

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JEAN CARLOS VENCIONECK DUTRA

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA PAREDE
CELULAR DE MAMOEIROS (*Carica papaya* L.)
INFECTADOS PELO *Papaya meleira virus* (PMeV)**

VITÓRIA
2015

JEAN CARLOS VENCIONECK DUTRA

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA PAREDE
CELULAR DE MAMOEIROS (*Carica papaya* L.)
INFECTADOS PELO *Papaya meleira virus* (PMeV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof Dr Antônio Alberto Ribeiro
Fernandes

Vitória

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

D975i Dutra, Jean Carlos Vencioneck, 1987 -
Investigação das alterações da parede celular de mamoeiros
(Carica papaya L.) infectados pelo Papaya meleira virus (PMeV)
/ Jean Carlos Vencioneck Dutra – 2015.
75 f. : il.

Orientador: Antônio Alberto Ribeiro Fernandes.
Coorientador: Patricia Machado Bueno Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carica. 2. Relações Hospedeiro-Patógeno.
I. Fernandes, Antônio Alberto Ribeiro. II. Fernandes, Patricia
Machado Bueno. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

JEAN CARLOS VENCIONECK DUTRA

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA PAREDE
CELULAR DE MAMOEIROS (*Carica papaya* L.)
INFECTADOS PELO *Papaya meleira virus* (PMeV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 05 de Março de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr Antônio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profª Drª Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Profª Drª Diolina Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof Dr Carlos Luiz Ferreira
Instituto Militar de Engenharia

Vitória

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmão por todo apoio e carinho. À vocês minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, Prof Dr Alberto, por confiar no meu trabalho e me apoiar em cada momento da execução deste.

À minha coorientadora, Profª Drª Patricia, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa e pelo apoio prestado.

À Drª Diolina e ao Dr Carlos que compõem essa banca examinadora, que com certeza irão contribuir com suas opiniões.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio pelo companheirismo.

Aos amigos irmãos, Arciles e Nayana, que tiveram a compreensão da minha ausência e sempre torceram por meu sucesso.

À Universidade Federal do Espírito Santo, e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela possibilidade de desenvolver esse trabalho.

Às agências de fomento FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo).

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, pelo apoio e
amor incondicional.*

“Ya se fue el platillo volador!”

Chespirito

RESUMO

A meleira, causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV), é uma doença importante no Brasil e no México devido as grandes perdas econômicas que ela causa. Estudos para avaliar a interação patógeno-hospedeiro em nível histológico são fundamentais para compreender os mecanismos responsáveis pela resistência natural das plantas. Neste estudo foram coletadas folhas de mamoeiros saudáveis e sintomáticos para meleira e observou-se a topografia e a dureza da parede celular dessas plantas por microscopia de força atômica (AFM). As imagens em duas dimensões obtidas a partir de diferentes áreas da parede celular mostraram que as paredes celulares das plantas saudáveis são mais uniformes do que as paredes de plantas doentes. As plantas saudáveis também apresentaram características constitutivas da parede celular mais elevadas do que as de plantas doentes e a média da força de adesão máxima observada foi maior em plantas saudáveis do que em plantas doentes. Estes resultados indicam que o PMeV promove alterações nas paredes das células, tornando-as mais frágeis e suscetíveis à ruptura. Estas alterações, associadas ao aumento da captação de água e aumento da pressão interna dos laticíferos, provocam o rompimento celular que leva à exsudação espontânea do látex e facilita a disseminação de PMeV para outros laticíferos. Os resultados deste trabalho fornecem novas percepções sobre a interação mamoeiro-PMeV que podem revelar-se úteis no que se refere a entender e controlar a meleira do mamoeiro.

Palavras-chave: Meleira. *Papaya meleira vírus*. Rompimento celular. Laticíferos. Interação planta-patógeno.

ABSTRACT

Papaya sticky disease, caused by *Papaya meleira virus* (PMeV), is an important papaya disease in Brasil and Mexico due the severe economic losses it causes. Studies to assess the pathogen-host interaction at a histological are fundamental in order to understand the mechanisms that underlie natural resistance. In this study we collected leaves of healthy and symptomatic papaya sticky diseased plants and observed the topography and mechanical properties of plant cell walls by atomic force microscopy (AFM). Two-dimensional images obtained from different areas of the cell wall showed that the cell walls of healthy plants are smoother than the walls of sticky diseased plants. Also healthy plants displayed higher constitutive characteristics of the cell wall than diseased plants and the average maximum adhesion force was higher on healthy plants than on diseased plants. PMeV promotes changes on cell walls, making them more fragile and susceptible to breakage. These changes, associated with increased water uptake and internal pressure of laticifers causes cell disruption that leads to spontaneous exudation of latex and facilitates the spread of PMeV to other laticifers. The results of this work provide new insights on the interaction papaya-PMeV which could prove helpful when trying to understand and control the papaya sticky disease.

Keywords: Papaya sticky disease. Papaya meleira virus. Cell disruption. Lactifers. Pathogen-host interaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Binder deformation* referente aos mamoeiros sadios e doentes _____47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa do Brasil _____	17
Figura 2 Frutos e folha de mamão com os principais sintomas da meleira do mamoeiro _____	25
Figura 3 Esquema simplificado do funcionamento do equipamento AFM _____	30
Figura 4 Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro sadio _____	36
Figura 5 Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro sadio com vales na parede celular _____	37
Figura 6 Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro doente _____	38
Figura 7 Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro doente com vales na parede celular _____	39
Figura 8 Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro sadio _____	40
Figura 9 Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro sadio com vales na parede celular _____	41
Figura 10 Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro doente _____	42
Figura 11 Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro doente com vales e cumes proeminentes na parede celular _____	43
Figura 12 Parâmetro Ra de rugosidade estrutural da parede celular de mamoeiros sadios e doentes _____	44
Figura 13 Mapas e histogramas de força de adesão gerados pela interação entre o cantilever e a superfície da parede celular de plantas sadias e doentes em AFM _____	45
Figura 14 Média da força de adesão da parede celular de mamoeiros sadios e doentes _____	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μm	Micrômetro
Ψ_w	Potencial hídrico
AFM	Microscópio de força atômica (do inglês <i>Atomic force microscopy</i>)
BD	Binder deformation (termo em inglês sem tradução para o português)
dsRNA	RNA dupla-fita (do inglês <i>Double-strand RNA</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
ha	Hectare
INCAPER	Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
Kb	Quilobases
kHz	Quilohertz
m	Metro
m^2	Metro quadrado
M	Molar
mL	Mililitros
N/m	Newton por metro
nN	Nanonewton
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
OH^{\bullet}	Radical hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
PMeV	<i>Papaya meleira virus</i>
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
Ra	Média aritmética de rugosidade
RNA	Ácido ribonucleico
Si_3N_4	Nitreto de silício
SPM	Microscópio de varredura por sonda (do inglês <i>Scanning Probe Microscope</i>)
STM	Microscópio de varredura por tunelamento (do inglês <i>Scanning Tunneling Microscope</i>)

t	Tonelada
t/ha	Tonelada por hectare
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
V	Volts
v/v	Porcentagem em volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Fruticultura, importância econômica no agronegócio	16
2.1.1	Fruticultura no Brasil	16
2.1.2	Fruticultura no Espírito Santo	17
2.2	O mamoeiro	19
2.2.1	Centro de origem e domesticação do mamoeiro	19
2.2.2	Caracterização botânica do mamoeiro	20
2.3	Produção de mamão	21
2.3.1	Produção de mamão no mundo	21
2.3.2	Produção de mamão no Brasil	23
2.3.3	Problemas na produção do mamoeiro	24
2.3.3.1	A meleira do mamoeiro	24
2.4	Mecanismos de defesa em plantas	26
2.5	Microscopia	27
2.5.1	Breve histórico	28
2.5.2	Microscopia de força atômica	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Material vegetal	32
4.2	Preparação das amostras	32
4.3	Aquisição de imagens	33
4.4	Mapas de força-distância e <i>Binder deformation</i>	33
4.5	Análise estatística	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Análise topográfica das paredes celulares	35
5.2	Propriedades mecânicas da parede celular	44
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	51

8	REFERÊNCIAS	52
9	MANUSCRITO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.....	57

1 INTRODUÇÃO

A produção de mamão (*Carica papaya* L.) no Brasil gera rendas anuais de aproximadamente 1,5 bilhões de reais (IBGE, 2010) e, com uma área cultivada de 34,213 ha e produção de 1,87 milhões de tonelada por ano, o país é o segundo maior produtor de mamão no mundo (FAO, 2012). As doenças são um problema crescente e constituem uma séria questão fitossanitária no cultivo e comercialização de frutos. A meleira, causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV), limita as exportações de mamão e é responsável por grandes perdas econômicas (ABREU et al., 2012)

Os tecidos saudáveis de mamoeiros possuem células especializadas denominadas laticíferos e só exsudam látex, substância rica em proteases e alcaloides, quando sofrem algum tipo de injúria (EL MOUSSAOUI et al., 2001). Quando doentes, com meleira, os mamoeiros apresentam exsudação espontânea de látex com aspecto aquoso e translucido a partir de folhas e frutos (RODRIGUES et al., 1989; VENTURA et al., 2001; VENTURA et al., 2004). O látex de plantas doentes exsudado espontaneamente oxida após ficar sob condições atmosféricas, resultando pequenas lesões necróticas na borda de folhas jovens e promove a formação de manchas no fruto, o que o torna pouco aceito para comercialização e consumo (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003; NAQVI, 2004; VENTURA et al., 2004).

As plantas sob condições ambientais estão expostas a patógenos e, por isso, elas possuem diferentes mecanismos de reconhecimento e defesa contra esses organismos (LI et al., 2011). Estudos em nível histológico para compreender a interação patógeno-hospedeiro têm demonstrado ser um eficaz meio de entender os mecanismos naturais de resistência estabelecidos (BENTES; MATSUOKA, 2005). Estudos por microscopia óptica têm sido conduzidos para investigar alterações morfológicas em tecidos de mamoeiros transgênicos (LEAL-COSTA et al., 2010) e contaminados com meleira (RODRIGUES et al., 2009). Recentemente a microscopia de força atômica (AFM) tem sido utilizada em estudos com a parede celular de plantas (MILANI et al., 2011; RADOTIĆ et al., 2012) e para investigar alterações

estruturais e as propriedades mecânicas da parede celular de plantas expostas a microrganismos (LESNIEWSKA et al., 2004;. AQUIJE et al., 2010).

Considerando que os primeiros sintomas da meleira aparecem nas folhas (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003; VENTURA et al., 2004), no presente estudo, foram coletadas folhas de plantas saudáveis e plantas sintomáticas para meleira e, por microscopia de força atômica, foram observadas as alterações na topografia e propriedades mecânicas da parede celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fruticultura, importância econômica no agronegócio

O agronegócio possui grande destaque dentre as atividades econômicas desenvolvidas no Brasil, despertando o interesse de pesquisadores, estudiosos e investidores, mesmo em momentos de crise econômica. Isto ocorre em função do agronegócio contribuir em, aproximadamente, 33% da formação do PIB, 42% do volume de exportações e 37% na geração de empregos (NEVES; CONEJERO, 2007).

2.1.1 Fruticultura no Brasil

Com uma produção de frutas de aproximadamente 40 milhões de toneladas por ano, o Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de frutas. A área destinada a produção de frutos no Brasil é de aproximadamente 1,9 milhão de hectares e, mesmo sendo grande produtor, a participação do país no comércio global do setor é de apenas 2%, o que demonstra o forte consumo interno (GAZETA, 2010).

Frutos como laranja, banana, abacaxi, melancia e mamão representam boa parte do volume total da produção de frutos no Brasil e, juntos, somam aproximadamente 30 milhões de toneladas (IBGE, 2009). No período entre 1994 e 1999 a importação de frutos foi maior que a exportação, caracterizando um período negativo para este setor produtivo. Contudo, a partir de 1999, o volume exportado de frutos passou a ser maior que o volume importado e desde então o Brasil vem se destacando mundialmente no mercado de exportação de frutas frescas (FAO, 2012).

Esta cadeia produtiva também é importante no que tange as políticas de interiorização do desenvolvimento, uma vez que dinamiza economias locais

estagnadas e com poucas alternativas de desenvolvimento (BUAINAIN, 2007), além de contribui significativamente com a diminuição do fluxo migratório e com a redução da pressão populacional nas capitais e regiões metropolitanas do país (NEVES; CONEJERO, 2007).

2.1.2 Fruticultura no Espírito Santo

Localizado na região Sudeste do Brasil, o Estado do Espírito Santo ocupa uma área de 46,18 mil km², equivalente a 0,53% do território brasileiro (Figura 1). Mesmo com pequena extensão territorial, em função da latitude, relevo e clima, o Estado apresenta variação agroambiental, o que propicia a produção de frutas diversas (INCAPER, 2010).

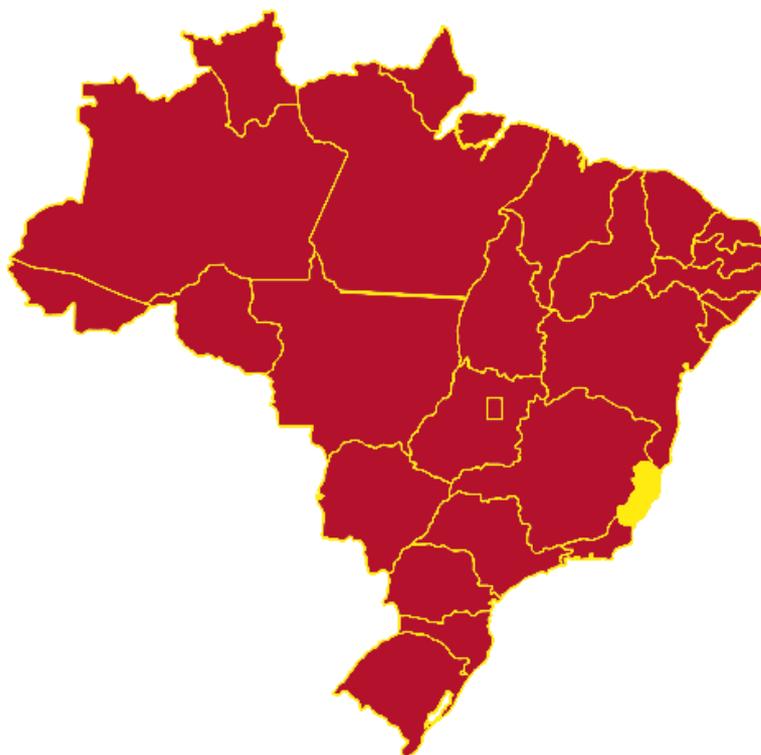


Figura 1: Mapa do Brasil – Em destaque o Estado do Espírito Santo, hachurado em amarelo. Fonte: google imagens.

O cultivo de frutos em grande escala no Espírito Santo constitui uma excelente opção de diversificação para a agropecuária do Estado, tornando-o mais competitivo no mercado nacional (SILVA; COSTA, 2007).

A fruticultura no Espírito Santo teve início nos anos de 1960, com o plantio de lavouras de banana em substituição às lavouras cafeeiras. Ainda década de 60 foram implantadas lavouras de abacaxi na região Sul e entre as décadas de 70 e de 80 foram implantadas as primeiras lavouras comerciais de mamão na região Norte do Espírito Santo, que hoje é considerada a principal fruta produzida no Estado (SILVA; COSTA, 2007).

