

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA / FITOTECNIA**

**JOSÉ GLAUBER MOREIRA MELO**

**ANÁLISE MOLECULAR E PROTEÔMICA DE LASIODIPLODIA SPP.**  
**ASSOCIADO A FRUTEIRAS TROPICAIS**

**FORTALEZA-CEARÁ**  
**ABRIL / 2014**

**JOSÉ GLAUBER MOREIRA MELO**

**ANÁLISE MOLECULAR E PROTEÔMICA DE LASIODIPLODIA SPP.  
ASSOCIADO A FRUTEIRAS TROPICAIS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Agronomia/Fitotecnia.

Área de concentração: Fitopatologia

Orientador: Prof. Dr. José Emilson Cardoso

**FORTALEZA-CEARÁ**

**ABRIL / 2014**



Esta tese de doutorado foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.

---

José Glauber Moreira Melo

Tese aprovada em: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

#### BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Emilson Cardoso (Orientador)  
Pesquisador Embrapa Agroindústria Tropical

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Carmem Dolores Gonzaga Santos  
Professora da Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dra. Darcy Mayra Furtado Gondim  
Professora da Universidade de Fortaleza

---

Dr. Marlon Vagner Valentim Martins  
Pesquisador Embrapa Agroindústria Tropical

---

Dra. Rosilene Oliveira Mesquita  
Professor da Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais, José Pereira e Edinar.

Aos meus irmãos, Cláudio e Clauber.

À minha irmã, Marie (*In memorian*).

À minha amada esposa, Georgia

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter sempre sido generoso e bondoso comigo. Por me conceder a honra de ter uma família maravilhosa, que acima de tudo é muito unida e amada.

Aos meus pais, pela dedicação, amor, e ensinamentos, devo a vocês tudo que conquistei até hoje, muito obrigado.

Aos meus irmãos, Cláudio e Clauber, pelo amor, dedicação e apoio dado a mim.

A Dulcineide, minha segunda mãe, agradeço por ter surgido em nossas vidas.

Em especial, à minha amanha Georgia, por me apresentar ao verdadeiro amor. Por todo o companheirismo, carinho e apoio durante todos os dias.

Ao meu orientador, meu mestre, José Emilson Cardoso, pelos seus ensinamentos, conselhos, orientação e por toda a confiança depositada em mim.

À professora Carmem Dolores, pela amizade, confiança e os conselhos que me fizeram ampliar meu conhecimento.

Ao Dr. Marlon Vagner, pelos conselhos e ensinamentos passados no dia a dia e pela pronta aceitação em participar deste trabalho.

À Dra. Darcy Mayra, pelo grande apoio e esforços lançados para a realização deste trabalho.

À Dra. Rosilene Mesquita pelo apoio e pronta aceitação em participar na avaliação desse trabalho.

Ao Dr. Marto Viana e Dr. Freire pelos grandes ensinamentos passados durante todo esse período de convivência.

Ao Prof. Renato Inneco pelos grandes conselhos e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Tadeu, por ser um exemplo de dedicação e amor ao seu trabalho e pela ótima recepção dada a mim para a realização desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de Fitopatologia, Aldiel, Edson, Fábio Costa, Fábio Vasconcelos, Francisco, Gigi, Henrique, Ingrid, Joilson, Lais, Larissa, Renato, Sérgio, Samara, Suane, Thiago e todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho, e principalmente, pela amizade e os momentos de alegria.

A todos os colegas do laboratório de Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa-UFC, Iara, Hudson, Ana Luiza, Ana Lídia, Rodolpho, Handerson, Freddy, Juliana, sobretudo à Aline, que se mostrou uma grande amiga e uma profissional de extrema capacidade ao me auxiliar na realização dos estudos proteômicos.

Ao Laboratório de Análises Proteômicas, da Universidade de Fortaleza, coordenado pela professora Dra. Ana Cristina Moreira. Em especial ao Pepeu apoio na realização das análises de espectrometria de massas.

Ao grupo do mestrado, Afrânio, Aline, Ana Lúcia, Hayna, Nathália, Ravena, pelo companheirismo e pelos muitos momentos de estudos e diversão.

