ‘Pera’ após a inoculação com o fungo *A. alternata*.

A presença de proteínas relacionadas às vias de estresse oxidativo em plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’ é justificada pelo modo de ação da toxina ACT de *A. alternata*, a qual induz necrose em tecidos susceptíveis. Dentre as proteínas identificadas em tangor ‘Murcott’ e relacionadas ao estresse oxidativo destaca-se o acúmulo de *Peroxiredoxin-2E-1* e *L-ascorbate peroxidase*. As peroxiredoxinas e as ascorbato peroxidases atuam ativamente na detoxificação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) presente nas células vegetais (WOO *et al.*, 2010; KOUSSEVITZKY *et al.*, 2008). A ascorbato peroxidase utiliza ascorbato com agente redutor para catalisar a conversão de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (KOUSSEVITZKY *et al.*, 2008). O  $H_2O_2$  livre reage no citoplasma liberando radical hidroxila (OH) ou singlet de oxigênio ( $^1O_2$ ) altamente reativos que levam à morte celular (ZANINOTTO *et al.*, 2006). O acúmulo de  $H_2O_2$  no citoplasma está associado à HR mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta a patógenos (ZANINOTTO

*et al.*, 2006). A HR é uma forma de limitar o desenvolvimento do patógeno através da morte das células adjacentes ao sítio de infecção, entretanto no caso de *A. alternata* esta resposta levaria ao favorecimento da infecção pela maior disponibilização de recursos. Considerando que o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorece o desenvolvimento do fungo, é aceitável que mecanismos de detoxificação estejam ativos nas células vegetais de plantas suscetíveis na tentativa de diminuir a infecção e restabelecer a homeostase. Em estudos com o patótipo de Pera japonesa do fungo *A. alternata*, produtor da toxina hospedeiro seletiva AKT-1, observou-se que a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a peroxidação de lipídeos de membrana estariam associados a modificações nas células hospedeiras em resposta a toxina produzida pelo fungo (SHIMIZU *et al.*, 2005).

Outra enzima envolvida na sinalização por ROS aparece reprimida em tangor ‘Murcott’ após a inoculação com o fungo *A. alternata*, sendo ela *Aspartyl protease family protein/CDR1*. Diferentemente de *Peroxiredoxin-2E-1* e *L-ascorbate peroxidase* que atuam removendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das células, a *CDR1* possui papel na síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *CDR1* é uma endopeptidase tipo aspartato que quando induzida atua na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e leva a resistência mediada por ácido salicílico e à expressão de duas proteínas PR, PR1 e PR2 (SIMÕES *et al.*, 2007).

A análise das proteínas expressas em tangor ‘Murcott’ revelou também a indução de uma *Mitogen activated protein kinase 6* (MPK6) após inoculação com o fungo. As MPKs possuem papel importante na sinalização de estresse biótico e abiótico (PITZSCHKE *et al.*, 2009). As MPK6 e MPK3 estão normalmente associadas à resposta de defesa, sendo os primeiros receptores de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) na superfície da célula (PITZSCHKE *et al.*, 2009). Os PAMPs não são específicos para um patógeno, mas refletem a resposta a um dado grupo de patógenos (AUSUBEL, 2005). As MPK6/MPK3

estão envolvidas com a regulação da síntese de etileno em plantas sob estresse (MIAO *et al.*, 2007), além da indução de morte celular do tipo HR (PITZSCHKE *et al.*, 2009). Estes dados corroboram os resultados encontrados através de RT-qPCR que sugerem possível participação de etileno no desenvolvimento dos sintomas.

Adicionalmente observa-se o acúmulo de uma lecitina (*lectin-related protein*) em tanger ‘Murcott’ após inoculação com o fungo. As lecitinas são proteínas de ligação de açúcares que reconhecem estruturas específicas de carboidratos e mediam processos biológicos associados a respostas de estresse biótico e abiótico (KOMATH *et al.*, 2006). Elas podem ter função antimicrobiana e estão envolvidas tanto na defesa contra microrganismos patogênicos quanto no estabelecimento de interações simbióticas (BREWIN e KARDAILSKY, 1997). Em ambos os casos elas seriam expressas, com a diferença que em situação de patogênese a expressão seria contínua, enquanto durante a simbiose seria transitória (GIBSON *et al.*, 2008). Em laranja ‘Pera’ houve o acúmulo de uma *lectin protein kinase* após inoculação com o fungo *A. alternata*. A família de proteínas quinases atua adicionando grupos fosfatos a proteínas alvo (fosforilação), podendo alterar a função das proteínas, sua localização celular ou sua associação com outras proteínas (HANKS e QUINN, 1991). No caso da família de *lectin protein kinases*, sua função ainda é pouco estudada (HOFF *et al.*, 2009). Alguns receptores de membrana possuem domínios tipo *lectin kinase* que compartilham similaridade com lecitinas de leguminosas e possuem capacidade de ligar várias moléculas hidrofóbicas incluindo oligossacarídeos e hormônios vegetais (JOSHI *et al.*, 2010). Estes receptores fosforilam proteínas intermediárias que podem, direta ou indiretamente, regular os níveis de tolerância ao estresse induzido nas células vegetais (JOSHI *et al.*, 2010).

Processos associados à fotossíntese aparecem alterados somente em tangor ‘Murcott’ através da diminuição da expressão de *Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase B (RuBisCO activase)* e do aumento de *Chlorophyll a-b binding protein*. A *RuBisCO activase* atua ativando a enzima *Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO)* que por sua vez catalisa o principal passo na fixação de carbono no ciclo de Calvin durante a fotossíntese (FELLER *et al.*, 2008). A *Chlorophyll a-b binding protein* é responsável pela absorção da luz durante a fotossíntese nos fotossistemas I e II (ANDERSSON *et al.*, 2003). Em associações com bactérias, fungos e vírus podem ocorrer a redução de enzimas associadas à fotossíntese como *RuBisCo*, *RuBisCO activase*, e *Chlorophyll a-b binding protein* (AFROZ *et al.*, 2011). Esta diminuição está relacionada à presença de jasmonatos produzidos na resposta de defesa e que degradam proteínas dos cloroplastos, reduzindo a expressão de *RuBisCO* e proteínas associadas (AFROZ *et al.*, 2011). No caso da interação tangor ‘Murcott’ - *A. alternata*, os dados de RT-qPCR não indicaram a indução da via de sinalização por ácido jasmônico. Pode-se supor que os resultados contrastantes de indução de *Chlorophyll a-b binding protein* e repressão de *RuBisCO activase* estejam ligados ao efeito da toxina ACT nas células hospedeiras, uma vez que esta causa clorose seguida de necrose.