Até o ano de 2002 a produção anual de frutas no Espírito Santo era pouco significativa e não ultrapassava 750 mil toneladas. No decorrer do tempo a fruticultura capixaba passou a registrar valores expressivos para o setor do agronegócio e, atualmente, corresponde a 18% do valor bruto da produção agropecuária do Estado, com 85 mil hectares plantados, que produzem cerca de 1,3 milhões de toneladas de frutas por ano, gerando R\$ 600 milhões em renda (INCAPER, 2010). A fruticultura promove novas atividades econômicas rentáveis na prestação de serviços, assistência técnica e inovação tecnológica, o que gera renda, empregos e oportunidades de negócio para o Espírito Santo, o que a torna relevante em âmbito social e econômico.

Além disso, o aumento do consumo de frutas expande as possibilidades de negócios tanto no mercado interno quanto externo, atraindo investimentos na agroindústria e a implantação de parques agroindustriais para processamento de frutas, potencializando o agronegócio da fruticultura em todo o Estado (SILVA; COSTA, 2007).

2.2 O mamoeiro

Especula-se que o mamoeiro (*Carica papaya* L.) seja originário da América tropical e tenha sido disseminado para todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo pelos navegadores espanhóis e portugueses, tornando-se uma das frutas mais apreciadas e populares do mundo (MEDINA et al., 1980; MANICA et al., 2006). As culturas de mamoeiro estão presentes em quase todo território nacional e a área cultivada tem se expandido em virtude da boa aceitação do fruto no mercado interno e externo (OLIVEIRA; CALDAS, 2004).

2.2.1 Centro de origem e domesticação do mamoeiro

Apesar das inúmeras investigações realizadas, é difícil definir a origem de *C. papaya* L. em função da falta de evidências arqueológicas (FUENTES; SANTAMARÍA, 2014). *Carica papaya* L. foi amplamente distribuída pelos espanhóis e portugueses e atualmente está presente na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, o que dificulta saber a origem exata desta espécie.

Vavilov (1992) descreve três possíveis centros de origem para a maioria das espécies: o Centro Mesopotâmico, o Centro Mesoamericano e o Centro do Norte Chinês. O Centro Mesoamericano se destaca como o centro de origem de importantes plantas de culturas tropicais (Harlan, 1971), o que a torna um forte candidato ao centro de origem de *Carica papaya* L.. Outra evidência de que *C. papaya* L. tenha origem mesoamericana está associada ao fato de, ainda hoje, ser possível encontrar populações selvagens desta espécie em locais isolados do sul do México e na América Central, como por exemplo, as populações de mamoeiros selvagens encontradas por Manshardt e Zee (1994) em planícies costeiras na porção caribenha do sul do México e do norte de Honduras.

Também tem sido considerado difícil inferir com exatidão o local e quando *C. papaya* L. foi domesticado. Existem evidências de que a domesticação do mamoeiro, assim

como a do milho, tenha sido iniciada por populações maias e astecas situadas no México e na América Central (FUENTES; SANTAMARÍA, 2014). Inúmeros estudos incluem o mamão na lista de plantas utilizadas pelos maias em seus sistemas agrícolas bem desenvolvidos (OVIEDO 1951; DUNNING et al, 1998;. TERÁN; RASMUSSEN, 1995; COLUNGA-GARCÍAMARÍN; ZIZUMBO-VILLARREAL, 2004), indicando que mamoeiro já era cultivando no México e em Belize antes da chegada dos espanhóis (FUENTES; SANTAMARÍA, 2014).

2.2.2 Caracterização botânica do mamoeiro

Carica papaya, descrito por Von Linnaeus (1753), pertence a família Caricaceae, uma família bem representada na região Neotropical, que é composta por 6 gêneros e 35 espécies. Segundo Badillo (1993, 2000), os gêneros pertencentes a esta família são: *Carica* – 1 espécie, *Jarilla* – 3 espécies, *Horovitzia* – 1 espécie, *Jacaratia* – 7 espécies, *Vasconcellea* – 21 espécies e *Cylicomorpha* – 2 espécies.

O mamoeiro é uma planta herbácea, semi-lenhosa, de desenvolvimento rápido, cujo crescimento pode oscilar entre 1 e 3 m durante o primeiro ano de vida. Embora as plantas em cultivo comercial não ultrapassem 5 – 6 m, as plantas podem atingir até 10 m de altura. Quando adultas, podem apresentar as formas sexuais feminina, masculina e hermafrodita, ocorrendo em plantas distintas. As folhas desta planta são grandes, aproximadamente 0,6 m², alternadas e lobadas, podendo apresentar entre 5 e 9 lobos. As folhas são dispostas em padrão espiral e sustentadas por pecíolos de 30 à 105 cm de comprimento, que são ocos e de crescimento quase horizontal (MORTON; 1987).

As folhas do mamoeiro são hipostomáticas, com estômatos anomocítico ou anisocíticos, ou seja, sem células subsidiárias e com células guarda assimétricas (CRUZII, 2009; LEAL-COSTA et al., 2010). Além disso, foram identificados nas folhas compostos biologicamente ativos que são importantes para esta planta (CANINI et al., 2007; ZUNJAR et al., 2011) e estão relacionadas ao controle do

metabolismo, defesa, sinalização e mecanismos proteção contra o excesso de luz e outros estresses (EL MOUSSAOUI et al., 2001; KONNO et al., 2004).

2.3 Produção de mamão

Carica papaya L. é cultivado comercialmente no mundo, possui ampla distribuição mundial, é uma das fruteiras mais comuns na América Latina e possui grande expressão econômica e social nos países em que é produzido. Contudo, doenças e pragas limitam o desenvolvimento desta cultura, causando grandes perdas econômicas com a diminuição da qualidade e redução na produtividade do fruto.

2.3.1 Produção de mamão no mundo

A área de cultivo de mamão aumentou continuamente nos últimos 50 anos. A área destinada a produção desta cultivar, que era de 114.192 ha em 1961, chegou a 438.239 ha em 2010, com aumento de rendimento médio de 11,58 t/ha para 24,95 t/ha. Nos últimos 50 anos também foram observados aumentos significativos na produção mundial de mamão, passou de 1 milhão de toneladas para 10 milhões de toneladas, com produtividade estimada 3,5 bilhões de dólares em 2009 (FAO, 2011; FUENTES e SANTAMARÍA, 2014).

Os maiores níveis de produção mundial de mamão foram observados entre 1990 e 2000, estando entre os cinco maiores produtores de mamão nos últimos 50 anos a Índia, Nigéria, Brasil, México e Indonésia. Na década de 1960 a produção de mamão estava quase totalmente concentrada na Índia, Indonésia e Nigéria, contudo, nas décadas de 1980 e 1990 o Brasil e o México aumentaram sua produtividade,

produzindo quantidades equivalentes ao de países como Índia e Nigéria (FAO, 2011).

Na última década, considerando o ano de 2009, Índia e Brasil têm mantido o aumento da produção de mamão, ocupando os postos de primeiro e segundo maiores produtores, com produção média de 4 e 1,8 milhões de toneladas, respectivamente. No que se refere à Nigéria e ao México, os valores médios de produção deste fruto não ultrapassaram a média de 700 e 766 mil toneladas para o período citado e ocupam o terceiro e quarto lugar em produção, seguidos pela Indonésia, que ocupa o quinto lugar com produção média de mamão entre 650 e 765 mil toneladas (FAO, 2011).

Outros cinco países completam o ranking dos dez maiores produtores de mamão do mundo são a Etiópia, Congo, Tailândia, Guatemala e Colômbia. Dependendo do ano, países como Venezuela e China também fazem parte dos dez principais produtores de mamão, com níveis de produção menores, que variam entre 189 e 260 mil toneladas por ano (FAO, 2011). Se tomados como regiões, a Ásia produziu 5,4 milhões de toneladas, cerca de 52% da produção mundial de mamão, a América produziu 3,6 milhões de toneladas e a África produziu 1,4 milhões de toneladas de mamão, o que corresponde, respectivamente, a 34% e 14% da produção mundial de mamão em 2009.

Os elevados níveis de produção aqui relatados colocaram o mamão entre as cinco frutas tropicais mais produzidas no mundo. No entanto, a produção mundial de mamão, cerca de 10 milhões de toneladas, está longe de alcançar o nível de produção das frutas tropicais mais produzidas no mundo, como, por exemplo, a produtividade de manga, mangostão e goiaba, que juntas atingem produção superior a 35 milhões de toneladas, assim como, está longe de alcançar o nível de produção de banana, que é superior 25 milhões de toneladas (FAO, 2011). Em termos produtivos, segundo FAO (2011), a produção mundial de mamão está avaliada em 3,5 milhões de dólares, o que é baixo quando comparada a produção de banana, que atinge 28 bilhões de dólares, e tal comparação sugere que ainda há possibilidade para aumentar a capacidade produtiva de mamão.

Em termos relativos à exportação de mamão, no ano de 2009, os cinco maiores exportadores foram o México, Brasil, Belize, Malásia e Índia. Se considerados os 20 maiores países exportadores, um total de 215 mil toneladas de mamão foram exportados, um montante de 119 milhões de dólares. Em termos de importação, os cinco maiores consumidores, importadores, de mamão foram os Estados Unidos, União Europeia, Singapura, Canadá e Holanda, que compoem o quadro dos 20 maiores importadores de mamão, importaram cerca de 232 mil toneladas do fruto, um valor de aproximadamente 199 milhões de dólares (FAO, 2011).

2.3.2 Produção de mamão no Brasil

Nos últimos 50 anos o Brasil aumentou a produtividade de mamão de 12,75 t/ha em 1960 para 25,39 t/ha em 2009 (FAO, 2011). Com o aumento na produtividade, o Brasil se destaca mundialmente como segundo maior produtor deste fruto, superado apenas pela Índia, com uma área de 34.213 ha e uma produção de 1,87 milhões de toneladas de mamão em 2010, correspondendo a 16,67% da produção mundial (FAO, 2012).

O mamão é produzido em todo Brasil e os Estados da Bahia e o Espírito Santo são os maiores produtores deste fruto, produção de 910,131 e 613, 734 toneladas de mamão respectivamente. Em 2008, o Estado da Bahia foi responsável por produzir 47,7% dos frutos, seguido pelo Espírito Santo com 33% da produção. No entanto, o rendimento médio no Espírito Santo foi de 79 t/ha, superior ao da Bahia, 54 t/ha (IBGE, 2009; SERRANO; CATTANEO, 2010), devido à irrigação.

No cenário nacional o mamoeiro ocupa a quarta posição na produção de frutos e está atrás apenas da produção de laranja, banana e uva, gerando um valor de produção da ordem de 1,5 bilhões de reais (IBGE, 2010). A cultura do mamoeiro tem grande expressão econômica e social por proporcionar empregos e renda. A produção nacional é de 250,954 toneladas de fruto em uma população de 9.495.308 pés, que gera uma renda de aproximadamente 126,52 milhões de reais por ano (IBGE, 2012). Ainda segundo o IBGE (2012), os estados da Bahia, Rio Grande do

Norte e Espírito Santo formam o grupo dos maiores exportadores do País (SÁ et al., 2013).

2.3.3 Problemas na produção do mamoeiro

Muitos fatores interferem no desenvolvimento da cultura do mamoeiro, como sua natureza dioica, heterozigose e problemas fitossanitários. Dentre as doenças e pragas que atingem a cultura do mamoeiro, as viroses possuem grande destaque em função das perdas econômicas que promovem. Elas estão associadas à perda na qualidade dos frutos, redução na produtividade e, em alguns casos, à completa destruição da lavoura, inviabilizando o cultivo em algumas (KIMATI et al., 1997).

Os principais vírus que infectam o mamoeiro no Brasil são o vírus da mancha anelar (*Papaya ringspot virus*, PRSV) e o vírus da meleira (*Papaya meleira virus*, PMeV). O PRSV possui ampla distribuição geográfica, o primeiro relato de sua ocorrência foi no Havaí (NAKASONE, 1980) e atualmente é registrada em vários países tropicais e subtropicais em que o mamoeiro é cultivado, como no Brasil. O PMeV também é responsável por muitas perdas no cultivo do mamoeiro, seus primeiros relatos ocorreram no Brasil na década de 1980 e ocorre na região tropical (RODRIGUES et al., 1989).

2.3.3.1 A meleira do mamoeiro

O PMeV, responsável por causar a meleira do mamoeiro, é considerado um problema fitossanitário no cultivo nacional de mamão. No Brasil, este vírus afeta principalmente as plantações da região norte do Espírito Santo e do sul da Bahia, pode atingir até 100% de incidência e levar a perda total dos pomares se não forem feitas as medidas de prevenção e contenção necessárias (VENTURA et al., 2003).

A meleira foi inicialmente relatada no Brasil, na região sul da Bahia (CORREA et al., 1988) e depois no norte do Espírito Santo (RODRIGUES et al., 1989). Com a

propagação da doença, ela passou a ser detectada em alguns municípios dos estados de Minas Gerais, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte (VENTURA et al., 2003) e, em 2009, foi detectada no México (PEREZ-BRITO et al., 2012). Os principais sintomas da meleira são a exsudação espontânea de látex fluido e translúcido a partir do fruto e folhas do mamoeiro, que ao oxidar na superfície da fruta forma manchas, tornando os frutos inaceitáveis para comercialização e consumo (Figura 2) (VENTURA et al., 2004). A princípio, em função do desenvolvimento reduzido e queda na produção de frutos, esta doença foi associada a distúrbios na absorção de cálcio e boro, relacionados ao estresse hídrico (NAKAGAWA et al., 1987) ou com o desbalanço de bases trocáveis no solo (CORREA et al., 1988). Estudos posteriores detectaram a presença de partículas virais no látex de mamoeiros sintomáticos e o vírus foi caracterizado como um vírus de RNA fita dupla de 12kb, que ainda não foi classificado em nenhuma família viral conhecida (KITAJIMA et al., 1993; MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003).

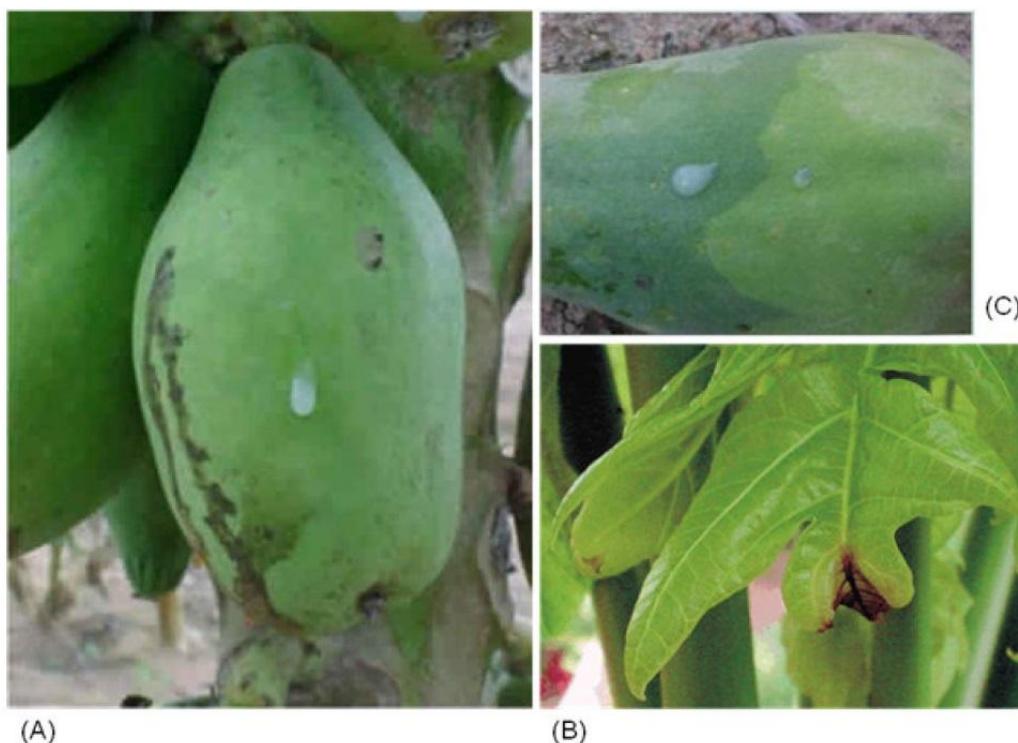


Figura 2: Frutos e folha de mamão com os principais sintomas da meleira do mamoeiro. (A) Exsudação espontânea de látex aquoso na superfície dos frutos. Note o látex oxidado, no lado esquerdo do fruto, com um aspecto “melado”. (B) Queima na ponta das folhas jovens. (C) Manchas zonadas superficiais de cor verde-clara. Fonte: VENTURA, et al., 2004.