Ao Deocleciano, secretário do curso de pós-graduação, pelas informações e ajuda prestada durante todo o meu curso.

À UFC pela oportunidade concedida.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pela utilização dos equipamentos, dependências e pela oportunidade concedidas.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

“Toda vez que falta luz,  
Toda vez que algo nos falta  
O invisível nos salta aos  
olhos”.

Humberto Gessinger

## RESUMO

*Lasiodiplodia theobromae* é um fungo fitopatogénico responsável por inúmeras doenças em variadas plantas é um fungo tipicamente de regiões tropicais e subtropicais. A resinose, causada por este fungo ataca diversas árvores tropicais, dentre as quais, o mamoeiro, mangueira, *Spondias* sp., coqueiro, cajueiro, entre tantas outras. No cajueiro é considerada a principal doença nas condições semiáridas. O seu controle é basicamente genético, realizado com o plantio de variedades resistentes. Para a realização do melhoramento, torna-se imprescindível o conhecimento das características do patógeno. O conhecimento disponível da variabilidade genética de *L. theobromae* é restrito, requerendo esforços para ampliá-lo, de forma que se possa usar deste conhecimento para o uso no melhoramento genético visando a resistência a este patógeno. Levando-se em conta ainda que um gene pode codificar mais de uma proteína, ou ainda proteínas diferentes funcionarem de forma semelhante, amplia-se ainda mais a perspectiva de estudo da resistência de plantas à infecção, por meio da identificação de marcadores proteicos, visto que as proteínas estão envolvidas diretamente nos principais eventos celulares e os estudos genômicos possuem limitações no que concerne à expressão e funcionalidade das proteínas codificadas por determinado gene de interesse. Assim, o objetivo desse estudo foi realizar um estudo populacional de *L. theobromae* usando marcadores moleculares, e uma análise proteômica diferencial do fungo entre isolados mais e menos agressivos, visando identificar proteínas responsáveis por esta característica. Para a caracterização molecular, extraiu-se o DNA de 106 isolados a partir do micélio do fungo crescido em meio líquido. Cada amostra foi submetida à reação de polimerase em cadeia (PCR) com 15 pares de iniciadores específicos para essa espécie, além de um par de primer da região ITS e outro da região EF-1 $\alpha$ . Os produtos amplificados foram observados em gel de eletroforese corados com brometo de etídio, e os dados tabulados em planilha binária e analisados pelo método de agrupamento não balanceado baseado na média aritmética (UPGMA), utilizando o programa MVSP. As similaridades genéticas foram estimadas pelo coeficiente de Jaccard. Os resultados indicaram uma grande variabilidade genética da população avaliada. O estudo proteômico foi realizado visando às diferenças qualitativas, ou seja, na presença/ausência de um spot em relação ao grupo antagônico. Para tal, utilizou-se dois isolados do mesmo fungo, diferenciando-se quanto a sua agressividade, em que um era altamente agressivo, enquanto o outro apresentava uma menor agressividade quando inoculados em mudas de cajueiro. Quando o perfil eletroforético foi analisado, foram evidenciados 96 spots diferencialmente expressos. Através da LC-ESI-Q-TOF MS/MS, foram identificadas 84 proteínas apresentando as mais diversas funções celulares. Através desse trabalho, foi possível a caracterização preliminar do perfil proteico deste fungo, obtendo-se alguns indícios nos mecanismos envolvidos na sua agressividade. Este é o primeiro estudo buscando conhecer as proteínas responsáveis pela agressividade de *L. theobromae*.