Em laranja ‘Pera’ três proteínas identificadas e associadas à síntese de terpenos e fenilpropanóides apareceram induzidas após inoculação com *A. alternata*, sendo elas *Abietadiene synthase*, *Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* e *O-methyltransferase*. A *Abietadiene synthase* atua em uma via de oxidação de alcoóis para formar diterpenos, isopimaradienos e levopimaradienos (PETERS *et al.*, 2003). Os terpenos possuem papel importante nas interações planta-insetos, planta-patógenos e planta-planta (DUDAREVA *et al.* 2004; PASCHOLD *et al.* 2006). A enzima PAL catalisa o primeiro passo na síntese de

flavonóides. Estes além de proteger as plantas contra o ataque de microrganismos patogênicos, atuam como moléculas sinalizadoras nos primeiros passos de associações simbióticas planta-microrganismos (PARR e BOLWELL, 2000; WINKEL-SHIRLEY, 2002). A *O-methyltransferase* por sua vez atua na via de fenilpropanóides durante a síntese de lignina (JAECK *et al.*, 1992). Estes dados corroboram os resultados obtidos através de RT-qPCR, onde se observou indução de PAL e *Chalcone sintase* (CHS) em laranja ‘Pera’, demonstrando a importância da via dos fenilpropanóides no processo de colonização assintomática.

## LITERARURA CITADA

- Andersson, U.; Heddad, M.; Adamska, I. 2003. Light Stress- Induced One-Helix Protein of the Chlorophyll a/b-Binding Family Associated with Photosystem I. **Plant Physiol.**, 132:811-820
- Afroz, A.; Ali, G. M.; Mir, A.; Komatsu, S. 2011. Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. **Plant Cell Rep.**, 30:745–763.
- Ausubel, F. M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. **Nat Immunol.**, 6 (10): 973–9.
- Brewin, N. J.; Kardailsky, I. 1997 Legume lectins and nodulation by Rhizobium. **Trends Plant Sci.**, 2:92-98.
- Brisson, L. F.; Tenhaken, R.; Lamb, C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. **The Plant Cell**, .6: 1703-1712,
- Campo, S.; Carrascal, M.; Coca, M.; Abián, J.; San Segundo, B. 2004. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomic approach. **Proteomics**, 4: 383-396.
- Canihos, Y.; Peever, T. L.; Timmer, L. W. 1999. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola Tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Dis.**, 83: 429-433.
- Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiol.**, 135, 1893–1902.
- Feller, U.; Anders, I.; Mae, T. 2008. "Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated". **J. Exp. Bot.**, 59 (7): 1615–24.
- Felix, G.; Regnass, M.; Boller, T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. **Plant J.**, 4: 307–316.
- Fritig, B.; Heitz, T.; Legrand, M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Curr. Opin Immun.**, 10: 16–22.
- Gibson, K. E.; Kobayashi, H.; Walker, G. C. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. **Annu Rev Genet.**, 42:413–441.
- Hanks, S. K.; Quinn, A. M. 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. **Methods Enzymol.** 200:38-62.
- Hoff, P. L. D.; Brill, L. M.; Hirsh A. M. 2009. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Mol Genet Genomics**, 282:1–15.
- Hurkman, W. J.; Tanaka, C. K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiol.**, 81: 802-806.

- Komath, S. S.; Kavitha, M.; Swamy, M. J. 2006. "Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research". **Org. Biomol. Chem.**, 4 (6): 973–88.
- Koussevitzky, S.; Suzuki, N.; Huntington, L. A.; Cortes, D.; Shulaey Z.; Mittler, R. 2008 Ascorbate Peroxidase 1 Plays a Key Role in the Response of *Arabidopsis thaliana* to Stress Combination. **J. Biol. Chem.**, 283, 34197-34203.
- Jaeck, E.; Dumas, B.; Geoffroy, P.; Favet, N.; Inze, D.; Van Montagu, M.; Fritig, B.; Legrand, M. 1992. Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of O-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Mol Plant Microbe Int.** 5, 294–300.
- Joshi, A.; Dang, H. Q.; Vaid, N.; Tutela, N. 2010. Pea lectin receptor-like kinase promotes high salinity stress tolerance in bacteria and expresses in response to stress in planta. **Glycoconjugate J.**, 27(1), 133-150, DOI: 10.1007/s10719-009-9265-6.
- Leister, R.; Ausubel, F. M.; Katagiri, F. 1996. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes RPS2 and RPM1. **PNAS**, 93: 15497–15502.
- Legendre, L.; Rueter, S.; Heinstein, P. F.; Low, P. S. 1993. Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. **Plant Physiol.**, 102: 233-240.
- Maleck, K.; Levine, A.; Euglen, T.; Morgan, A.; Schmid, J.; Lawton, K. A.; Dangl, J. L.; Deitrich, R. A. 2004. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nat. Genet.**, 26: 403-410.
- Miao, Y.; Laun, T. M.; Smykowski, A.; Zentgraf, U. 2007. *Arabidopsis* MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. **Plant Mol. Biol.**, 65:63-76.
- Nürnbergger, T.; Brunner, F. 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Curr. Opin Plant Biol.**, 5: 318–324.
- Parr, A. J.; Bolwell, G. P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **J. Sci. Food Agric.**, 80: 985-1012.
- Paschold, A.; Halitschke, R.; Baldwin, I. T. 2006. Using ‘mute’ plants to translate volatile signals. **Plant J.** 145, 275–291.
- Peters, R. J.; Carter, O. A.; Zhang, Y.; Matthews, W.; Croteau, R. B. 2003. Bifunctional abietadiene synthase: mutual structural dependence of the active sites for protonation-initiated and ionization-initiated cyclizations. **Biochem.**, 42:2700-2707
- Pitzschke, A.; Schikora, A.; Hirt, H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 12:421–426.
- Schenk, P. M.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J. P.; Richmond, T.; Somerville, S. C. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **PNAS**, 97: 11655-11660.