Um experimento desenvolvido por Maciel-Zambolim et al. (2000) conseguiu reproduzir os sintomas da doença em plantas saudias após a inoculação do vírus, comprovando a etiologia viral da doença. Somado a isso, estudos com a finalidade de compreender os meios de transmissão deste vírus, demonstraram que o PMeV pode ser eficientemente transmitido por através da injeção de látex de plantas doentes nos caules de mamoeiros saudáveis (RODRIGUES et al., 2009).

A meleira é responsável por grandes perdas econômicas, o que tem motivado muitos pesquisadores a estudar esta doença (RODRIGUES et al., 2011; ABREU et al., 2014, TAPIA-TUSSELL et al., 2014) com finalidade de compreender melhor a interação planta-patógeno, a fim de gerar informações que auxiliem no desenvolvimento de uma cultivar resistente ao vírus.

2.4 Mecanismos de defesa em plantas

As plantas estão expostas a diversos estresses, como oscilações de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pestes ou patógenos. Frente a estresses, as plantas conseguem alterar a constituição de compostos moleculares, o que funciona como um mecanismo de resposta relacionado à defesa e proteção do organismo (SOARES; MACHADO, 2007). No decorrer de seu processo evolutivo, os vegetais desenvolveram estratégias de sobrevivência, tais como mecanismos de resposta quando são reconhecidas agressões (SHEWRY; LUCAS, 1997; WIT, 2007).

No que se refere à defesa vegetal, a resistência a patógenos é um processo complexo que combina vários fatores (SOARES; MACHADO, 2007). Geralmente é feita uma distinção entre os padrões de defesa observados em plantas, sendo divididos em sistemas pré-existentes, ou constitutivos, de defesa e em sistemas induzidos pela agressão do patógeno. Outra classificação possível é a de mecanismos de defesa estruturais, baseados em características anatômicas, e mecanismos químicos, relacionados a compostos biologicamente ativos variados (SHEWRY; LUCAS, 1997).

A defesa estrutural é encontrada em diversas partes da planta e é conferida, por exemplo, por pelos, espinhos, tricomas e ceras que recobrem a superfície da planta (BOWLER; FLUHR, 2000). No que se refere à defesa estrutural, a parede celular e a cutícula possuem certo destaque, uma vez que, estas estruturas formam uma barreira espessa e rígida, que confere proteção mecânica às plantas (ŁAŻNIEWSKA et al., 2012).

A defesa química é mediada por diferentes substâncias, como aminoácidos não proteicos, alcalóides, fenóis, saponinas, lectinas, RIPs (proteínas inativadoras de ribossomos), quitinases, glucanases, flavonoides, inibidores de proteases e alérgenos (BOWLER; FLUHR, 2000; XAVIER-FILHO, 1992). Frente à infecção, injúrias e predação, pode ser induzida a produção de proteínas relacionadas à patogênese que são subdivididas em diversos grupos, tais como, β -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases (SHEWRY; LUCAS, 1997; WIT, 2007).

Se os fatores de defesa químico e constitutivo não forem suficientes para evitar uma infecção, o sistema de defesa induzido é ativado. Tal evento inclui a rápida geração de espécies reativas de oxigênio, alterações em polímero da parede celular, síntese de metabólitos de baixo peso molecular, como as fitoalexinas, produção de proteínas relacionadas à defesa e à resposta de hipersensibilidade seguida por morte celular programada. Coletivamente, esses sistemas primeiro inibem e depois impedem a infecção pelo potencial patógeno (SHEWRY; LUCAS, 1997; HEGEDÜS et al., 2001; SCHMELZER, 2002; RIZZARDI et al., 2003).

2.5 Microscopia

A microscopia teve início nos anos de 1660, com o desenvolvimento do primeiro microscópio ótico. Apesar de ser considerado rudimentar, este equipamento trouxe a tona um mundo até então invisível. Desde então, os microscópios não pararam de evoluir e se tornaram fundamentais para o avanço das fronteiras do conhecimento (GALEMBECK et al., 2013).

2.5.1 Breve histórico

Em 1665, Robert Hooke, com seu microscópio óptico rudimentar examinou uma fatia de cortiça, visualizando estruturas impossíveis de serem vistas a olho nu, descobrindo um mundo invisível (GALEMBECK et al., 2013). Com o desenvolvimento tecnológico, os microscópios foram evoluindo, se tornaram cada vez mais refinados e capazes de gerar imagens de alta resolução.

Embora a teoria atômico-molecular da matéria estivesse bem consolidada desde o início do século XX, no início dos anos 1980, os microscópios eletrônicos ainda não apresentavam resolução suficiente para visualizar os átomos. Posteriormente, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, em 1982, criaram o microscópio de varredura por tunelamento (*Scanning Tunneling Microscope*, STM), nos laboratórios de pesquisa da IBM em Rüschlikon, na Suíça (BINNIG, 1982), e, utilizando o STM, foi possível obter as primeiras imagens de átomos, o que deu a Binnig e Rohrer o Prêmio Nobel de Física, em 1986.

O microscópio de tunelamento viabilizou a produção de imagens em escala atômica e a manipulação de átomos individuais. Depois da invenção do microscópio de tunelamento, surgiram os microscópios de varredura por sonda (*Scanning Probe Microscope*, SPM). Os SPMs geram imagens impressionantes, contudo, seu uso era restrito a superfícies rígidas e eletricamente condutoras, ou semicondutoras (GALEMBECK et al., 2013). Em 1986, Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber criaram o microscópio de força atômica (*Atomic Force Microscope*, AFM) (BINNIG et al., 1986). As primeiras imagens de AFM mostravam a topografia de superfícies sólidas, incluindo a topografia de materiais eletricamente isolantes, como vidros, cerâmicas, polímeros e materiais de origem biológica.

O desenvolvimento do AFM foi extremamente importante, de tal forma que o número de artigos científicos publicados usando esse microscópio é de aproximadamente 45 mil, enquanto o número de artigos utilizando STM ainda não chegou a 20 mil (GALEMBECK et al., 2013). De modo geral, desde sua criação, o AFM se tornou uma importante plataforma de novas microscopias, que produz vasta quantidade de

informações sobre as propriedades físicas e físico-químicas de superfícies, tais como informações sobre as propriedades elétricas, magnéticas, mecânicas, térmicas e químicas de superfícies.

2.5.2 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica independe da interação da superfície analisada com a luz ou elétrons. A varredura, análise do material, é realizada por uma sonda de ponta muito fina que percorre a superfície da amostra. A distância entre a sonda, cantilever, e a superfície da amostra analisada é muito pequena, menos de 10 nm, e o cantilever pode tocar a superfície da amostra em alguns ensaios (WILSON; BULLEN, 2006).

As forças resultantes das interações do cantilever com os átomos ou moléculas da superfície da amostra promove interações intermoleculares de Van der Waals, que são significativas e podem ser medidas, uma vez que, as interações intermoleculares fazem com que ocorra a deflexão da sonda, que oscila entre 0,2 nm e 10 nm, durante a realização do ensaio (WILSON; BULLEN, 2006; GALEMBECK et al., 2013).

Um laser semiconductor incide sobre a parte de trás do cantilever e contra um detector fotodiodo sensível às variações de posição. Este detector mede a flexão da ponta do cantilever em relação à amostra (Figura 3) e essas medidas são usadas para gerar imagens em 3D e mapas topográficos da superfície (WILSON; BULLEN, 2006).

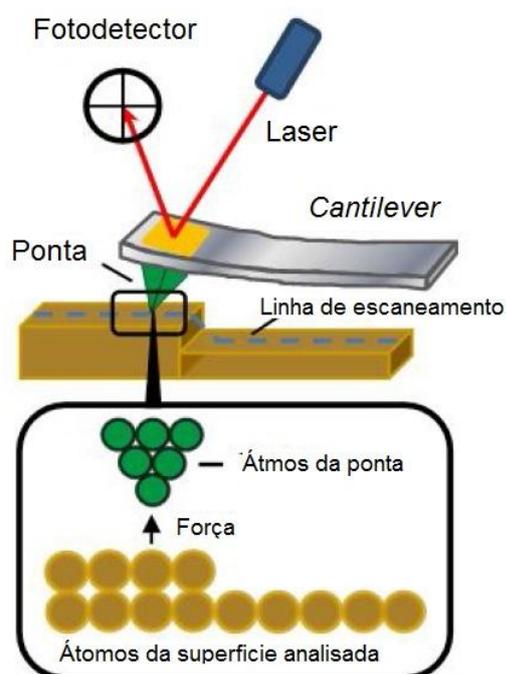


Figura 3: Esquema simplificado do funcionamento do equipamento AFM. Figura alterada.
Fonte: WILSON; BULLEN, 2006.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar por meio de microscopia de força atômica as alterações morfológicas e estruturais induzidas pelo *Papaya meleira virus* na parede celular de folhas de mamoeiros doentes.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações na topografia da parede celular de mamoeiros sadios e doentes;
- Avaliar as alterações das propriedades mecânicas, dureza e rugosidade, de paredes celulares de plantas sadias e doentes.
- Desenvolver uma ferramenta biotecnológica para o diagnóstico de plantas infectadas pelo PMeV.

4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

Os mamoeiros (cv. Golden) foram cultivados na Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Espírito Santo, Brasil. Entre 3 e 4 meses após a germinação, um grupo de plantas foi inoculado com látex doente (RODRIGUES et al., 2009) e outro grupo não recebeu a solução de inoculação. Depois de 22 e 23 meses sob condições ambientais, 4 plantas sintomáticas e 2 plantas assintomáticas foram escolhidas com base no diagnóstico visual para meleira. O diagnóstico molecular do PMeV-dsRNA foi realizado como descrito em literatura (ABREU et al., 2014) e confirmaram que as plantas assintomáticas estavam saudáveis e que as plantas sintomáticas estavam infectadas com o vírus PMeV.

4.2 Preparação das amostras

Folhas de mesmo tamanho e idade foram coletadas de plantas saudáveis e doentes e com o auxílio de uma lâmina estéril foram excisadas seções transversais da nervura central. As seções transversais foram fixadas em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 30 minutos, lavadas e desidratadas em série graduada de etanol à 30, 50, 70, 90 e 100% (v/v) e secas em ponto crítico (CO₂) para análise em Microscópio de Força Atômica Shimadzu SPM-9600 em temperatura ambiente (17°C) e 50–55% de umidade relativa.

4.3 Aquisição de imagens

As amostras foram codificadas e as análises foram realizadas em seções transversais da nervura central em teste cego. Posteriormente 5 amostras codificadas de cada planta foram fixadas em lamínulas, utilizando um pequeno pedaço de fita adesiva dupla face, e 5 pontos aleatórios foram escolhidos para serem analisados; 25 imagens/pontos foram analisados em cada planta, totalizando 150 imagens/pontos. A tomada de imagens foi realizada no modo contato de força constante, usando pontas, cantilevers, de Si_3N_4 OMCL-TR (Olympus, Tokyo, Japão) com constante de mola de 0,57 N/m e frequência de ressonância de ≈ 73 kHz. As imagens foram obtidas no AFM como 512x512 pixels, velocidade de varredura de 1 Hz e tamanho de digitalização de 1000 nm.

4.4 Mapas de força-distância e *Binder deformation*

Foram escolhidas aleatoriamente 1 planta sadia e 1 planta doente. Foram fixados em uma lamínula 5 seções transversais da nervura central de cada planta, usando um pequeno pedaço de fita adesiva dupla face, e 5 pontos aleatórios foram escolhidos para serem analisados; 5 mapas de força/pontos foram analisados para cada planta, totalizando 25 mapas de força/pontos analisados por planta. Os dados de força-distância e *binder deformation* foram obtidos no modo contato de força constante, usando pontas, cantilevers, de Si_3N_4 OMCL-TR (Olympus, Tokyo, Japão) com constante de mola de 0,57 N/m e frequência de ressonância de ≈ 73 kHz. Cada mapa de força foi constituído por 16x16 curvas de força em uma área de digitalização de 1000 nm. A partir da interação entre a ponta de prova do AFM, *cantilever*, e a amostra, mapas de força de adesão foram gerados utilizando os dados da curva de força-distância. Os mapas gerados foram analisados utilizando o software Force Mapping do próprio equipamento, SPM-9600 séries (Shimadzu

Corporation, Kyoto, Japão), e os valores de *binder deformation* foram obtidos a partir da diferença retração (*Z Piezo Position*) e a quantidade de deflexão da *cantilever*, de acordo com a seguinte fórmula estabelecida pela Shimadzu Corporation (disponível em http://www.shimadzu.com/an/journal/selection/selection2-3_02.pdf):

$$\text{Binder Deformation} = Z \text{ Piezo Position} - \text{Deflexão do cantilever}$$

4.5 Análise estatística

A análise estatística para comparar as diferenças entre plantas saudáveis e doentes foi realizada através do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise topográfica das paredes celulares

As imagens em duas dimensões obtidas de diferentes regiões da parede celular mostrou que as paredes celulares das plantas saudáveis são mais lisas (Figura 4) do que as paredes celulares de plantas com meleira (Figura 6). Tanto as plantas saudáveis quanto as plantas doentes apresentaram vales na parede celular (Figura 5, 7), os quais foram muito mais profundos em plantas doentes (Figura 7) do que em plantas saudáveis (Figura 5).

As imagens tridimensionais evidenciaram a microestrutura lisa (Figura 8), com vales pouco profundos (Figura 9), em plantas saudáveis, em contraste a microestrutura grosseira (Figura 10), com cumes proeminentes e vales profundos (Figura 11), em plantas doentes.

O valor da rugosidade média do perfil (R_a) (Figura 12) foi maior para as plantas doentes ($0,0026V \pm 0,0002$) do que para plantas saudáveis ($0,0019V \pm 0,0001$) e mostra que há diferença significativa entre a rugosidade da parede celular de plantas saudáveis e doentes.