**Palavras-chave:** Resinose, marcadores moleculares, proteômica, Botryosphaeriaceae.

## ABSTRACT

*Lasiodiplodia theobromae* is a plant pathogenic fungus responsible for many diseases in various plants in tropical and subtropical regions. The Resinose caused by this fungus attacks many tropical trees, among which, papaya, mango, *Spondias* sp., Coconut, cashew, among many others. In the cashew it is considered the main disease in semiarid conditions. Your control is primarily genetic, conducted by planting resistant varieties. To perform the upgrade, it becomes essential to know the characteristics of the pathogen. Limited knowledge of the genetic variability of *L. theobromae* is restricted, requiring efforts to expand it, so that it can use this knowledge to use for breeding resistance to this pathogen. Taking into account also that a gene can encode more than one protein or different proteins function similarly widens further prospective study of plant resistance to infection by identification of protein markers, and proteins that are directly involved in key cellular events and genetic studies have limitations regarding the expression and function of the protein encoded by a particular gene of interest. The objective of this study was to conduct a population study of *L. theobromae* using molecular markers, and a differential proteomic analysis of the fungus between more and less aggressive isolates, to identify proteins responsible for this feature. For molecular characterization, DNA was extracted from 106 isolated from mycelia grown in liquid medium. Each sample was subjected to polymerase chain reaction (PCR) with 15 pairs of primers specific for this species, and a primer pair of the ITS region and other EF-1 $\alpha$  region. The amplified products were observed in the electrophoresis gel stained with ethidium bromide, and the data tabulated in binary spreadsheet and analyzed by unbalanced clustering method based on the arithmetic average (UPGMA) using the MVSP program. Genetic similarities were estimated using Jaccard's coefficient. The results indicated a high genetic variability of the population tested. The proteomic study was conducted aimed at qualitative differences, that is, the presence/absence of a spot with respect to antagonistic group. To this end, we used two isolates of the same fungus, differing as their aggressiveness, in which one was highly aggressive, whereas the other had a lower aggressiveness when inoculated seedlings of cashew. When the electrophoretic profile was analyzed, 96 differentially expressed spots were detected. By LC-ESI-Q-TOF MS/MS, 84 proteins were identified having the most diverse cellular functions. Through this work, it was possible to preliminary characterization of the protein profile of this fungus, obtaining some evidence in the mechanisms involved in their aggressiveness. This is the first study seeking to know the proteins responsible for the aggressiveness of *L. theobromae*.

**Keywords:** Gummosis, molecular markers, proteomics, Botryosphaeriaceae.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figure 1 - Genetic similarity among Botryosphaeriaceae isolates sampled from different hosts and sites. Dendrograma was estimated by clustering a similarity matrix (Jaccard's Coeficient) of binary random amplified polymorphic DNA data using the unweighted pair group method of arithmetic means in the MVSP program. ....51

Figure 2 - Mean lesion lengths on cashew seedlings inoculated with eighteen isolates of Botryosphaeriaceae. Means followed by different letters differ significantly ( $p>0.05$ ) according to Scott-Knott's test. Bars represent standard error of the mean .....52

### CAPÍTULO III

Figura 1 - Teor de proteínas totais extraídas dos diferentes métodos para eletroforese 2-D PAGE. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ). Fortaleza, 2014. ....66

Figura 2 - Gel SDS-PAGE a 12,5% dos protocolos de extração de proteínas do fungo *L. theobromae*. I - marcador, II – método 1, III – método 2, IV – método 3, V – método 4. Fortaleza, 2014.....67

Figura 3 - Comparação dos perfis de géis bidimensionais de proteínas de *L. theobromae* extraídas por diferentes métodos. Método “1” (à esq.) e método “3” (à dir.). 250 µg de proteínas foram separadas por focalização isoeletrica em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear e visualizadas com CBB coloidal. SDS-PAGE 12,5%. Géis foram analisados pelo programa PD - Quest 7.3 (Bio-Rad, EUA). Fortaleza, 2014.....69

Figura 4 - Perfil dos géis bidimensionais de proteínas extraídas de *L. theobromae* pelo método “1” dos isolados mais agressivos – grupo I (à esq.) e menos agressivos – grupo II (à dir.), separados em gel de acrilamida a 12,5%. 250 µg de proteínas foram separadas por focalização isoeletrica em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear e visualizadas após coramento com CBB coloidal. SDS-PAGE 12,5%. Géis foram analisados pelo programa PD-Quest 7.3.1 (Bio-Rad, EUA). Os spots analisados por MS/MS estão identificados por números. Fortaleza, 2014 .....70

Figura 5 - Número de spots detectados em média, nos grupos avaliados. Total de spots diferenciais entre os grupos testados. Número de spots de proteínas em gel 2-D de *L. theobromae*, extraídos de isolados mais e menos agressivos. Fortaleza, 2014.....71