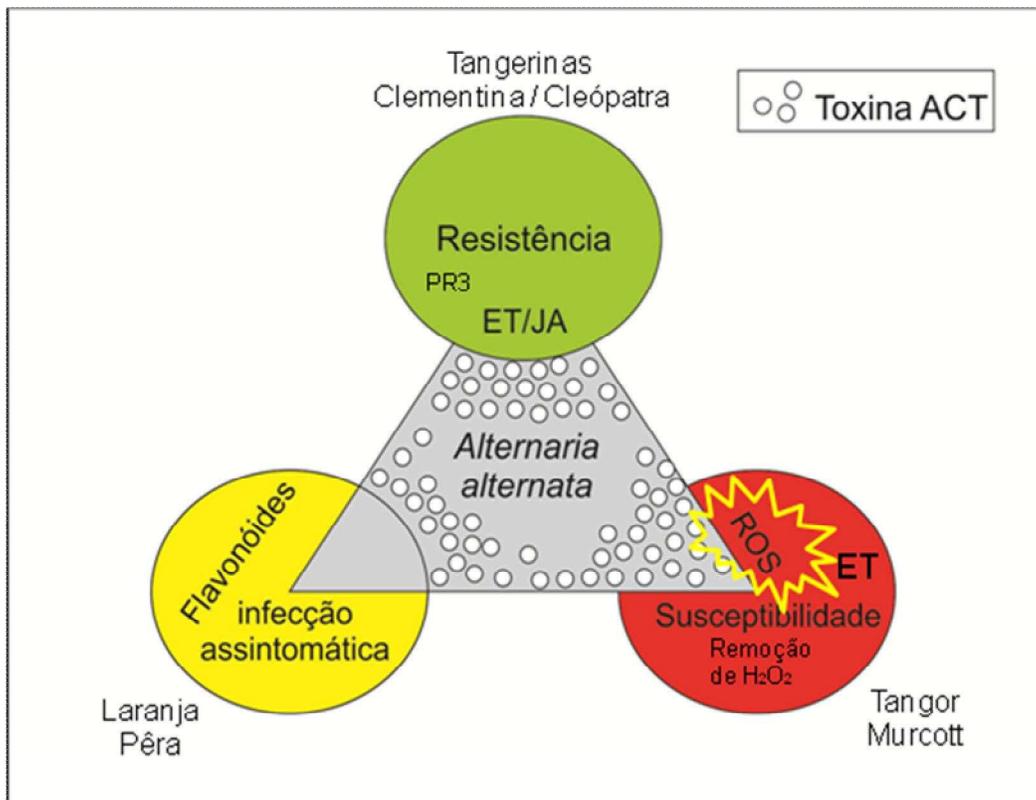
- Sharma, N.; Rahman, M. H.; Strelkov, S.; Thiagarajah, M.; Bansal, V. K.; Kav, N. N. V. 2006 Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria alternata*. **Plant Sci.**, 2007 172:95-110.
- Shimizu, N.; Hosogi, N.; Hyon, S. J.; Inoue, K.; Park, P 2006. Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. **J Gen Plant Pathol.**, 72:6–15.
- Simões, I.; Faro, R.; Bur, D.; Faro, C. 2007. Characterization of recombinant CDR1, an *Arabidopsis* aspartic proteinase involved in disease resistance. **J. Biol. Chem.** 282(43):31358-65.
- Stab, M. R.; Ebel, J. 1987. Effects of  $Ca^{2+}$  on phytoalexin induction by fungal elicitors in soybean cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, 257: 416–423.
- Thruston, G.; Regan, S.; Rampitsch, C.; Xing, T. 2005. Proteomic and phosphoproteomic approaches to understand plant-pathogen interactions. **Physiol Mol. Plant P.**, 66: 3-11.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 5: 218-233.
- Woo, K. C. 1979. Properties and Intramitochondrial Localization of Serine Hydroxymethyltransferase in Leaves of Higher Plants. **Plant Physiol.**, 63, 783-787.
- Westermeier, R.; Naven, T. **Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis**. Wiley-VCH, 2002, 342p.
- Woo, H. A.; Yim, S. H.; Shin, D. H.; Kang, D.; Yu, D.; Rhee, S. G. 2010. Inactivation of Peroxiredoxin I by Phosphorylation Allows Localized  $H_2O_2$  Accumulation for Cell Signaling. **Cell**, 140, 517–528.
- Zaniotto, F.; Camera, S. L.; Polverari, A.; Delledonne, M. 2006. Cross Talk between Reactive Nitrogen and Oxygen Species during the Hypersensitive Disease Resistance Response. **Plant Physiol.**, 141: 379–383.
- Zimmerli, L.; Stein, M.; Lipka, V.; Schulze-Lefert, P.; Somerville, S. 2004 Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. **The Plant J.**, 40: 633–646,

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento, poucos estudos foram realizados para entender a interação molecular entre plantas cítricas e o patótipo tangerina do fungo *A. alternata*. Muitas das informações apresentadas aqui são iniciais e demonstram que o patossistema citros-*A. alternata* é complexo e variável. Os dados de microscopia óptica, PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e eletroforese bidimensional (2DE) sugerem que plantas cítricas possuam três modos de interação específicos com o patótipo tangerina do fungo *A. alternata*, sendo eles: resistência, suscetibilidade e colonização assintomática (Figura 1). Para cada variedade são ativados mecanismos de resposta específicos que direcionam a cascata de sinalização para um dos modelos de interação.