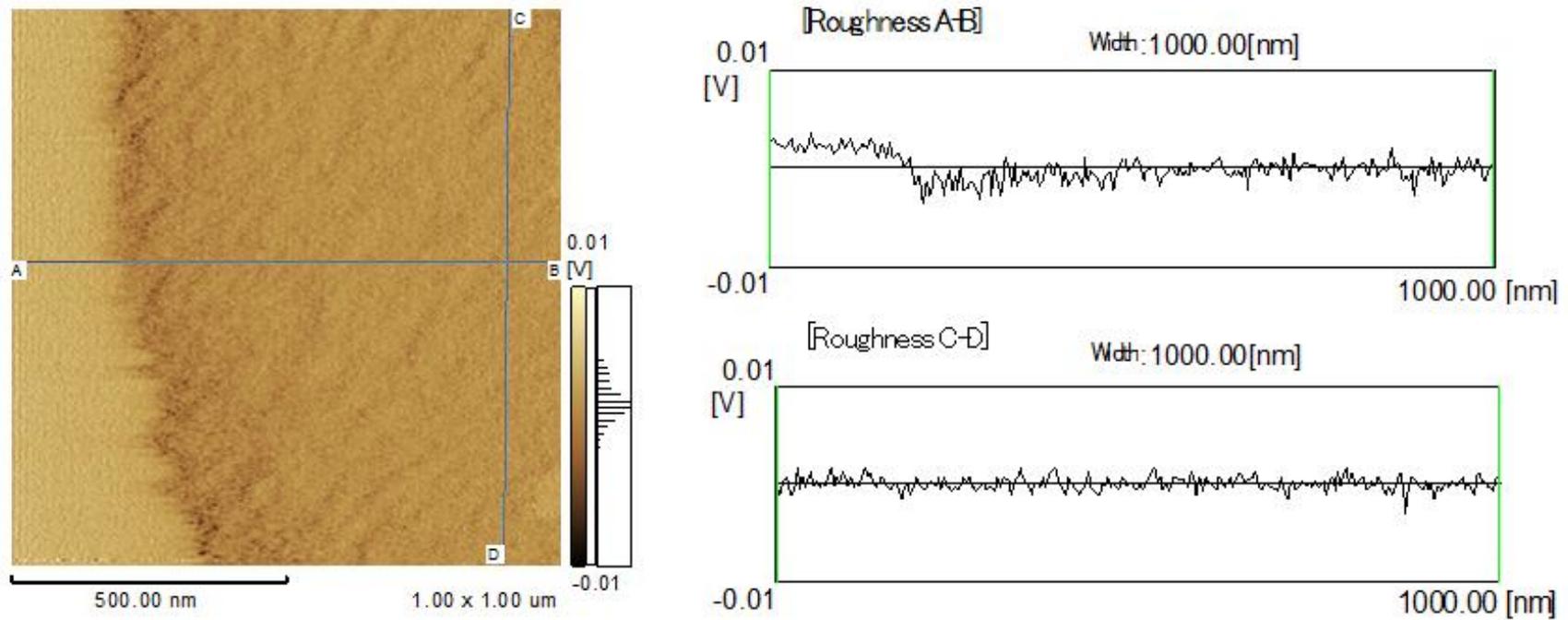


Figura 4: Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro sadio. Rugosidade A-B: rugosidade na linha horizontal (linha A-B); rugosidade C-D: rugosidade na linha vertical (linha C-D).

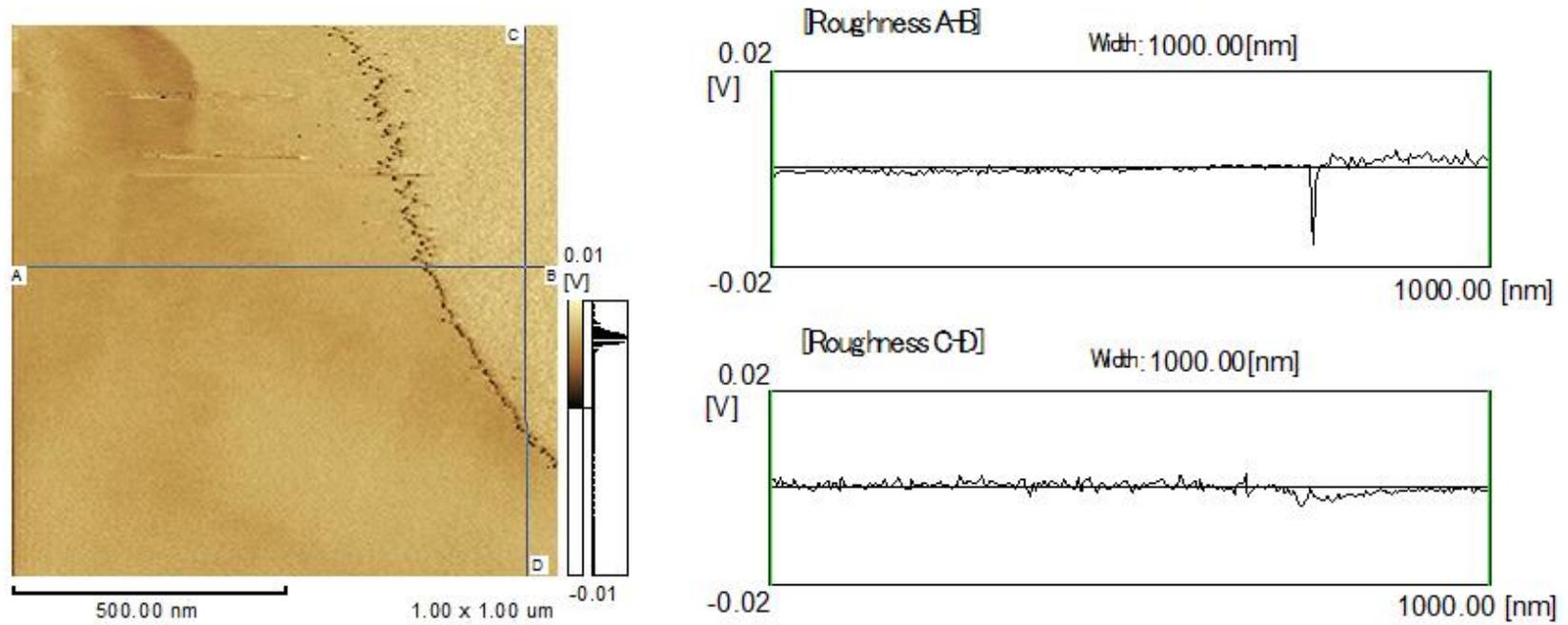


Figura 5: Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro sadio com vales na parede celular. Rugosidade A-B: rugosidade na linha horizontal (linha A-B); rugosidade C-D: rugosidade na linha vertical (linha C-D).

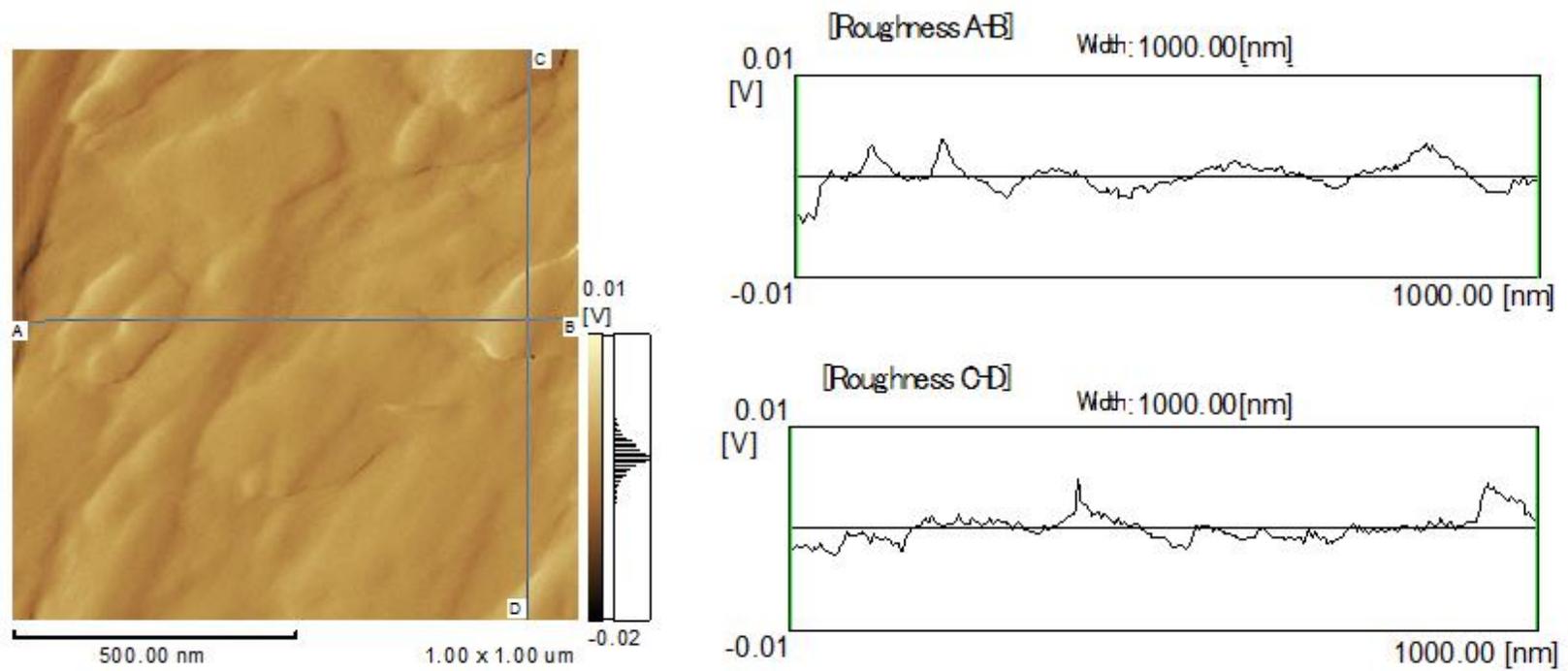


Figura 6: Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro doente. Rugosidade A-B: rugosidade na linha horizontal (linha A-B); rugosidade C-D: rugosidade na linha vertical (linha C-D).

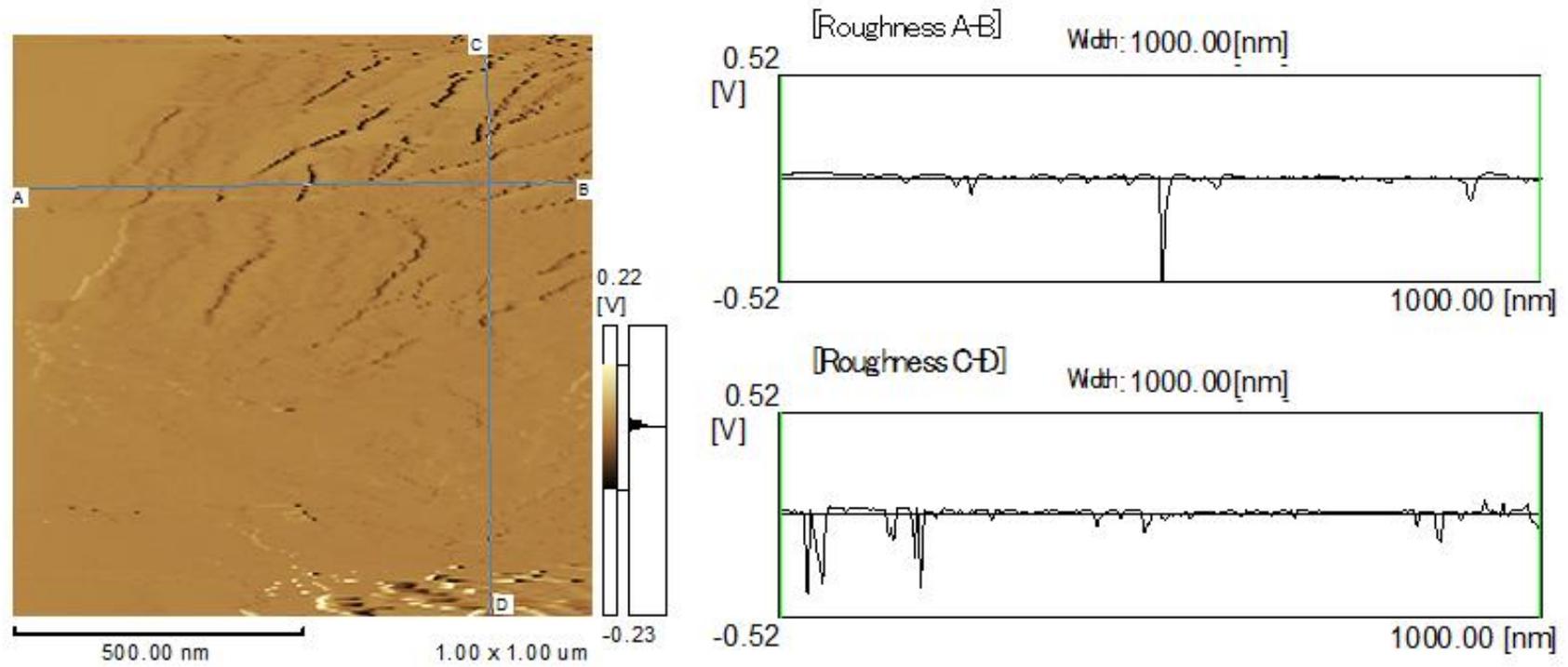


Figura 7: Imagem bidimensional de AFM e rugosidade da parede celular de mamoeiro doente com vales na parede celular. Rugosidade A-B: rugosidade na linha horizontal (linha A-B); rugosidade C-D: rugosidade na linha vertical (linha C-D).

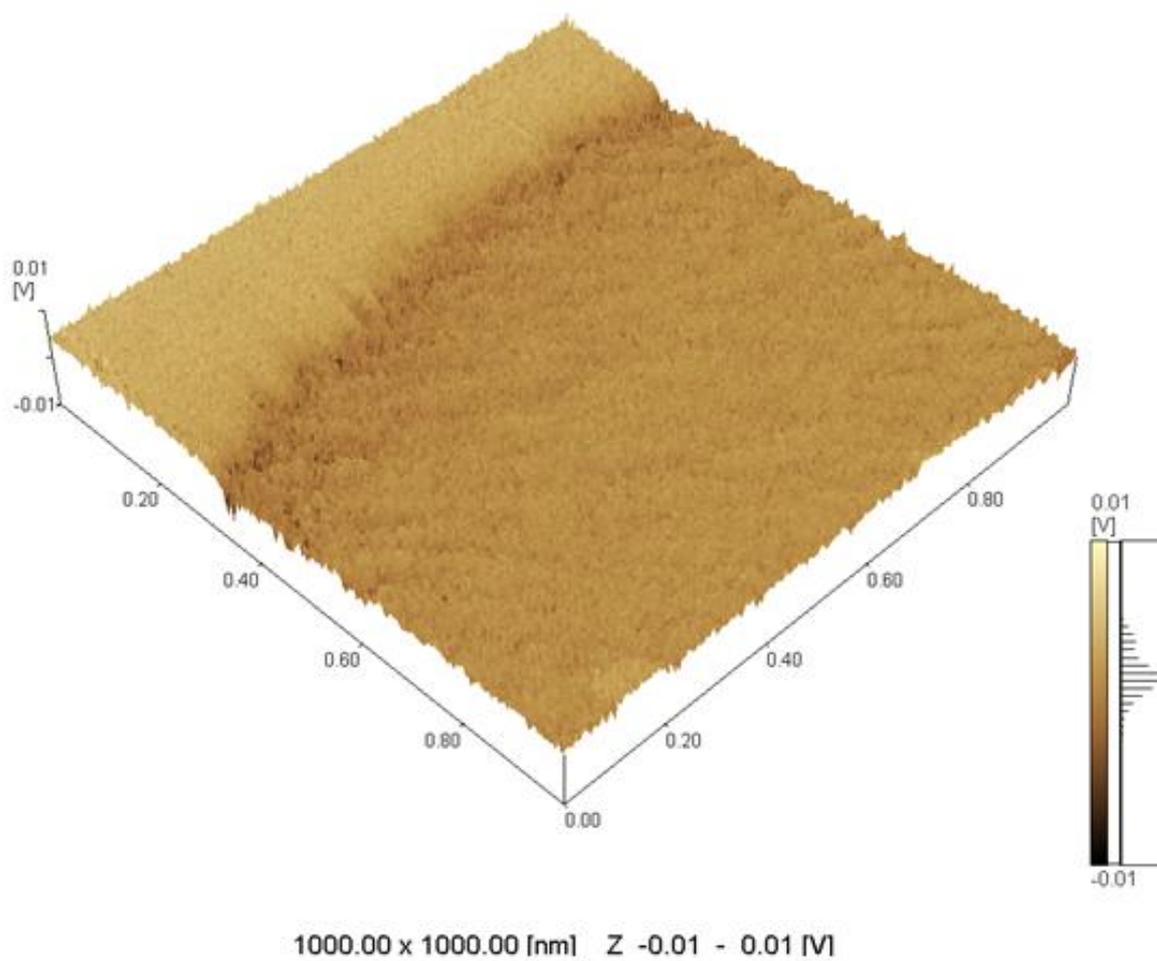


Figura 8: Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro sadio.