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1 - Botryosphaeriaceae isolates collected from tropical trees used in this study, host and origin..... | 49 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , através de análise por UPLC-ESI-Q-TOF e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$ . .... | 72 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## SUMÁRIO

|                                                                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                         | x    |
| LISTA DE TABELAS.....                                                                                         | xii  |
| RESUMO .....                                                                                                  | viii |
| ABSTRACT .....                                                                                                | ix   |
| CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                           | 15   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                           | 16   |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO .....                                                                                  | 18   |
| 2.1 <i>Lasiodiplodia</i> sp.....                                                                              | 18   |
| 2.2 Ferramentas para identificação de fungos.....                                                             | 19   |
| 2.2.1 Ferramentas moleculares.....                                                                            | 20   |
| 2.2.2 Abordagens proteômicas para a identificação de fungos.....                                              | 22   |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                              | 28   |
| CAPÍTULO II - MOLECULAR AND PATHOGENIC DIVERSITY OF<br>BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIATED TO TROPICAL PLANTS ..... | 35   |
| Abstract .....                                                                                                | 36   |
| Introduction .....                                                                                            | 36   |
| Materials and methods.....                                                                                    | 39   |
| Collection of isolates .....                                                                                  | 39   |
| DNA isolation and MP-PCR amplification .....                                                                  | 39   |
| Pathogenicit tests .....                                                                                      | 40   |
| Results .....                                                                                                 | 41   |
| DNA isolation and MP-PCR amplification .....                                                                  | 41   |
| Pathogenicit tests .....                                                                                      | 42   |
| Discussion .....                                                                                              | 42   |
| Acknowledgments.....                                                                                          | 44   |
| References .....                                                                                              | 44   |

|                                                                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO III - ESTUDO PROTEÔMICO DO FUNGO <i>LASIODIPLODIA THEOBROMAE</i> AGENTE CAUSAL DA RESINOSE EM CAJUEIRO (<i>ANACARDIUM OCCIDENTALE</i> L.).....</b> | <b>53</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                                            | <b>54</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                                          | <b>55</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                     | <b>55</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                             | <b>58</b> |
| 2.1 Obtenção do material fúngico .....                                                                                                                         | 58        |
| 2.2 Cultivo dos fungos .....                                                                                                                                   | 59        |
| 2.3 Estabelecimento de protocolo de extração de proteínas de <i>L. theobromae</i> para análise proteômica.....                                                 | 59        |
| 2.3.1. Método 1: Precipitação com solução de acetona, TCA e 2-ME.....                                                                                          | 60        |
| 2.3.2. Método 2: Precipitação com TCA/acetona .....                                                                                                            | 61        |
| 2.3.3. Método 3: Precipitação com Tris-fenol .....                                                                                                             | 61        |
| 2.3.4. Método 4: Precipitação com TCA .....                                                                                                                    | 62        |
| 2.4 Dosagem de proteínas .....                                                                                                                                 | 62        |
| 2.5 Eletroforese unidimensional.....                                                                                                                           | 62        |
| 2.6 Análise proteômica diferencial de isolados de <i>L. theobromae</i> .....                                                                                   | 63        |
| 2.7 Visualização das proteínas e análise de imagens .....                                                                                                      | 64        |
| 2.8 Processamento dos <i>spots</i> , espectrometria de massas e identificação de proteínas diferencialmente expressas .....                                    | 64        |
| <b>3. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                     | <b>65</b> |
| 3.1 Estabelecimento de protocolo de extração de proteínas do fungo <i>L. theobromae</i> para análise proteômica.....                                           | 65        |
| 3.2 Análise proteômica de isolados de <i>L. theobromae</i> em relação ao seu nível de agressividade.....                                                       | 67        |
| <b>4. DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                       | <b>77</b> |
| 4.1. Protocolo de extração de proteínas .....                                                                                                                  | 77        |
| 4.2. Análise proteômica de isolados de <i>L. theobromae</i> em relação ao seu nível de agressividade.....                                                      | 78        |
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>                                                                                                                                     | <b>82</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                        | <b>82</b> |

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

As frutíferas tropicais representam uma das mais importantes fontes de renda do agronegócio do Nordeste brasileiro. Dentre estas espécies, merecem destaque a mangueira (*Mangifera indica* L.), o mamoeiro (*Carica papaya* L.), o coqueiro (*Cocos nucifera* L.), o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), dentre outras. No entanto, o cajueiro merece uma atenção especial, tendo em vista que seu fruto e pseudofruto são comercializados no mundo inteiro.