Em plantas resistentes de tangerinas ‘Clementina’ e ‘Cleópatra’ o fungo desencadeia respostas de defesa tipicamente associadas à resistência contra fungos necrotróficos através da indução das vias de sinalização por etileno e ácido jasmônico e produção de proteína PR específica de resposta de defesa. Neste caso não são observados sinais de necrose ou clorose, nem a presença do fungo nas folhas, demonstrando a resistência das mesmas à toxina ACT e ao fungo.

Em plantas susceptíveis de tangor ‘Murcott’, é observada a formação de necrose após inoculação com o fungo. Adicionalmente observa-se a indução de genes associados à síntese de etileno, sugerindo a participação deste no desenvolvimento da doença. Na tentativa de restabelecer a homeostase, proteínas associadas à remoção de peróxidos de hidrogênio são ativadas. Adicionalmente a planta tenta se defender sem sucesso pela indução de lecitinas e defensinas (*PDF1.4*).



Modelo de interação entre o patótipo tangerina do fungo *Alternaria alternata* e plantas resistentes, susceptíveis e em infecções assintomáticas. ET/JA – sinalização por etileno e ácido jasmônico. ROS – espécies reativas de oxigênio. No modelo, o fungo é representado como o grande triângulo e a toxina ACT como os círculos brancos menores. Na susceptibilidade (círculo vermelho), tanto o fungo quanto a toxina afetam o hospedeiro causando a doença. Na resistência (círculo verde) ocorre o bloqueio do estabelecimento do fungo, não desenvolvendo sintomas. Enquanto que na infecção assintomática (círculo amarelo) ocorre a entrada assintomática do fungo sem o hospedeiro ser afetado pela toxina.

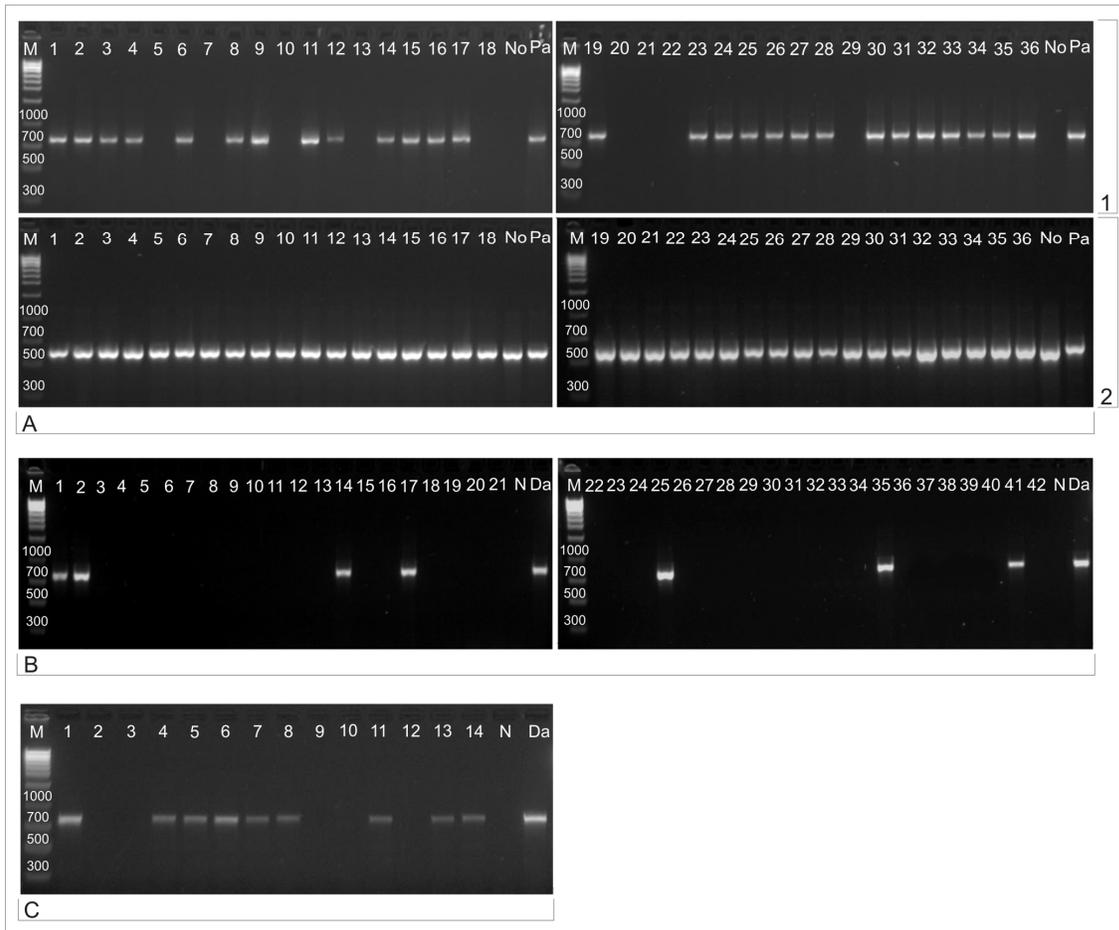
Em plantas de laranja ‘Pera’ não são observados sintomas da doença, entretanto observa-se o fungo se desenvolvendo nos tecidos vegetais. Ocorre a expressão de genes e o acúmulo de proteínas associadas à síntese de terpenos e fenilpropanóides, indicando uma possível interação não-patogênica com a planta. Neste caso, pode-se sugerir que a planta possua certa resistência a toxina, porém não ao fungo. Podemos especular que a resistência

à toxina poderia ser conferida pela degradação da mesma pela planta, ou pela ausência de receptores nas células de laranja 'Pera' para o reconhecimento da mesma. Entretanto, neste trabalho, não foram encontradas evidências que pudessem contribuir com estas idéias.