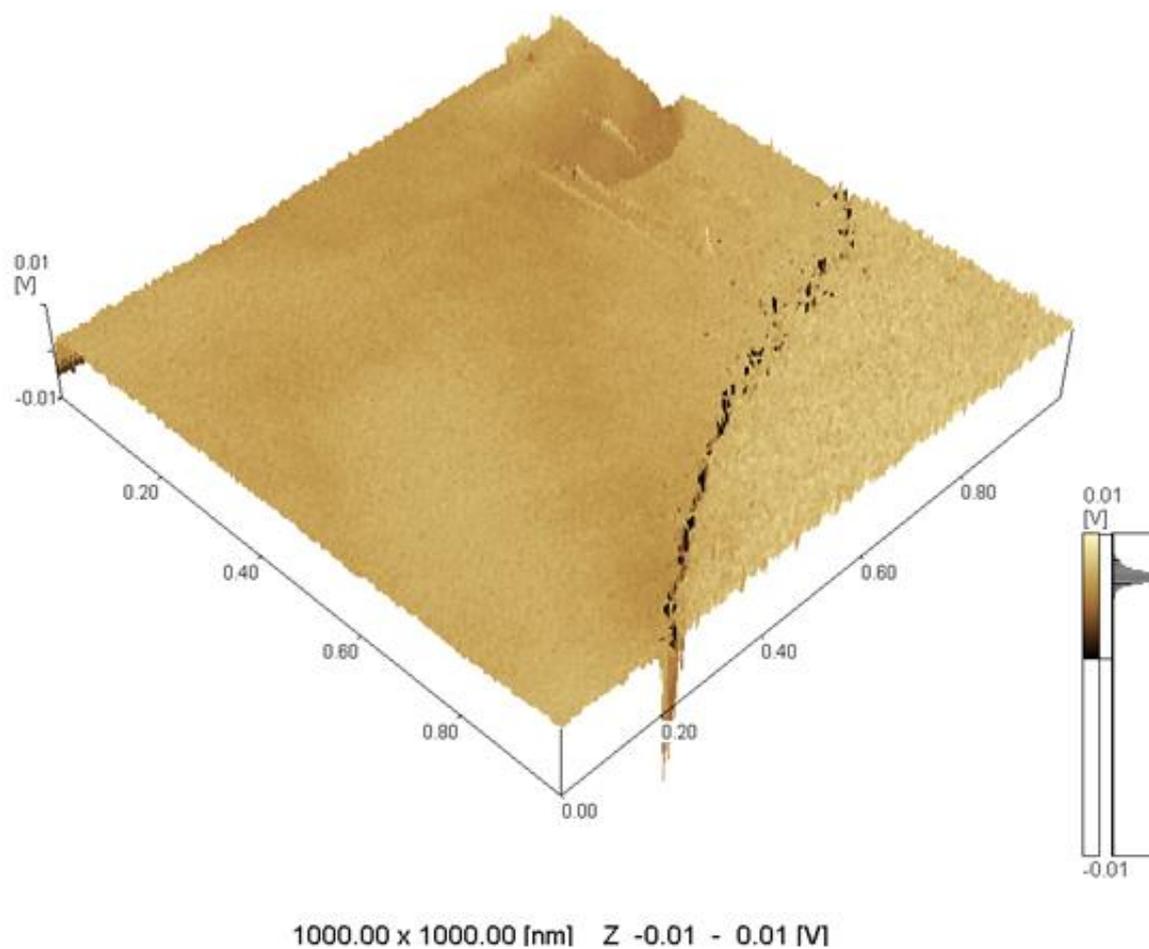


Figura 9: Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro sadio com vales na parede celular.

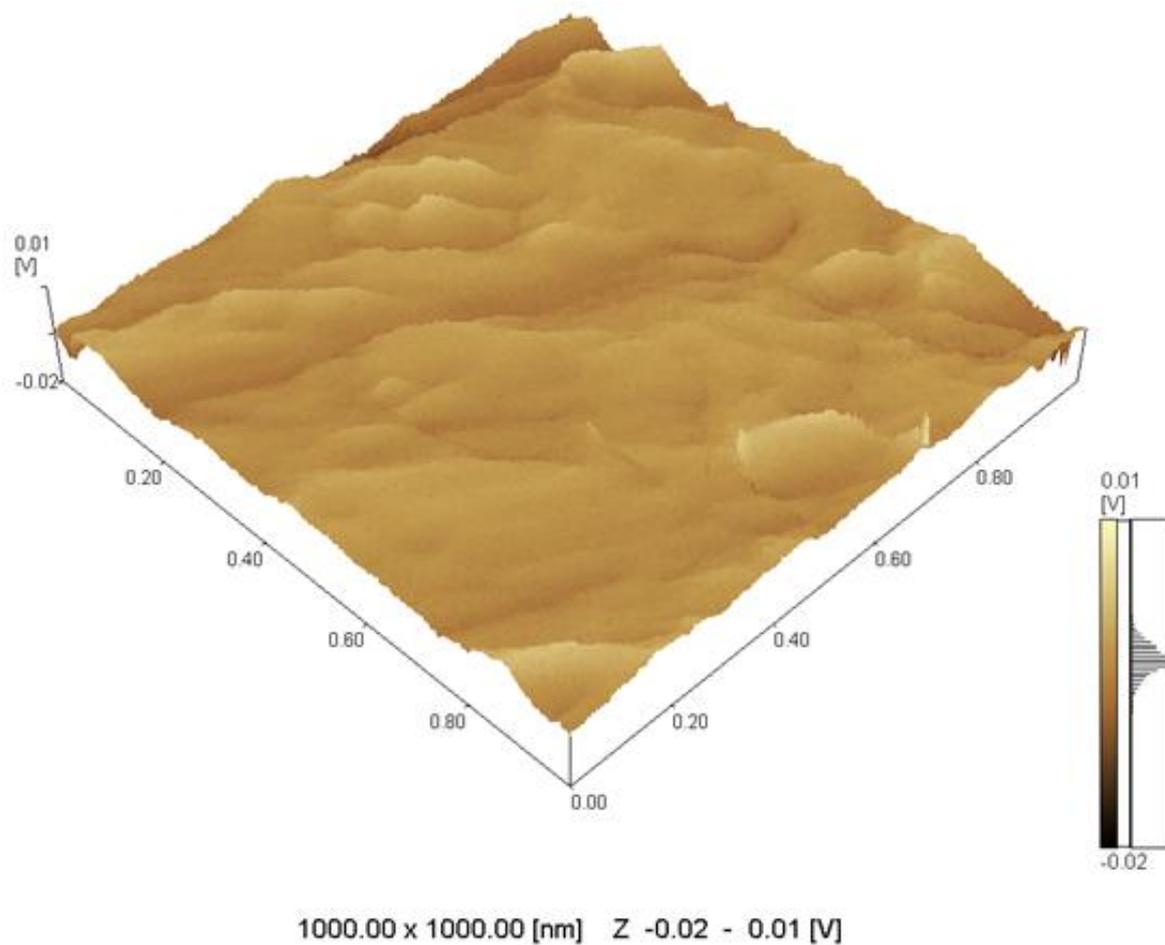


Figura 10: Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro doente.

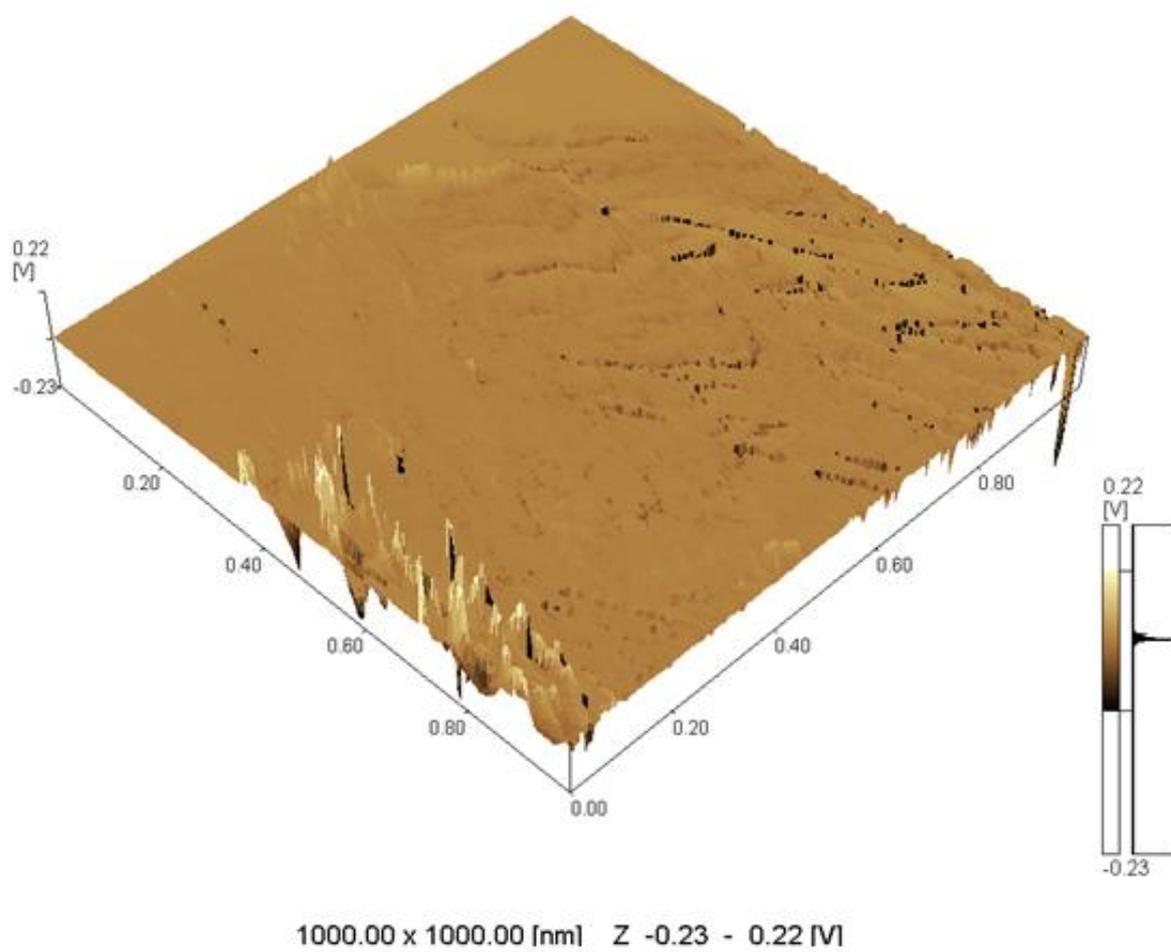


Figura 11: Imagem tridimensional de AFM da parede celular de mamoeiro doente com vales e cumes proeminentes na parede celular.

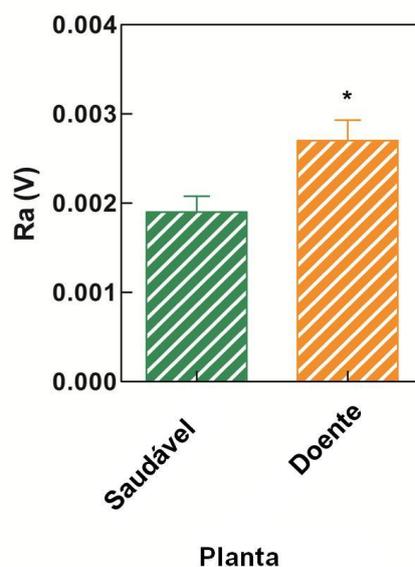


Figura 12: Parâmetro Ra de rugosidade estrutural da parede celular de mamoeiros saudáveis e doentes. Ra – média aritmética da rugosidade do perfil. O símbolo (*) representa significância estatística entre a rugosidade dos grupos avaliados. (teste de Mann–Whitney, $p < 0.05$).

5.2 Propriedades mecânicas da parede celular

Os mapas de força de adesão e os histogramas (Figura 13) fornecem informações sobre as propriedades mecânicas da parede celular de plantas saudáveis e doentes. Os mapas de força de adesão, inserções, são dados em códigos de cores em que o azul representa regiões macias e o vermelho as regiões rígidas. A frequência é fornecida como porcentagem da força de adesão medida na varredura da área de 1000nm^2 à 256 curvas de força.

De acordo com os histogramas de uma curva individual de retração, plantas saudáveis apresentaram características constitutivas da parede celular mais altas, 0,236/1,274 nN (Figura 13A), do que as plantas doentes, 0,007/0,158 nN (Figura 13B), e os valores de força de adesão máxima foi maior em plantas saudáveis do que em plantas doentes (Figura 14).

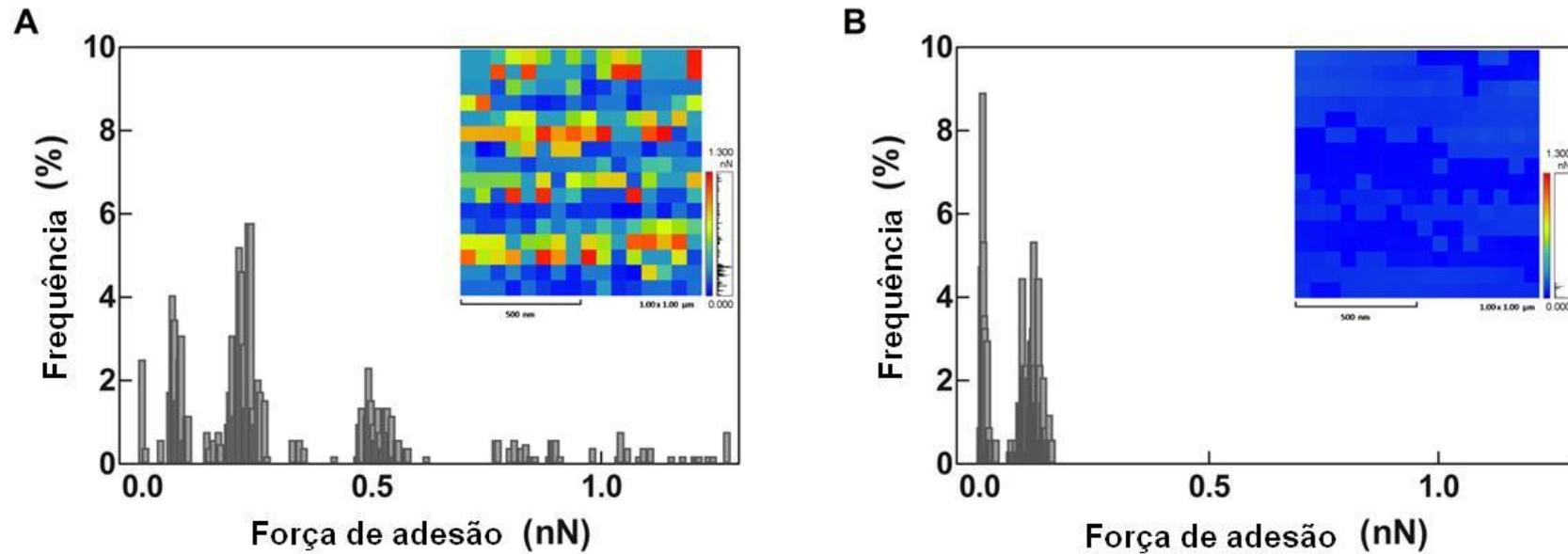


Figura 13: Mapas e histogramas de força de adesão gerados pela interação entre o cantilever e a superfície da parede celular de plantas saudáveis e doentes em AFM. (A) plantas saudáveis e (B) plantas doentes. O eixo vertical apresenta a frequência da força de adesão em escaneamento lateral de 1000 nm à 256 curvas de força e as inserções correspondem aos mapas de força.