O problema mais significativo da fruticultura tropical na região Nordeste do Brasil tem sido a baixa produtividade dos pomares. A causa deste baixo rendimento está relacionada a diversos fatores, dentre eles, destacam-se os problemas fitossanitários como, as doenças e as pragas. Várias doenças são responsáveis por este fato, destacando-se a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e mais recentemente o oídio (*Oidium* spp.), responsáveis por grandes danos na quantidade e qualidade dos frutos produzidos. Além dessas doenças, a resinose causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon; Maubl., vem crescendo de importância nas áreas produtoras do semi-árido nordestino (CARDOSO *et al.*, 1998).

Estudos em populações de patógenos utilizando ferramentas moleculares têm dado importantes contribuições para o entendimento da epidemiologia, co-evolução hospedeiro-patógeno, mecanismos de variação do patógeno, manejo da resistência e métodos de controle de doenças. Diversas técnicas de biologia molecular que detectam variabilidade genética ao nível de sequência de DNA estão hoje disponíveis (MARQUES *et al.*, 2010).

Ao longo das últimas décadas, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas, com sucesso, para complementar a identificação de espécies. Entre as técnicas moleculares, a reação de polimerase em cadeia (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) tem sido frequentemente utilizada por vários autores (PERES *et al.*, 2002). Atualmente, as técnicas moleculares, associadas às características morfológicas e biológicas, têm sido empregadas para diferenciação e caracterização de espécies.

O uso de marcadores moleculares permite a caracterização (*fingerprinting*), a detecção, o diagnóstico e o monitoramento da disseminação de específicos ecotipos do *L. theobromae* entre pomares e até entre regiões. A detecção da presença de tipos patogênicos do fungo em propágulos assintomáticos poderá ser feito com absoluta segurança, usando esses marcadores através da PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

No caso das espécies de *Lasiodiplodia*, várias regiões do gene do RNA ribossomal (ITS1, ITS4, 28S e 5.8S) têm sido usadas para separação de espécies próximas e estudos populacionais (ALVES *et al.*, 2008; CROUS *et al.*, 2006; VAN NIEKERK *et al.*, 2004).

Levando-se em conta que um gene pode codificar mais de uma proteína, ou ainda proteínas diferentes funcionarem de forma semelhante (GONDIM, 2010), é válido ressaltar a perspectiva de estudo da resistência de plantas à infecção, por meio da identificação de marcadores proteicos, visto que as proteínas estão envolvidas diretamente nos principais eventos celulares e os estudos genômicos possuem limitações no que concerne à expressão e funcionalidade das proteínas codificadas por determinado gene de interesse.

O estudo do proteoma por intermédio da eletroforese bidimensional em combinação com a espectrometria de massas fornece informações importantes no que concernem as respostas de plantas frente a estresses. Considerando o contexto das doenças vegetais causadas por fungos, diversas proteínas envolvidas em inúmeros processos biológicos já foram detectadas, tais como proteínas relacionadas a estresses e defesa, envolvidas com transdução de sinais e fotossíntese, além de proteínas do metabolismo basal (QUIRINO *et al.*, 2010; KOGA *et al.*, 2012).

Dentre as diversas abordagens aplicáveis para análise proteômica, a separação de proteínas por meio da Eletroforese Bidimensional (2D) e subsequente identificação por Espectrometria de Massas (MS), combinada com ferramentas de bioinformática, vem sendo as estratégias mais empregadas no estudo do proteoma.

Assim, o conhecimento da diversidade da população do patógeno é um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças, gerando informações sobre o nível e distribuição da variabilidade genética dos isolados fitopatogênicos existentes em uma população hospedeira ou região. Populações de fungos com alto nível de diversidade são difíceis de controlar, uma vez que podem se adaptar mais rapidamente a qualquer medida de controle, seja química ou através da introdução de hospedeiro resistente (MARQUES *et al.*, 2010).