O mecanismo específico associado ao reconhecimento do patógeno em cada uma das interações é desconhecido. Os resultados obtidos aqui abrem precedentes para novas pesquisas e para um novo entendimento da relação entre o patótipo tangerina de *A. alternata* e seus hospedeiros cítricos.

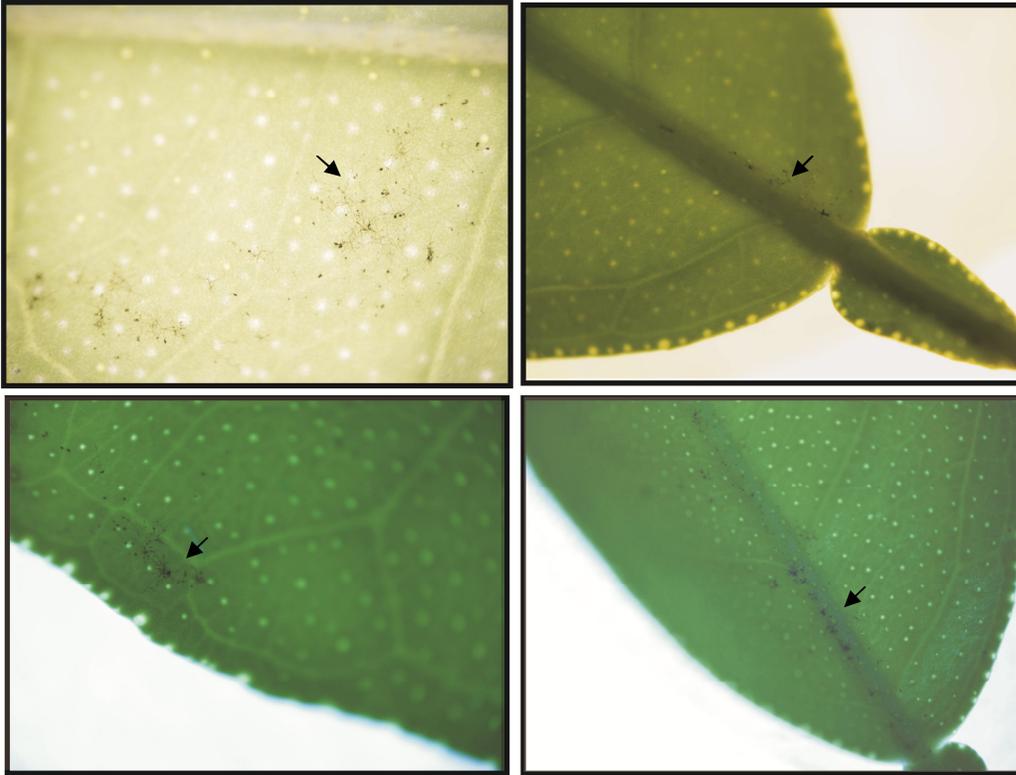
## **ANEXOS**

## CAPITULO 1 – Supplementary material



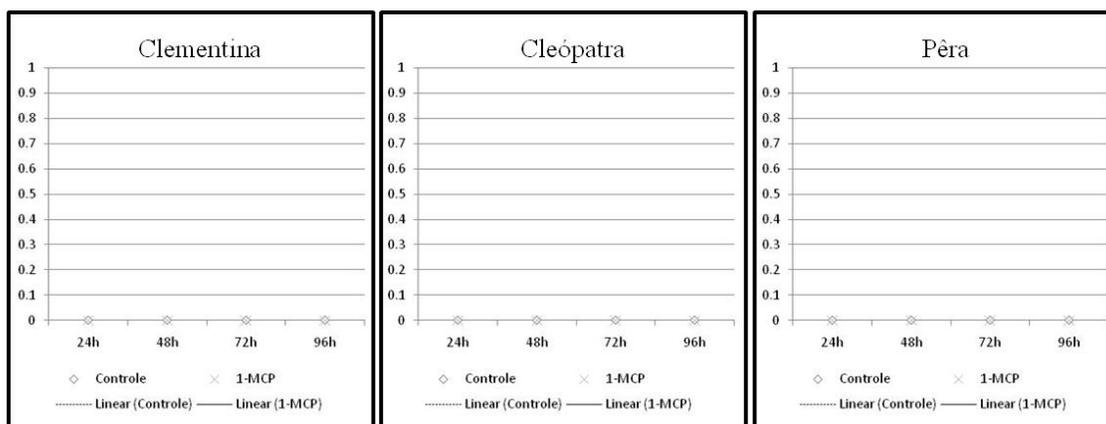
**S1.** Detection of the tangerine pathotype of *A. alternata* recovered from artificially inoculated Pera leaves, and in healthy leaves of Pera sweet orange; **A.** Amplification of the fungal ACT-toxin (1) and rDNA (2) genes clusters from *A. alternata* colonies recovered from symptomless Pera leaves 30 days post inoculation (each lane represents different isolates; the same isolates are represented by the same lanes in A1 and A2) **B.** Amplification of the fungal ACT-toxin from symptomless Pera leaves collected from a plant grown in a parallel line to an ABS severely infected Dancy mandarin (each lane represents different leaves). **C.** Amplification of the fungal ACT-toxin from symptomless leaves of Pera sweet orange 30 days post *A. alternata* artificial inoculation. M – 1Kb ladder; No – *A. alternata* non-pathogenic control; Pa – positive control of the tangerine pathotype of *A. alternata*; N – Negative control of non-infected Clementine; Da – Positive control of severely infected Dancy mandarin.

## CAPITULO 1 – Supplementary material



**S2.** Pera sweet orange leaves collected in the field from a plant grown in a parallel line to an ABS severely infected Dancy mandarin. Leaves were surface disinfested and maintained in a moist chamber for 35 days. Arrows indicate fungal structures emerging from inside leaf tissues.

## CAPÍTULO 2



**Anexo 1.** Média do diâmetro das lesões causadas por *A. alternata* em laranja “Pera” e tangerinas “Clementina” e “Cleópatra” após tratamento com 1-MCP.