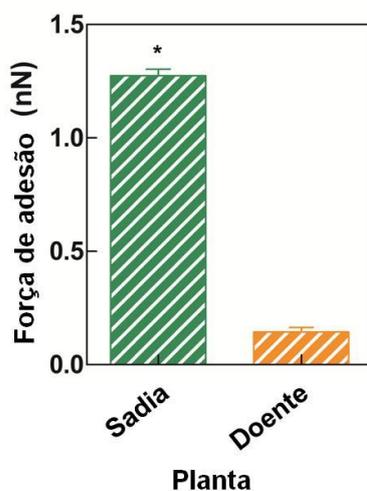


Figura 14: Média da força de adesão da parede celular de mamoeiros saudáveis e doentes. O símbolo (*) indica que há diferença estatística (teste de Mann–Whitney, $p < 0.05$).

As alterações na distribuição da rigidez são evidenciadas nos mapas de força de adesão pelo código de cores (Figura 13 inserções). Áreas macias, codificadas em azul, foram dominantes em plantas doentes (Figura 13B), ao passo que os domínios mais rígidos, codificados em vermelho, foram frequentes em plantas saudáveis (Figura 13A). Tal observação evidencia que a parede celular de plantas saudáveis são mais rígidas que as de plantas doentes.

Outro parâmetro que fornece informações sobre as propriedades mecânicas de materiais em investigação por AFM é o *binder deformation* (BD). Os valores de *binder deformation* são inversamente correlacionados a rigidez do material analisado; superfícies mais macias apresentam valores maiores de *binder deformation*. De acordo com os resultados do presente estudo (Tabela 1), a parede celular de plantas doentes são mais macias (BD= 77,72 nm) do que a parede celular de plantas saudáveis (BD= 76,08 nm). Esses dados corroboram os resultados observados neste estudo no que se refere à resistência da parede celular de plantas saudáveis e doentes.

Tabela 1: *Binder deformation* referente aos mamoeiros sadios e doentes

Planta	Binder deformation (nm)
Saudável	76,087 ± 0,0229 ^b
Doente	77,128 ± 0,0234 ^a

A média referente ao *binder deformation* foi obtida pela fórmula:

Binder deformation = *Z Piezo Position* - *Cantilever Deflection*.

As diferentes letras representam diferença estatística (teste de Mann–Whitney, $p < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

O espessamento da parede celular é um evento importante que confere propriedades específicas, tais como a impermeabilidade e aumento da rigidez, o que consolida esta estrutura como uma barreira rígida que fornecem proteção mecânica à planta (ŁAŻNIEWSKA et al., 2012).

Nós inoculamos um grupo de mamoeiros com látex contaminado com PMeV e utilizamos AFM para comparar a topografia e as propriedades mecânicas da parede celular de plantas doentes e saudáveis.

As propriedades mecânicas do material podem ser obtidas a partir da força versus curvas de deslocamento do cantilever do AFM (GABORIAUD e DUFRÊNE, 2007). Diferenças de pressão entre o interior e o exterior da célula podem levar a oscilações do cantilever acoplado ao AFM (BUTT et al., 2005). No presente estudo, as oscilações do cantilever devido à diferença de pressão foram eliminadas utilizando amostras secas, como descrito por Aquije et al. (2010), e as imagens e dados obtidos de cada amostra foram reproduzíveis com operações repetidas no AFM.

A parede celular das plantas com meleira apresentaram regiões com cumes proeminentes, vales mais profundos e microestrutura áspera, grosseira. Alguns componentes da parede celular atuam como primeiros sinalizadores de uma infecção e são responsáveis por garantir a proteção primária à planta (BESSIRE et al., 2007; REINA-PINTO e YEPHREMOV, 2009). Após esses primeiros sinais, estruturas de resistência podem ser formadas, como observado em nosso estudo, que contém compostos, tais como lignina e peroxidases, que fortalecem a parede celular e isolam e dificultam o acesso do patógeno aos tecidos saudáveis (SCHMELZER, 2002).

A peroxidase e outros compostos oxidativos, como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH^{\bullet} , chamados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), são produzidas em resposta ao estresse (HEGEDÜS et al., 2001). Este mecanismos de resposta a estresse em plantas induz

a formação de lignina (RIZZARDI et al., 2003) e é uma alternativa para fortalecer a estrutura da parede celular (SCHMELZER, 2002).

Rodrigues et al. (2009) identificaram que os laticíferos do mamoeiro são produtores de H_2O_2 e que maiores níveis de produção e acumulação de H_2O_2 são observados apenas nas plantas com meleira. Este mecanismo primário de reforço da parede celular é comum em plantas após uma infecção. De acordo com nossos resultados, mesmo com este mecanismo de reforço da parede celular, após longo período de infecção pelo PMeV, mais de um ano em nosso estudo, o PMeV provavelmente possui um mecanismo específico para enfraquecer a parede celular e estruturas de resistência após o estabelecimento da infecção nos mamoeiros.

Tecidos e órgãos, como folhas, infectadas por microrganismos endofíticos podem sofrer danos quando as condições ambientais e o estado fisiológico do hospedeiro são adversos (AZEVEDO et al., 1998). Foi observado que a atividade viral leva a alterações na microestrutura da parede celular de plantas infectadas, promovendo o aumento da rugosidade da parede celular. Esses resultados corroboram um postulado de Rodrigues et al. (2009), no qual é sugerido que algumas estruturas celulares do mamoeiro, como os laticíferos, sofrem alterações quando infectados pelo vírus da meleira.

A exsudação de látex em condições normais, em plantas sadias, requer que seja realizada uma injúria nos tecidos do mamoeiro e a exsudação espontânea de látex, como observado em plantas com meleira, sugere que os laticíferos estejam danificados, arrebatados (RODRIGUES et al., 1989; VENTURA et al., 2001; VENTURA et al., 2004). Em plantas infectadas por vírusa redução dos diâmetros dos poros dos plasmodesmas limita a mobilidade do vírus (RINNE et al., 2005), mas o PMeV é capaz de contornar este mecanismo de defesa da planta promovendo alterações fisiológicas no laticíferos, de modo a comprometer as síntese das partículas de látex e promover o aumento da captação de água (RODRIGUES et al., 2009), ou seja, o PMeV promove o aumento do Potencial hídrico (Ψ_w) nos laticíferos de plantas doentes, o que torna o látex dessas plantas mais fluido e transparente (VENTURA et al., 2001; VENTURA et al., 2004).

O PMeV é encontrado somente nos laticíferos (NAQVI, 2004) e associado às partículas de látex (RODRIGUES et al., 2009). Rodrigues et al. (2009) propuseram que o inchaço e subsequente ruptura dos laticíferos de mamoeiros doentes estão associados a estratégia de movimentação do vírus. Considerando que a infecção viral tem início quando o vírus entra em contato com a membrana celular (SEISENBERGER et al., 2001), os vales profundos podem constituir regiões de fragilidade e susceptíveis a ruptura da parede celular, gerando microlesões utilizadas pelo vírus no processo infeccioso.

7 CONCLUSÕES

Por meio da microscopia de força atômica, foi observado que o PMeV promove alterações na parede celular de mamoeiros doentes, tornando-as mais frágeis e suscetíveis à quebra. Supomos que essas alterações morfológicas, associadas à exacerbada absorção de água, faz com que a pressão interna dos laticíferos aumente, desencadeie o rompimento dessas células e a consequente exsudação de látex, evento que facilita a disseminação do PMeV para outros laticíferos.

No presente estudo, a técnica utilizada, AFM, mostrou ser eficiente para o diagnóstico de plantas infectadas pelo PMeV, validando-a como uma ferramenta biotecnológica para a detecção da meleira.

Os resultados deste trabalho fornecem novas perspectivas sobre a interação entre mamoeiro-PMeV, auxiliam no diagnóstico de plantas doentes e podem ser úteis para entender e controlar esta doença, bem como, futuramente, serem informações úteis para obtenção de cultivares resistentes à meleira.

8 REFERÊNCIAS

- ABREU, P. et al. Molecular diagnosis of *Papaya meleira virus* (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 180, n. 1, p. 11–17, 2012.
- ABREU, P. M. V et al. *Carica papaya* MicroRNAs Are Responsive to *Papaya meleira virus* Infection. **PLoS one**, v. 9, n. 7, p. e103401, 2014.
- AQUIJE, G. M. DE F. V. et al. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant cell reports**, v. 29, n. 10, p. 1109–1117, 2010.
- AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 117–137, 1998.
- BADILLO, V. M. Caricaceae: segundo esquema. **Rev. Fac. Agron. Univ. Cent. Venezuela, Alcance**, v. 43, 1993.
- BADILLO, V. M. *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. **Ernstia**, v. 10, n. 2, p. 74–79, 2000.
- BENTES, J. L. S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 224–231, 2005.
- BESSIRE, M. et al. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. **The EMBO journal**, v. 26, n. 8, p. 2158–2168, 2007.
- BINNIG, G. Scanning tunneling microscopy. **Helvetica Phys. Acta**, v. 55, p. 726–735, 1982.
- BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical review letters**, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.
- BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in plant science**, v. 5, n. 6, p. 241–246, 2000.
- BUAINAIN, A. M. **Cadeia produtiva de frutas**. [s.l.] Bib. Orton IICA/CATIE, 2007. v. 7
- BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface science reports**, v. 59, n. 1, p. 1–152, 2005.
- CANINI, A. et al. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. **Journal of food composition and analysis**, v. 20, n. 7, p. 584–590, 2007.

COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D. Domestication of plants in Maya lowlands. **Economic botany**, v. 58, n. 1, p. S101–S110, 2004.

CORREA, F. J. F. et al. Estudo preliminar sobre exsudação do látex do mamoeiro-Teixeira de Freitas. **Anais**, v. 2, p. 409–428, 1988.

CRUZII, C. E. C. J. L. Caracterização anatômica de órgãos vegetativos do mamoeiro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 918–921, 2009.

DUNNING, N. et al. Prehispanic agrosystems and adaptive regions in the Maya lowlands. **Culture & Agriculture**, v. 20, n. 2-3, p. 87–101, 1998.

EL MOUSSAOUI, A. et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 4, p. 556–570, 2001.

FAO STAT, F. A. O. **Statistics Division**, 2011.

FAO STAT, F. A. O. **Statistics Division**, 2012.

FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J. M. Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. In: **Genetics and Genomics of Papaya**. [s.l.] Springer, 2014. p. 3–15.

GABORIAUD, F.; DUFRÊNE, Y. F. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 1, p. 10–19, 2007.

GALEMBECK, F. et al. Microscopia de sondas: uma caixa de ferramentas da nanotecnologia. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 37–43, 2013.

GAZETA, A. Anuário Brasileiro de Fruticultura. **Gazeta: Santa Cruz do Sul**, 2010.

HARLAN, J. R. Agricultural origins: centers and noncenters. **Science**, v. 174, n. 4008, p. 468–474, 1971.

HEGEDÜS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, v. 160, n. 6, p. 1085–1093, 2001.

IBGE, R. J. Produção Agrícola Municipal. **Rio de Janeiro: IBGE**, 2009.

IBGE, R. J. Produção Agrícola Municipal. **Rio de Janeiro: IBGE**, 2010.

IBGE, R. J. Produção Agrícola Municipal. **Rio de Janeiro: IBGE**, 2012.

INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. **Incaper em Revista**, v. 1, n. 1, 2010.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. [s.l.] Agronômica Ceres, 1997. v. 2

- KITAJIMA, E.W. et al. Association of isometric virus-like particles, restricted to laticifers, with “*meleira*” (“*sticky disease*”) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**. v. 8, p. 118-122, 1993.
- KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant Journal**, v. 37, n. 3, p. 370–378, 2004.
- ŁAŻNIEWSKA, J.; MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. Plant-fungus interface: the role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 24–30, 2012.
- LEAL-COSTA, M. V. et al. Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Carica papaya* L.(Caricaceae). **Acta Bot Brasil**, v. 24, p. 595–597, 2010.
- LESNIEWSKA, E. et al. Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**, v. 100, n. 3, p. 171–178, 2004.
- LI, H. et al. Histological responses of host and non-host plants to *Hyaloperonospora parasitica*. **European journal of plant pathology**, v. 129, n. 2, p. 221–232, 2011.
- LINNAEUS, C. V. Species plantarum, 2 vols. **Salvius, Stockholm**, 1753.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E. et al. Identification and partial characterization of *Papaya meleira virus*. **Virus: Review & Research**. v. 11, 198 p., 2000.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E. et al. Purification and some properties of *Papaya meleira virus*, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 389–394, 2003.
- MANICA, I. et al. **Mamão: tecnologia de produção, pós-colheita, exportação, mercados**. Cinco Continentes, 2006.
- MANSHARDT, R. M.; ZEE, F. T. P. Papaya germplasm and breeding in Hawaii. **Fruit Varieties Journal**, v. 48, p. 146, 1994.
- MEDINA, J. C. et al. **Mamão, da cultura ao processamento e comercialização**. Série Frutas Tropicais Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 244 p., 1980.
- MILANI, P. et al. *In vivo* analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in Arabidopsis using atomic force microscopy. **The Plant Journal**, v. 67, n. 6, p. 1116–1123, 2011.
- MORTON, J. F. **Fruits of warm climates**. JF Morton, 1987.
- NAKAGAWA, J.; TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. **Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de ocorrência em Teixeira de Freitas, BA**. Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...**1987
- NAKASONE, Y. H. A situação do vírus da mamão no Havaí. **Cultura do Mamoeiro, São Paulo, Livroceres**, p. 199–209, 1980.

NAQVI, S. **Diseases of fruits and vegetables**. [s.l.] Springer, 2004.

NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A. Cenário econômico da produção de alimentos, fibras e bioenergia. **Agronegócios e desenvolvimento sustentável: uma agenda para a liderança mundial na produção de alimentos e bioenergia**. São Paulo: Atlas, p. 11–19, 2007.

OLIVEIRA, A. M. G.; CALDAS, R. C. **Produção do mamoeiro em função de adubação com nitrogênio, fósforo e potássio**. [s.l.] SciELO Brasil, 2004.

OVIEDO, G. F. **Historia general y natural de las Indias**. [s.l.] la Real academia de la Historia, 1851. v. 1

PEREZ-BRITO, D. et al. First report of *Papaya meleira virus* (PMeV) in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13564–13570, 2012.