O objetivo desse estudo foi caracterizar a diversidade genética e patogênica de uma população de *L. theobromae* associada à fruteiras tropicais no Nordeste Brasileiro por meio de marcadores moleculares.

Levando-se em conta a inexistência de pesquisas a nível proteômico do fungo *L. theobromae*, objetivou-se realizar um estudo proteômico pioneiro sobre o fungo *L. theobromae*, estabelecendo um protocolo de extração de proteínas adequado para uma comparação dos padrões de eletroforese em gel 2D, obter mapas iniciais de referência 2D do proteoma do referido fungo, verificando a presença de proteínas diferencialmente expressas entre isolados mais e menos agressivos.

A identificação das proteínas expressas é um passo crucial para uma melhor compreensão, no caso específico de *L. theobromae*, das bases moleculares da sua patogenicidade, em que estas informações são de grande utilidade no melhoramento genético vegetal, bem como em estudos de manejo da doença.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Lasiodiplodia* sp.

A família Botryosphaeriaceae acomoda numerosas espécies de fungos, sendo as mais conhecidas *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum*, *Dothiorella* e *Sphaeropsis* (CROUS *et al.*, 2006), seus membros têm uma distribuição mundial e ocorrem em uma grande variedade de plantas hospedeiras, incluindo monocotiledôneas, dicotiledôneas, gimnospermas e angiospermas, em que eles são encontrados como fungos saprófitas, parasitas e endofíticos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Espécies de Botryosphaeriaceae podem causar uma variedade de sintomas em plantas, tais como cancrs, seca descendente em ramos, manchas em madeiras, podridão de frutos, manchas foliares, *Damping-off* e podridão de colo em mudas, cancrs, secas em brotos e mudas, gomose, *dieback*, vassoura-de-bruxa e morte de árvores (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Gêneros da família Botryosphaeriaceae como *Diplodia* possuem os anamorfos, *Diplodia*, *Lasiodiplodia* e *Dothiorella*, uma taxonomia confusa. Várias características têm sido utilizadas a fim de distinguir e identificar as espécies corretamente (CROUS *et al.*, 2006).

O problema mais significativo da fruticultura na região Nordeste do Brasil tem sido a baixa produtividade dos pomares. Em cajueiro, foi apresentando em 2012, um rendimento irrisório de apenas 106,5kg/ha (FAO, 2014). A razão deste baixo rendimento está relacionada a diversos fatores, dentre eles, destacam-se os problemas fitossanitários, tais como, as doenças e as pragas.

Dentre as doenças, destacam-se a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) e o mofo-preto (*Pilgeriella anacardii* Bat., J.L. Bezerra, Castr. & Matta) Arx & E. Müll., ), responsáveis por grandes danos na quantidade e qualidade dos frutos produzidos. Além dessas doenças, a resinose e a podridão preta das hastes, ambas causadas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon, Maubl., apresenta destacada importância nas áreas produtoras do semi-árido nordestino (CARDOSO *et al.*, 1998).

Ainda segundo Cardoso *et al.* (1998), provavelmente, nenhum outro microrganismo represente uma maior ameaça à fruticultura no nordeste do que o fungo *L. theobromae*, pelo

caráter destrutivo dos sintomas por ele provocados, além da sua disseminação assintomática através de sementes, propágulos vegetativos e porta-enxertos.

## 2.2 Ferramentas para identificação de fungos

Estudos em populações de patógenos utilizando ferramentas moleculares têm dado importantes contribuições para o entendimento da epidemiologia, co-evolução hospedeiro-patógeno, mecanismos de variação do patógeno, manejo da resistência e métodos de controle de doenças. Diversas técnicas de biologia molecular que detectam variabilidade genética ao nível de sequência de DNA estão hoje disponíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A família Botryosphaeriaceae é organizada taxonomicamente de acordo com a morfologia de seu estado anamorfo que é frequentemente encontrado na natureza. No entanto, a sobreposição das características morfológicas tem provocado um aumento da aplicação do sequenciamento de DNA para a definição de espécies (WET *et al.*, 2008). A análise da sequência de DNA tem uma influência significativa na taxonomia desta família, resultando na descrição de várias espécies (DE WET *et al.*, 2003; CROUS, 2005).