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Proteínas diferencialmente expressas em tanger Murcott (MU) e laranja Pera (PE) 12 horas após inoculação com *Alternaria alternata* patótipo tangerina. Em verde são demonstradas as proteínas induzidas, em vermelho as reprimidas.

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
MU57	Lectin-related protein	Q9FQ12_CITPA	<i>Citrus paradisi</i>	SP	29300 5.1	32200 5.6	1. <i>sugar binding</i>	R.AGDG <u>M</u> TFIFASDK.N + Oxidation (M) K.GVGEYLGLQSSPGD K.F K.FPPLAVELDTCLNK.N R.IYYNPDFGQLSIYAA YSGETLVK.V
MU60	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	PGKH_TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP	50146 8.5	48170 9.1	1. <i>glycolysis</i> 2. <i>response to cadmium ion</i> 3. <i>response to cold</i>	K.GVTTIIGGGDSVAAV EK.V R.VNELLLVGGEPLSAV K.L K.YTSIKPLGDR.V
MU61	20 kDa chaperonin	CH10C_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	26785 8.9	22450 8.5	1. <i>protein folding;</i> 2. <i>response to cadmium ion</i> 3. <i>response to cold</i>	K.DLKPLNDR.V K.YAGNDFK.G K.EDDIIGILETDDVKDL KPLNDR.L
MU110	Peroxiredoxin-2E-1, chloroplastic	PR2E1_ORYSJ	<i>Oriza sativa</i>	SP	23674 8.9	27900 8.2	1. <i>cell redox homeostasis</i> 2. <i>oxidation-reduction process</i>	R.YALLAEDGVVK.V

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
MU154	Mitogen-activated protein kinase 6	MPK6_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	45028 5.3	44300 5.7	<i>1. camalexin biosynthetic process</i> <i>2. induced systemic resistance, jasmonic acid mediated signaling pathway</i> <i>3. plant-type hypersensitive response</i> <i>4. priming of cellular response to stress</i> <i>5. protein phosphorylation</i> <i>6. regulation of stomatal complex patterning</i> <i>7. response to abscisic acid stimulus</i> <i>8. response to cold</i> <i>9. response to ethylene stimulus</i> <i>10. response to hydrogen peroxide</i> <i>11. response to salt stress</i> <i>12. root development</i>	K.GAYGIVCSAMNSET NESVAIK.K R.NAFNDVYIAYELMD TDLHQIIR.S K.FPTVHPLAIDLIEK.M K.ELIYR.E
MU254	Aspartyl protease family protein/CDR1 (constitutive disease resistance 1)	NP_198319	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NCBI	46818 5.2	48200 5.7	<i>1. defense response to bacterium</i> <i>2. proteolysis</i> <i>3. regulation of hydrogen peroxide metabolic process</i> <i>4. regulation of salicylic acid metabolic process</i>	R.LLSAIDIPLGGDSQPE SIGLYFAK.I R.DFHVQVDTGSDILW VNCAGCIR.C K.INFGTNGIVTGPVV STPLTK.A

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
MU269	Adipocyte plasma membrane-associated protein, putative (Strictosidine synthase superfamily)	XP_002516259.1	<i>Ricinus communis</i>	NCBI	39288 5.3	40312 5.7	1. biosynthetic process	K.HIDSQSLLGLTTTK.D K.ETTVLHEGFYFANGI ALSK.N K.LKETTIVLHEGFYFAN GIALSK.N R.AGILDAFIENLPGGPD NINLAPDGSFWIGLIK. M K.VTEEGVEAIVPDASF TNDVIAASDGTLYFTV ASTK.Y K.SFQCELVFAK.M
MU363	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase B, chloroplastic	RCA_MALDO	<i>Malus domestica</i>	SP	47198 7.6	48400 9.0	1. defense response to bacterium 2. response to cold 3. response to light stimulus 4. chloroplast stroma	K.LVDTFPGQSIDFFGA LR.A K.LLEYGNMLVQEEN VK.R + Oxidation (M) R.VPIIVTGNDFSTLYAP LIR.D R.APGVQTPVIVR.F R.LGPNYLQLPVNAPK. C
MU425	Catalase isozyme 3	CATA3_NICPL	<i>Nicotiana glumbaginifolia</i>	SP	56980 6.8	58700 7.0	1. hydrogen peroxide	R.GPILLEDYHLVEK.L R.EGNFDLVGNNFPVFF VR.D

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
MU654	ribose-5-phosphate isomerase	DT214650	<i>Poncirus trifoliata</i>	NCBI	32250 7.3	40230 7.9	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. cell death</li> <li>2. pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch</li> <li>3. vegetative to reproductive phase transition of meristem</li> </ol>	K.SGMALGLGTGSTAA FVVDK.I + Oxidation (M) K.SLNIPLTTLDDHPSLD LAIDGADEVDPENLV K.G K.LEGVVEHGLFLDMA TAVIIAGK.T + Oxidation (M) K.AGSQIFSEGGLDYLG NPSLIHAQSILAIWACQ VVLMGAVEGYR.I + Oxidation (M)
MU663	Chlorophyll a-b binding protein	CB22_MAIZE	<i>Zea mays</i>	SP	27977 5.3	30349 5.6	1. photosynthesis	K.GPLENLADHIADPVN NNAWAYATNFVPGK. K.GGYFIVEWR.V K.ECSEILSVEDFAILLA K.H
MU668	Uricase-2 isozyme 2	URIC2_CANLI	<i>Canavalia lineata</i>	SP	34014 8.6	38900 8.9	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. nodulation</li> <li>2. oxidation-reduction process</li> <li>3. purine base metabolic process</li> </ol>	K.SGALQLTSGIEGLSLL K.T R.YSYESLYSIPQKPLYF TDK.Y K.FDDDVFPTDEPHGS IQASLSR.L K.FTLTNSDVLEDVYFG CGR.E
MU677	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	Q9LEW3_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	49473 5.0	56320 5.6	1. proteolysis	K.FTPISSFPSAFNYGIDI IGISVGDK.F K.SGITLGSGNYIVTIGI GTPK.D