RADOTIĆ, K. et al. Atomic Force Microscopy Stiffness Tomography on Living *Arabidopsis thaliana* Cells Reveals the Mechanical Properties of Surface and Deep Cell-Wall Layers during Growth. **Biophysical journal**, v. 103, n. 3, p. 386–394, 2012.

REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 540–549, 2009.

RINNE, P. L. H. et al. Tobacco plants respond to the constitutive expression of the tospovirus movement protein NSM with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. **The Plant Journal**, v. 43, n. 5, p. 688–707, 2005.

RIZZARDI, M. A. et al. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 957–965, 2003.

RODRIGUES, C. H.; ALVES, F. DE L.; MARIN, S. L. D. Ocorrência e sintomas da meleira do mamoeiro (*Carica papaya*) no estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 118, 1989.

RODRIGUES, S. P. et al. Effects of the *Papaya meleira virus* on papaya latex structure and composition. **Plant cell reports**, v. 28, n. 5, p. 861–871, 2009.

RODRIGUES, S. P. et al. Proteomic analysis of papaya (*Carica papaya* L.) displaying typical sticky disease symptoms. **Proteomics**, v. 11, n. 13, p. 2592–2602, 2011.

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

SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 411–415, 2002.

SEISENBERGER, G. et al. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1929–1932, 2001.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 657–959, 2010.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in botanical research**, v. 26, p. 135–192, 1997.

SILVA, D. N.; COSTA, A. N. **Novo PEDEAG 2007-2025, Estudo Setorial: Fruticultura**. SEAG: Vitória, 2007

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

TAPIA-TUSSELL, R. et al. Seed transmission of *Papaya meleira virus* in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. **Plant Pathology**, 2014.

TERÁN, S.; RASMUSSEN, C. H. Genetic diversity and agricultural strategy in 16th century and present-day Yucatecan milpa agriculture. **Biodiversity & Conservation**, v. 4, n. 4, p. 363–381, 1995.

VAVILOV, N. I. **Origin and geography of cultivated plants**. [s.l.] Cambridge University Press, 1992.

VENTURA, J. A. et al. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomas e epidemiologia. **Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno**. INCAPER, Vitória, p. 267–276, 2003.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Papaya diseases and integrated control. In: **Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II**. Springer, 2004. p. 201–268.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. DA S. Sintomatologia da meleira do mamoeiro e sua importância para o “*roguing*” **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 536, 2001.

WILSON, R. A.; BULLEN, H. A. Introduction to scanning probe microscopy (spm) basic theory atomic force microscopy (afm). **Creative Commons Attribution-Noncommercial-Share Alike**, v. 2, [s.d.].

WIT, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 21, p. 2726–2732, 2007.

XAVIER FILHO, J. **Sementes e suas defesas contra insetos**. UFCe, 1992.

ZUNJAR, V. et al. Pharmacognostic, Physicochemical and Phytochemical Studies on *Carica papaya* Linn. Leaves. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 20, p. 5–8, 2011.

9 MANUSCRITO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

O manuscrito intitulado “*Atomic force microscopy investigation of cell wall alterations in Papaya meleira virus infected Carica papaya L.*” foi submetido à publicação no periódico *Journal of Integrative Plant Biology*. Atualmente o manuscrito está sendo reorganizado, de modo a atender e responder as críticas realizadas pelos revisores do periódico e então ser ressubmetido à publicação.

Research Article**Atomic force microscopy investigation of cell wall alterations in
Papaya meleira virus infected *Carica papaya* L.**

Running title: Cell wall changes in sticky diseased papaya

**Jean Carlos Vencionck Dutra¹, Tarcio Carneiro¹, Anuar Magaña-Álvarez^{1,2},
Daisy Pérez-Brito², Raúl Tapia-Tussell², José Aires Ventura^{1,3}, Patricia Machado
Bueno Fernandes^{1*}, Antonio Alberto Ribeiro Fernandes¹**

¹Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil, ²Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Merida, A.C, Mexico, ³Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

*Correspondence author: Av. Marechal Campos, 1468 Vitória, ES, Brasil, 29040-090
Tel: (+55-27) 3335-7348 / 3335-7275 patricia.fernandes@ufes.br

Abstract

Papaya sticky disease, caused by *Papaya meleira virus* (PMeV), is an important papaya disease in Brasil and Mexico due the severe economic losses it causes. Studies to assess the pathogen-host interaction at a histological are fundamental in order to understand the mechanisms that underlie natural resistance. In this study we collected leaves of healthy and symptomatic papaya sticky diseased plants and observed the topography and mechanical properties of plant cell walls by atomic force microscopy (AFM). Two-dimensional images obtained from different areas of the cell wall showed that the cell walls of healthy plants are smoother than the walls of sticky diseased plants. Also healthy plants displayed higher constitutive characteristics of the cell wall than diseased plants and the average maximum adhesion force was higher on healthy plants than on diseased plants. PMeV promotes changes on cell walls, making them more fragile and susceptible to breakage. These changes, associated with increased water uptake and water moves in response to physical forces, toward regions of low water potential (Ψ_w) or low free energy causes cell disruption that leads to spontaneous exudation of latex and facilitates the spread of PMeV to other laticifers. The results of this work provide new insights on the interaction papaya-PMeV which could prove helpful when trying to understand and control the papaya sticky disease.

Keywords: Papaya sticky disease, *Papaya meleira virus*, cell disruption, lactifers, pathogen-host interaction

INTRODUCTION

Papaya (*Carica papaya* L.) production in Brazil generates annual sales of about US\$600 million (IBGE 2010) and, with a cultivated area of 34,213 ha and an output of 1.87 million tons per year, the country is the second largest producer of papaya in the world (FAO 2012). Diseases are a growing problem and a serious phytosanitary issue in papaya cultivation and commercialization. Papaya sticky disease, or meleira, caused by the *Papaya meleira virus* (PMeV), limits fruit exports and is responsible for severe economic losses (Abreu et al. 2012).

Healthy papaya tissues contain specialized cells known as lactifers which exude latex upon injury and are rich in proteases and alkaloids (El Moussaoui et al. 2001). When sticky diseased, papaya plants show spontaneously exudation of fluid and translucent latex from leaves and fruits (Rodrigues et al. 1989; Ventura et al. 2001; Ventura et al. 2004). The latex oxidises after atmospheric exposure, resulting in small necrotic lesions on the edges of young leaves and a sticky substance on the fruits that makes them commercially unacceptable for consumption (Maciel-Zambolim et al. 2003; Naqvi 2004; Ventura et al. 2004).

Plants are exposed to pathogens under natural conditions and, for this reason, they possess different mechanisms to recognize and defend themselves against them (Li et al. 2011). Studies to assess the pathogen-host interaction at a histological level lead to a better understanding of the mechanisms that underlie natural resistance (Bentes and Matsuoka 2005). Light microscopy studies have been conducted to investigate changes in papaya tissues in resistant transgenic (Leal-Costa et al. 2010) and in sticky diseased (Rodrigues et al. 2009) specimens. More recently, atomic force microscopy (AFM) has been used to study cell wall morphology (Milani et al. 2011; Radotić et al. 2012) and to investigate the structural and mechanical properties of the cell wall of plants exposed to microorganisms (Lesniewska et al. 2004; Aquije et al. 2010).

Since the leaf is the organ where the necrotic lesions appear as the first symptom of sticky disease (Maciel-Zambolim et al. 2003; Ventura et al. 2004), in the present study we collected leaves of healthy and symptomatic papaya sticky diseased plants and observed the topography and mechanical properties of plant cell walls by AFM.

RESULTS

Topographical analysis of the cell walls

Two-dimensional images obtained from different areas of the cell wall showed that the cell walls of healthy plants are smoother (Figure 1A) than the walls of sticky diseased plants (Figure 1C). Both healthy and diseased plants had valleys in the cell walls (Figure 1B, D), but they were much deeper in diseased plants (Figure 1D) than in healthy plants (Figure 1B).

The three-dimensional images showed a smooth microstructure (Figure 2A), with shallow valleys (Figure 2B), in healthy plants and a rough microstructure (Figure 2C), with prominent ridges and deep valleys (Figure 2D), in diseased plants.

The arithmetic average value of profile (Ra) (Figure 3) was higher for diseased plants (0,0026V) than for healthy plants (0,0019V) and shows that there is a significant difference between the roughness of the cell walls of healthy and diseased plants.

Mechanical properties of the cell wall

AFM adhesion force maps and histograms (Figure 4) provide information about the mechanical properties of the cells walls of healthy and diseased plants. The adhesion force maps are given in false colors (insets: blue, soft; red, stiff). The frequency is given as a percentage of the measured adhesion force in a 1,000 nm lateral scan of 256 force curves.

According to the histograms from an individual retraction curve, healthy plants displayed higher constitutive characteristics of the cell wall, 0.236/1.274 nN (Figure 4A) than diseased plants, 0.007/0.158 nN (Figure 4B), and the average maximum adhesion force was higher on healthy plants than on diseased plants (Figure 5).

Changes in the stiffness distribution are apparent in the color-coded adhesion force maps (Figure 4 insets). Soft areas, coded in blue, were dominant in diseased plants (Figure 4B), whereas stiff domains, coded in red, are numerous in healthy plants. This is taken as evidence that the cell walls of healthy plants are more rigid than the cell walls of diseased plants.

Another parameter of the mechanical properties of materials that can be investigated using AFM is binder deformation (BD). Binder deformation is inversely correlated with the stiffness of a surface; soft surfaces usually exhibit large binder

deformations. According to the results of the present study (Table 1), the cell walls of diseased plants are softer (BD = 77.72 nm) than the cell walls of healthy plants (BD = 76.08 nm) and these results reinforce the other findings about the cell wall stiffness of healthy and diseased plants.

DISCUSSION

Cell wall thickening is one important event that imparts some special properties to the cell wall, such as impermeability and increased stiffness, consolidating this structure as a rigid barrier that provides mechanical defense to the plant (Łażniewska et al. 2012).

We inoculated a group of papaya plants with PMeV contaminated latex and used AFM to compare the topographical and mechanical properties of the plant cell walls of diseased and healthy plants.

The mechanical properties of the material can be derived from the force versus displacement curves of the AFM probe (Gaboriaud and Dufrêne 2007). Physical structures or pressure differences between the cell interior and exterior may originate AFM tip indentations (Butt et al. 2005). In the present study, tip indentations due to pressure differences were eliminated using dried samples, as described by Aquije et al. (2010), and the images and force data obtained of each sample in air were reproducible with repeated AFM operations.

The cell walls of sticky diseased plants showed regions with prominent ridges, deep valleys and a rough microstructure. Some components of the cell wall act as first signals of infection that provide some protection against pathogens (Bessire et al. 2007; Reina-Pinto and Yephremov 2009). After these first signals, resistant structures may be formed, as observed in our study, containing compounds, such as lignin and peroxidases, that strengthen the cell wall and isolate the pathogen from healthy host tissue (Schmelzer 2002).

Peroxidases and other oxidative compounds, such as $O^{2\bullet-}$, H_2O_2 and $OH\bullet$, called Reactive Oxygen Species (ROS), are produced in response of stress (Hegedüs et al. 2001). This response mechanism on plants induces the formation of lignin (Rizzardì et al. 2003) and is an alternative to fortify the cell wall structure (Schmelzer 2002).

Rodrigues et al. (2009) identified papaya laticifers as H_2O_2 producers. However, increased level of H_2O_2 production and accumulation was higher on sticky diseased plants than on healthy ones. This primary mechanism of strengthening of the cell wall is common to plants after pathogen infection. However, following our results, this mechanism did not seem effective in plants that carried PMeV for a long period, more than one year in our case, suggesting that PMeV probably has a specific mechanism to weaken the cell wall after establishment of the infection.

Tissues and organs, such as leaves, infected by endophytic microorganisms can suffer damage when the environmental conditions and the physiological state of the host are adverse (Azevedo et al. 1998). We observed that virus activity leads to changes in the microstructure of the cell wall of infected plants, promoting increased roughness of the cell wall. This result corroborates a postulate of Rodrigues et al. (2009), which suggests that some classes of papaya cells, such as the laticifers, behave differently when infected by the sticky disease virus.

Since the exudation of papaya latex under normal conditions requires tissue tapping, spontaneous latex exudation from sticky diseased papaya suggests that the plant laticifers could be bursting (Rodrigues et al. 1989; Ventura et al. 2001; Ventura et al. 2004). The plant reduces the pore diameter of the plasmodesmata in order to limit the mobility of the virus (Rinne et al. 2005), but PMeV counteracts by interfering in the physiology of the laticifers in order to compromise the assembly of latex particles, increasing the water uptake (Rodrigues et al. 2009), toward regions of low water potential (Ψ_w) or low free energy causes cell disruption that leads to spontaneous exudation of latex on sticky diseased papaya, that shows latex more fluid and translucent than its healthy counterpart (Ventura et al. 2001; Ventura et al. 2004).

PMeV is found only in laticifers (Naqvi 2004), in close association with latex particles (Rodrigues et al. 2009). Rodrigues et al. (2009) proposed that swelling and subsequent rupture of laticifers in sticky diseased papaya could be related to the strategy of the virus. Since viral infection starts with contact between the virus and the cell membrane (Seisenberger et al. 2001), the deep valleys may constitute weakness points and susceptible breakage areas, generating microlesions used by the virus in the infectious process.

We observed that PMeV promotes changes on cell walls, making them more fragile and susceptible to breakage. We suppose that these morphological changes,

associated with increased water uptake, increase the internal pressure of laticifers promotes cell disruption that leads to spontaneous exudation of latex and facilitates the spread of PMeV to other laticifers.

The results of this work provide new insights on the interaction between papaya and the PMeV which could prove helpful when trying to understand and control the papaya sticky disease.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Papaya plants (cv. Golden) were grown at the Experimental Farm of the Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Espírito Santo State, Brazil. 3–4 months after germination, a group of papaya plants was inoculated with diseased latex (Rodrigues et al. 2009) and another group did not receive the inoculation solution. After 22-23 months under ambient conditions, 4 symptomatic and 2 asymptomatic papaya plants were chosen based on visual diagnosis of papaya sticky disease. Molecular diagnosis of PMeV-dsRNA was performed as described by (Abreu et al. 2014) and confirmed that the asymptomatic plants were healthy and the symptomatic plants were infected with PMeV virus.

Sample preparation

Leaves with same size and age were collected from healthy and diseased plants and transverse midrib sections were excised using a sterile razor blade. The sections were fixed with cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.2 for 30 min, washed, dehydrated in a graded series of 30, 50, 70, 90 and 100% (v/v) ethanol and critical point dried (CO₂) for analysis in a Atomic Force Microscope Shimadzu SPM-9600 at room temperature (17 °C) and 50–55% relative humidity.

Image acquisition

The samples were coded and the analyses were performed on transverse midrib sections in blind tests. Five coded samples of each plant were attached to a glass slide, using a small piece of double-faced adhesive tape, and five random points were chosen to be examined; 25 images/points were assayed in each plant. The images measurements were taken in the constant force contact mode, using Si₃N₄

cantilever tips model OMCL-TR (Olympus, Tokyo, Japan) with a nominal spring constant of 0.57 N/m and a resonance frequency of ≈ 73 kHz. AFM images were acquired as 512x512 pixels with a scan rate of 1 Hz and a scan size of 1,000 nm.