O uso de marcadores moleculares poderá permitir a caracterização (“*fingerprinting*”), a detecção, o diagnóstico e o monitoramento da disseminação de específicos ecotipos do *L. theobromae* entre pomares e até entre regiões. A detecção da presença de tipos patogênicos do fungo em propágulos assintomáticos poderá ser feito com absoluta segurança, usando esses marcadores através da PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Este fungo afeta mais de uma dezena de plantas frutíferas no Brasil, dentre elas a mangueira, o cajueiro, as anonáceas, o coqueiro, as *Spondias*, a bananeira, a aceroleira e o sapotizeiro (MELO, 2010), provocando perdas desde o vigor de suas sementes até a vida de prateleira pós-colheita. Ademais, a falta de estudos sobre os mecanismos de infecção, defesa e controle eficiente transformam este patógeno em um perigoso inimigo que pode ao primeiro estresse da planta, provocar severas perdas às espécies cultivadas.

O controle dessas doenças torna-se difícil em razão da enorme gama de hospedeiros apresentada pelo fungo. O controle químico por si só não oferece proteção nem controle curativo do *L. theobromae*, sendo então indicado à adoção de uma série de medidas adicionais como o manejo cultural e o controle biológico (TAVARES, 1995).

Devido ao grande espectro de hospedeiros e pelo fato de ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais pressupõe-se uma grande variabilidade genética dos isolados. Os mesmos demonstram uma grande variabilidade na produção de enzimas que degradam os componentes da parede celular (ADISA, 1984).

A resistência de plantas ao ataque de fitopatógenos pode ser entendida como a capacidade que elas desenvolveram de impedir, restringir ou retardar a penetração destes organismos em seus tecidos, diminuindo os efeitos danosos potenciais (MESQUITA, 2007).

Estudos filogenéticos usando dados morfológicos e moleculares tem contribuído significativamente para a taxonomia de Botryosphaeriaceae, além de permitir a descoberta de novas espécies (CROUS *et al.*, 2006; SLIPPERS *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Ferramentas moleculares

Marcadores moleculares têm sido utilizados para análise de divergência genética, identificação de cultivares, mapeamento genético, filogenia; melhoramento genético visando resistência a doenças e sexagem (URASAKI *et al.*, 2002).

Dentre os diversos marcadores, os microssatélites são preferidos em muitos programas de melhoramento genético de plantas, devido às suas características de reprodutibilidade, natureza multialélica, alto grau de polimorfismo, herança codominante, relativa abundância e boa cobertura do genoma (PALOMBI; DAMIANO; 2002).

Dentre as principais características dos anamorfos utilizadas na taxonomia estão tamanho, forma e cor dos conídios, número de septos, espessura da parede, além de detalhes da conidiogêne que distinguem este gênero de fungos de outros intimamente relacionados, a presença de paráfises e estrias longitudinais em conídios maduro são também bastante observadas. Os conídios são hialinos quando jovens, tornando-se posteriormente uniseptados, marrom escuro, de paredes espessas, elipsóide, base truncada, com estrias longitudinais (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

De acordo com Slippers *et al.* (2007), 29 gêneros são relatados em Botryosphaeriaceae sendo que mais de 2000 nomes já foram associados à família, incluindo *Botryodiplodia*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomae*, *Sphaeropsis*. Diversas espécies foram separadas não apenas na morfologia, mas também na base de dados de sequência de ITS e EF-1 $\alpha$  (DENMAN *et al.*, 2000; CROUS *et al.*, 2006).

Segundo Buso *et al.* (2003), os marcadores SSR caracterizam-se por serem codominantes, baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados. O conteúdo genético informativo de um loco SSR é bastante alto, por se tratarem de sequências de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR. A grande limitação do uso

em larga escala de marcadores SSR é a obtenção dos oligonucleotídeos que serão usados na PCR para amplificar alelos em cada loco.