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
MU680	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	CB13_SOLLC	<i>Solanum lycopersium</i>	SP	29344 9.0	30734 8.5	<i>1. photosynthesis</i>	K.WLAYGEVINGR.F R.FQDWAKPGSMGK.Q + Oxidation (M) R.QLWFASK.Q
MU711	SEM SIMILARIDADE							
MU713	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase 1	CYP1_SOYBN	Glycine Max	SP	18167 8.7	22346 8.3	<i>1. cysteine biosynthetic process 2. defense response to bacterium 3. protein folding 4. response to abscisic acid stimulus 5. response to light intensity 6. response to mannitol stimulus 7. response to oxidative stress 8. response to salt stress</i>	K.FADENFVK.K R.IVMELYADVTPR.T + Oxidation (M) K.HVVFGQVIEGLNVV K.D
MU717	SEM SIMILARIDADE							
MU719	probable fructose- bisphosphate aldolase	CBH32613	<i>Triticum aestivum</i>	NCBI	41362 8.21	42667 8.7	<i>1. glycolysis</i>	R.YAAIAQDDGLVPIVE PEILLDGDHGIDR.T K.YELLQQR.S
MU731	Isopentenyl- diphosphate Delta- isomerase I	IDI1_CAMAC	<i>Camptotheca acuminata</i>	SP	32935 5.3	34567 6.2	<i>1. chlorophyll biosynthesis 2. isoprene biosynthesis 3. photosynthesis</i>	R.LVVDNFLMK.W + Oxidation (M) R.AFSVFLFNSK.Y K.DGLLQLPSDK.A
MU733	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	APX1_PEA	<i>Pisum sativum</i>	SP	27176 5.5	30432 6.2	<i>1. hydrogen peroxide 2. stress response</i>	K.SYPTVSADYQK.A K.HPAELAHSANGLDI AVR.L

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
MU751	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	COMT1_CATRO	<i>Catharanthus roseus</i>	SP	39759 5.8	43978 6.4	<i>1. lignin biosynthesis</i>	K.DAVLEGGIPFNK.A K.WICHDWSDAHCLK.F R.EADVLSLHPVLDK.T
MU755	Glycerate dehydrogenase	DHGY_CUCSA	<i>Cucumis sativus</i>	SP	41679 6.0	43567 6.7	<i>1. glycolate pathway</i> <i>2. photorespiration</i>	K.CDGVIGQLTEDWGE VLFSALSR.A K.NAIIVPHIASASK.W
MU763	Putative 60S ribosomal protein	BAC42280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	44725 10.3	45677 9.6	<i>1. translation</i>	R.NIPGVEVVNVER.L R.IINSDEVQSVVRPIK.T
MU766	26S protease regulatory subunit 10B homolog A	PS10A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	44789 8.3	47568 7.6	<i>1. protein catabolic process</i>	R.AIASNIDANFLK.V K.IEIPLPNEQSR.M
MU767	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase B, chloroplastic	RCAB_HORVU	<i>Hordeum vulgare</i>	SP	47198 7.6	48569 8.3	<i>1. defense response to bacterium</i> <i>2. response to cold</i> <i>3. response to light stimulus</i> <i>4. chloroplast stroma</i>	K.VPLILGIWGGK.G R.LVDTFPGQSIDFFGAL R.A R.VPIIVTGNDFSTLYAP LIR.D R.GFVEEDFAK.V
MU774	Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial	GLYM_FLAPR	<i>Flaveria pringlei</i>	SP	57127 8.8	59345 9.4	<i>1. L-serine metabolic process</i> <i>2. glycine metabolic process</i> <i>3. one-carbon metabolic process</i>	K.QFPTIGFEK.E K.NTVPGDVSAMVPGG IR.M + Oxidation (M) R.LNESTGYIDYDQLEK. S
PE60	Mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa	VDAC2_SOLTU	<i>Solanum tuberosum</i>	SP	29376 7.8	34265 6.9	<i>Indeterminado</i>	K.SLFTISGEVDTR.A K.GELFLADVSTQLK.N K.VDTNSNVYTTITVDE PAPGLK.T

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
PE111	ATP synthase gamma chain, chloroplastic	ATPG_PEA	<i>Pisum sativum</i>	SP	41385 5.6	43289 5.9	1. ATP synthesis coupled proton transport	R.RPYIPVDR.F R.FLEGGSLPTAK.E K.EAQTIADDVFSLFVS EEVDKVELLYTK.F K.QLNTNNGGSTR.E R.NYADSDAASDSGR.F K.EWVAQVEPGVLITFV SLPQGGNDLK.R R.NIPGSSGFASTPK.L
PE313	Protein Brevis radix-like 3	BRXL3_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	41965 6.9	43598 7.5	Indeterminado	K.LSVAEIVAQIPLKDN NPEAAATTLDR.V K.XILEGGIAFNK.A
PE362	O-methyltransferase, putative	B9RMU8_RICCO	<i>Ricinus communis</i>	SP	39702 5.8		1. caffeate Omethyltransferase activity 2. protein dimerization activity	K.GHLNEDVLLLVFQH LNWNPK.L K.MMLDLQSSGSHCID GNWR.A R.TDVLYVCDPCEHLD QGEEGDVGLFR.G K.IGLFGGAGVGK.T K.LSIFETGIK.V
PE345	EID1-like F-box protein 1	EDL1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	33073 8.6	36784 8.9	Indeterminado	R.FVQAGSEVSALLGR. M R.IFNVLGEPVDNLGPV DTR.T K.NDSLSSSTLVK.R
PE387	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	ATPB_ACOCL	<i>Acorus calamus</i>	SP	53607 5.2	55789 6.4	1.ATP synthesis 2. hydrogen ion transport 3. ion transport 4. transport	R.CMGYGETNPSAYDT AWVAR.I K.ILGLDLPYDLPFLK.Q
PE392	Abietadiene synthase	TPSDV_ABIGR	<i>Abies grandis</i>	SP	99473 5.5	89762 6.7	1. terpene metabolism; oleoresin biosynthesis	