Force–distance and binder deformation

One healthy and one papaya sticky diseased plant were randomly chosen, five transverse midrib sections of each plant were attached to a glass slide using a small piece of double-faced adhesive tape, and five random points were chosen to be examined; force maps/points were assayed for each plant. The force–distance and binder deformation measurements were recorded taken in the constant force contact mode using Si_3N_4 cantilevers tips model OMCL-TR (Olympus, Tokyo, Japan) with a nominal spring constant of 0.57 N/m and a resonance frequency of ≈ 73 kHz. Each force map consisted of 16 x 16 force curves over a lateral scan size of 1,000 nm. From the interaction between the AFM tip and the sample surface, adhesion maps were generated using the force curve data. The force maps were analyzed using the force mapping software for the SPM-9600 series (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and the amount of binder deformation was obtained from the difference between the amount of indentation (Z Piezo Position) and the amount of deflection of the probe, according to the following formula established by Shimadzu Corporation:
Binder Deformation = Z Piezo Position - Cantilever Deflection

Statistical analysis

The statistical analysis to compare the differences between healthy and diseased plants was performed using the Mann–Whitney test ($p < 0.05$).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Professor R. S. de Biasi (Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Brazil) for proofreading and discussion on the manuscript. This work was supported by grants from FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo).

REFERENCES

- Abreu P, Piccin JG, Rodrigues SP, Buss DS, Ventura JA, Fernandes P (2012) Molecular diagnosis of *Papaya meleira virus* (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **J Virol Methods** 180: 11-17
- Abreu PMV, Gaspar CG, Buss DS, Ventura JA, Ferreira PCG, Fernandes PMB (2014) *Carica papaya* MicroRNAs Are Responsive to *Papaya meleira virus* Infection. **PLoS one** 9: e103401
- Aquije GMFV, Zorzal PB, Buss DS, Ventura JA, Fernandes PMB, Fernandes AAR (2010) Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant Cell Rep** 29: 1109-1117
- Azevedo JL, Melo IS, Azevedo JL (1998) Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**: 117-137
- Bentes JLS, Matsuoka K (2005) Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira** 30: 224-231
- Bessire M, Chassot C, Jacquat AC, Humphry M, Borel S, Petétot JMC, Métraux JP, Nawrath C (2007) A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. **The EMBO J** 26: 2158-2168
- Butt H-J, Cappella B, Kappl M (2005) Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surf Sci Rep** 59: 1-152
- El Moussaoui A, Nijs M, Paul C, Wintjens R, Vincentelli J, Azarkan M, Looze Y (2001) Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cell Mol Life Sci** 58: 556-570
- FAOSTAT FAO Statistics Division 2012.
- Gaboriaud F, Dufrêne YF (2007) Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. **Colloid Surface B** 54: 10-19
- Hegedüs A, Erdei S, Horváth G (2001) Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Sci** 160: 1085-1093
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010.

- Łaźniewska J, Macioszek VK, Kononowicz AK (2012) Plant-fungus interface: the role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. **Physiol Mol Plant P** 78: 24-30
- Leal-Costa MV, Munhoz M, Meissner Filho PE, Reinert F, Tavares ES (2010) Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Carica papaya* L.(Caricaceae). **Acta Bot Brasil** 24: 595-597
- Lesniewska E, Adrian M, Klinguer A, Pugin A (2004) Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy. **Ultramicroscopy** 100: 171-178
- Li H, Ge X, Han S, Sivasithamparam K, Barbetti MJ (2011) Histological responses of host and non-host plants to *Hyaloperonospora parasitica*. **Eur J Plant Pathol** 129: 221-232
- Maciel-Zambolim E, Kunieda-Alonso S, Matsuoka K, De Carvalho MG, Zerbini FM (2003) Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathol** 52: 389-394
- Milani P, Gholamirad M, Traas J, Arnéodo A, Boudaoud A, Argoul F, Hamant O (2011) *In vivo* analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in *Arabidopsis* using atomic force microscopy. **Plant J** 67: 1116-1123
- Naqvi (2004) Diseases of fruits and vegetables.
- Radotić K, Roduit C, Simonović J, Hornitschek P, Fankhauser C, Mutavdžić D, Steinbach G, Dietler G, Kasas S (2012) Atomic Force Microscopy Stiffness Tomography on Living *Arabidopsis thaliana* Cells Reveals the Mechanical Properties of Surface and Deep Cell-Wall Layers during Growth. **Biophys J** 103: 386-394
- Reina-Pinto JJ, Yephremov A (2009) Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiol Bioch** 47: 540-549
- Rinne PLH, Boogaard Rvd, Mensink MGJ, Kopperud C, Kormelink R, Goldbach R, Schoot Cvd (2005) Tobacco plants respond to the constitutive expression of the tospovirus movement protein NSM with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. **Plant J** 43: 688-707
- Rizzardi MA, Fleck NG, Agostinetto D, Balbinot Júnior AA (2003) Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural** 33: 957-965

- Rodrigues CH, ALVES FL, Marin SLD (1989) Ocorrência e sintomas da meleira do mamoeiro (Carica papaya) no estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira** 14: 118
- Rodrigues SP, Da Cunha M, Ventura JA, Fernandes PMB (2009) Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Rep** 28: 861-871
- Schmelzer E (2002) Cell polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends Plant Sci** 7: 411-415
- Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Büning H, Hallek M, Bräuchle C (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. **Science** 294: 1929-1932
- Ventura JA, Costa H, da Silva Tatagiba J (2004) Papaya diseases and integrated control. *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*. Springer, pp. 201-268
- Ventura JA, Costa H, Tatagiba JdS (2001) Sintomatologia da meleira do mamoeiro e sua importância para o “roguing”. **Fitopatologia Brasileira** 26: 536

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative two-dimensional AFM images and roughness of the cell walls of healthy and sticky diseased papaya plants

Two-dimensional images obtained from different areas of the cell wall of healthy and sticky diseased papaya plants. (A), (B) healthy and (C), (D) diseased plants. Roughness A-B: roughness on the horizontal line (line A-B); roughness C-D: roughness on the vertical line (line C-D).

Figure 2. Representative three-dimensional AFM images of the cell wall of healthy and sticky diseased papaya

Three-dimensional images obtained from different areas of the cell wall of healthy and sticky diseased papaya plants. (A), (B) healthy and (C), (D) diseased plants.

Figure 3. Structural roughness parameter Ra of the cell walls of healthy and sticky diseased papaya plants

Arithmetic average value of roughness profile in cell walls of healthy and sticky diseased papaya plants. (Ra) arithmetic average value of profile. Where the symbol (*) means statistical significance difference between roughness. (Mann–Whitney test, $p < 0.05$).

Figure 4. Atomic force microscopy maps and histograms of the adhesion force between the tip and the sample surface

The vertical axis shows the frequency of the adhesion force in a 1,000 nm lateral scan of 256 force curves and the insets are the corresponding force maps. (A) healthy and (B) diseased plants.

Figure 5. Average adhesion force of the cell wall in healthy and sticky diseased papaya plants

Average adhesion force data obtained from healthy and sticky diseased papaya plants. The symbol (*) means that the difference is statistically significant (Mann–Whitney test, $p < 0.05$).

Table 1. Binder deformation of healthy and sticky diseased papaya plants

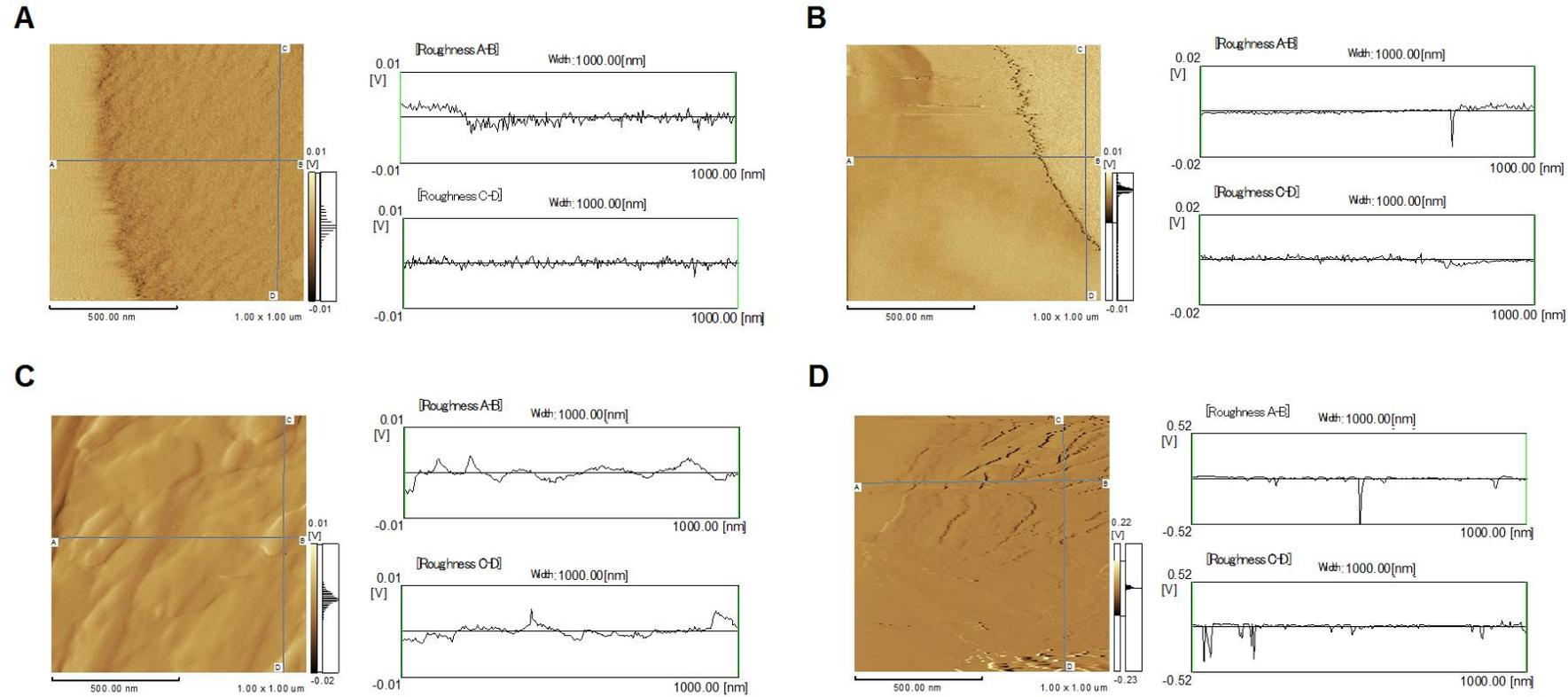
Plant	Binder deformation (nm)
Healthy	76.087 ± 0.229 ^b
Diseased	77.728 ± 0.234 ^a

Average binder deformation was obtained by the formula:

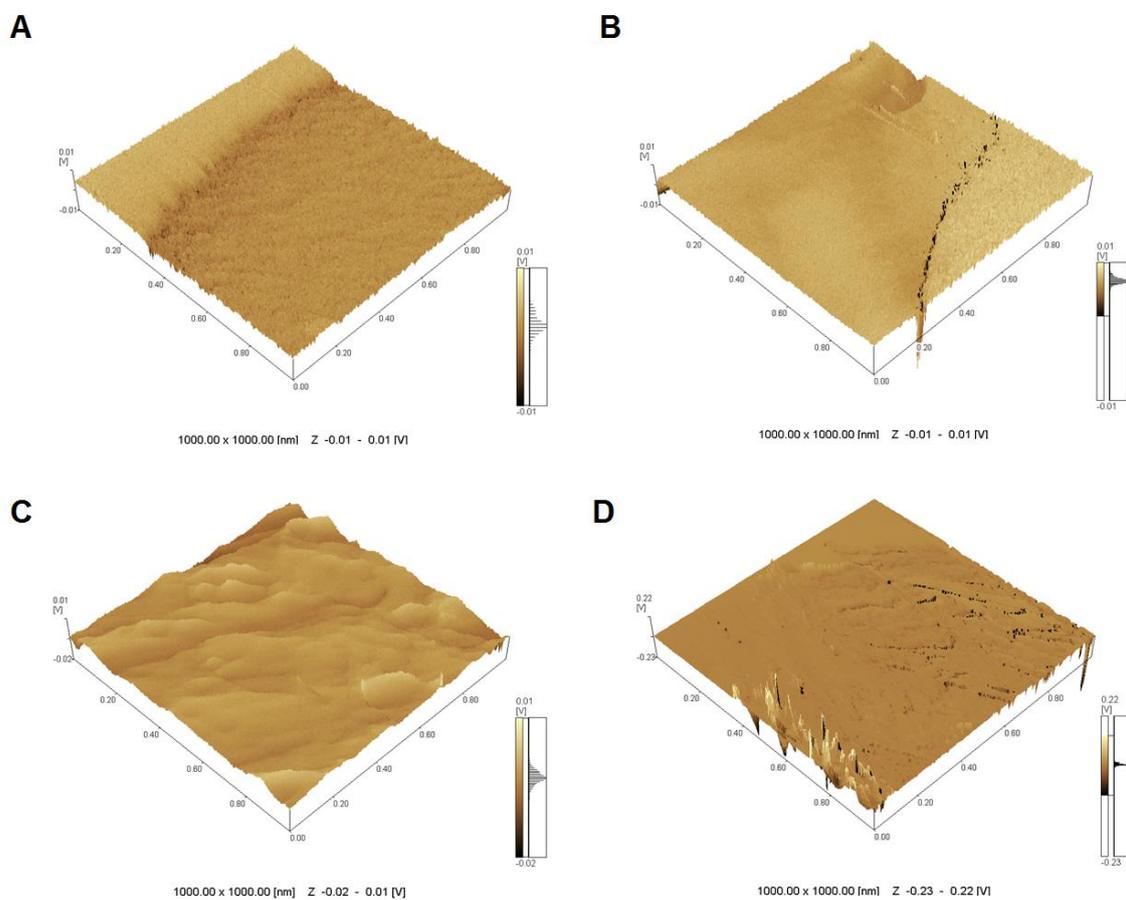
Binder deformation = Z Piezo Position - Cantilever Deflection.

Different letters represent statistical difference (Mann–Whitney test, $p < 0.05$).

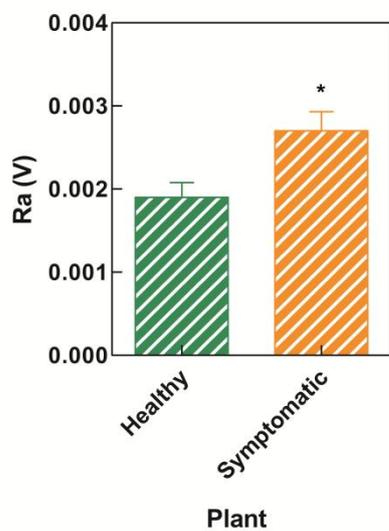
Vencioneck-Dutra et al., Figure 1



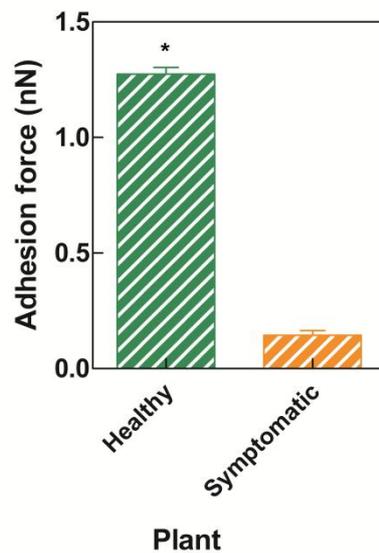
Vencioneck-Dutra et al., Figure 2



Vencioneck-Dutra et al., Figure 3



Vencioneck-Dutra et al., Figure 5



Vencioneck-Dutra et al., Figure 4