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
PE401	Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	ALFC1_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	43075 6.2	45623 7.1	1. glycolysis 2. response to cadmium ion	R.LASIGLENTEANR.Q R.TVVSIPNGPSALAVK. E K.MVDVLVEQNIVPGIK .V + Oxidation (M) R.LDEMIVFR.Q + Oxidation (M) R.VLELSLEEAR.Q R.VLENLGADPSNIR.T K.VITLDMGLLVAGTK. Y + Oxidation (M) R.VLVATDCHLGYMEK. D K.MVLGGSGVGQITLYP ILMK.K R.PEVQEGCDVSDWFNI LVLHQNR.V K.DESDIDPNDQNSILEH LDK.V K.DNVSAEVAASR.I R.ESGSTVAVVAEQT. A
PE410	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B	CLPAB_SOLLC	<i>Solanum lycopersicum</i>	SP	102463 5.9	87234 6.5	1. plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	R.VLVATDCHLGYMEK. D K.MVLGGSGVGQITLYP ILMK.K R.PEVQEGCDVSDWFNI LVLHQNR.V K.DESDIDPNDQNSILEH LDK.V K.DNVSAEVAASR.I R.ESGSTVAVVAEQT. A
PE411	Double-strand break repair protein MRE11	MRE11_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	80242 6.2	79234 6.6	1. double-strand break repair 2. meiosis	R.VLVATDCHLGYMEK. D K.MVLGGSGVGQITLYP ILMK.K R.PEVQEGCDVSDWFNI LVLHQNR.V K.DESDIDPNDQNSILEH LDK.V K.DNVSAEVAASR.I R.ESGSTVAVVAEQT. A
PE436	Triosephosphate isomerase	B9VRG4_9ROSI	<i>Dimocarpus longan</i>	SP	27206 6.0	33478 6.3	1. triose-phosphate isomerase activity	R.ALLNESNDFVGDK.V K.ELAAQPDVDGFLVG GASLKPEFIDIK.F

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
PE440	Predicted Protein	B9MZE9_POPTR	<i>Populus trichocarpa</i>	SP	30944 5.4	33987 6.2	<i>1. ribose-5-phosphate isomerase activity</i>	K.SLNIPLTTLDDHPSLD LAIDGADEVDPENLV K.G K.SGMVLGLGTGSTAA FVVAK.L K.VQGWETDDVEEIAL K.L
PE454	Adenosine kinase	B9T0A9_RICCO	<i>Ricinus communis</i>	SP	37625 5.2	43897 5.7	<i>1. purine ribonucleoside salvage</i>	R.TAVITQGADPVVVA QDGK.L K.FPVIVLPK.D
PE455	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	D3WDQ2_9ROSI	<i>Euonymus americanus</i>	SP	55449 5.1	57431 5.8	<i>1. ATP synthesis 2. Hydrogen ion transport 3. Ion transport 4. Transport</i>	K.IVNIGTVLQVGDGIA R.I
PE456	Protein ycf2	YCF2_PHYPA	<i>Physcomitrella patens</i>	SP	271957 9.9	32489 9.3	<i>1. ATP binding 2. nucleoside-triphosphatase activity</i>	K.ILTNSLIFQIFSAFCEK .L K.FWGENDSLIVK.S K.TLNLVETNFFISNK.N K.ETVEYIAGGATQNSI K.V R.ITVITQGADPVVVAE DGK.V
PE457	Putative uncharacterized protein	A9PC83_POPTR	<i>Populus trichocarpa</i>	SP	37509 5.1	43560 5.6	<i>Indeterminado</i>	K.LVDTNGAGDAFVGG FLSQLMVQEKPIEDCV K.A R.ALGDYLGVK.V R.ILSSGVHVVVGTPGR. V K.DQIYDIFQLLPPK.I
PE464	Eukaryotic initiation factor 4A-9	IF4A9_TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP	46796 5.5	48980 5.7	<i>1. protein biosynthesis</i>	

(continuação)

Spot	Identidade	Acesso	Espécie	Base	PM pi (teórico)	PM pi	GO Processo Biológico	Peptídeos encontrados
PE465	Adenosine kinase 2	CX047513	<i>Citrus sinensis</i>	SP	37846 5.1	37654 5.7	1. <i>host-virus interaction</i> 2. <i>purine salvage</i>	K.ETVEYIAGGATQNSI K.V K.YYEDESAPTGTCAVC VVGGER.S R.ITVITQGADPVVVAE DGK.V R.FLEYLDK.D K.KVDLFENGTTAIVEAI SPELGNR.V R.VQLPGLSQELLQK.L
PE474	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2	FTSH2_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i>	SP	72493 5.5	71345 6.8	1. <i>protein catabolic process</i> 2. <i>proteolysis</i>	K.QDFMEVVEFLK.K + Oxidation (M) K.AIAGEAGVPFFSISGS EFVEMFVGVGASR.V R.TPGFSGADLANLLNE AAILAGR.R R.AGDGMTFIFASDK.N + Oxidation (M) K.TLICYGAISSGALS TPGPPNLPPIR.K K.TLADPLNWGLAADQ M.K
PE561	Lectin protein kinase family protein	BE208867	<i>Citrus x paradisi</i>	NCBI	24702 5.2	25678 5.8	1. <i>protein phosphorylation</i>	K.TLADPLNWGLAADQ M.K
PE628	Phenylalanine ammonia-lyase	A5H1I7	<i>Nicotiana attenuata</i>	SP	78058 6.3	81239 6.7	1. <i>L-phenylalanine catabolic process</i> 2. <i>biosynthetic process</i> 3. <i>phenylpropanoid metabolic process</i>	K.ASSDWVMESMNK.G K.NGTALQTELIR.F R.GTITASGDLVPLSYIA GLLTGRPNK.A