Sequências de DNA ribossomal (rDNA) são universais e contem regiões conservadas e variáveis que permitem a discriminação de fungos em diferentes níveis taxonômicos. Regiões não codificantes semelhantes ao espaço interno transcrito (ITS) evolui mais rapidamente e, conseqüentemente, são mais variáveis que as regiões codificantes. Dentro da região codificante do rDNA, alguns domínios como D1 e D2 do gene 28S do rDNA são também conhecidos por serem variáveis. Estas regiões são de acesso fácil usando “*primers*” universais para fungos e reação em cadeia de polimerase (PCR) e, tem sido usado extensivamente em comparações inter e intraespecífica de vários fungos (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Arruda (2005) realizou a caracterização molecular e morfofisiológica de 28 isolados de *Metarhizium* ssp. por análises de sequências do espaçador transcrito interno (ITS1 e ITS2), confirmando a identidade taxonômica dos isolados avaliados como *M. anisopliae* var. *anisopliae* ou *M. anisopliae* var. *majus*, demonstrando que dois isolados, previamente classificados como *Metarhizium flavoviride*, são, na verdade, *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

Burgess *et al.* (2003) estudando isolados de *L. theobromae* de diferentes localidades e hospedeiros, desenhou 13 pares de “*primers*” SSR específicos para esta espécie. Já Cardoso e Wilkinson (2008), trabalhando com isolados de *L. theobromae* coletados no Brasil, objetivaram desenhar oligonucleotídeos específicos para este fungo. Desta forma, foram obtidos dez marcadores microssatélites que podem ser usados para determinar a diversidade genética deste patógeno, podendo ainda, serem utilizados para testes de diagnósticos visando distinguir ecótipos deste fungo.

Análises de sequências apenas da região ITS ou em combinação com genes codificadores de proteínas, assim como  $\beta$ -tubulina e fator de alongamento 1-alfa (EF1- $\alpha$ ) têm dado uma significativa contribuição para resolver problemas taxonômicos na família Botryosphaeriaceae (ALVES *et al.*, 2004; SLIPPERS *et al.*, 2004a; PHILLIPS *et al.*, 2005).

Dessa forma isolados que eram classificados como *B. dothidea* têm sido posteriormente classificados como *B. dothidea*, *B. parva* e *B. ribis* (SLIPPERS *et al.*, 2004b). Slippers *et al.* (2005b), através de uma reavaliação filogenética e morfológica de espécies de *Botryosphaeria* baseada na morfologia do conídio e dados de sequências de DNA (regiões ITS rDNA e  $\beta$ -tubulina), confirmaram que fungos previamente identificados como *Dothiorella* pertencem a *Fusicoccum*.

Pavlic *et al.* (2004) descreveram uma nova espécie, *L. gonubiensis* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf., com base na morfologia e dimensão conidial, e dados da sequência ITS.

Seguindo o mesmo caminho Burgess *et al.* (2006b) descreveram três novas espécies de *Lasiodiplodia* (*L. crassispota*, *L. venezuelensis* e *L. rubropurpurea*) com base em dados de sequência ITS, EF1- $\alpha$  e caracteres morfológicos.

Alves *et al.* (2008) estudando isolados identificados como *L. theobromae*, descobriram duas novas espécies denominadas *L. pseudotheobromae* e *L. parva*, com base na morfologia dos conídios e dados das sequências ITS e EF1- $\alpha$ .

Apesar de sua utilidade, marcadores de DNA só podem fornecer evidências para a diversificação entre táxons com base em uma fração relativamente pequena do seu genoma e não fornecem evidências para a diversificação fenotípica. Tais informações seriam inestimáveis para confirmar identificações com base em marcadores genéticos (MANCINI *et al.*, 2013).

Estes estudos buscam identificar variações em sequências genômicas que possam estar relacionadas com um fenótipo específico. Assim, a análise da variação das sequências é de grande importância nos estudos genéticos, sendo os marcadores moleculares uma ferramenta útil para determinar e analisar essas variações.

### 2.2.2 Abordagens proteômicas para a identificação de fungos

Os estudos de análise proteômica vêm a complementar os dados de análise e sequenciamento de genomas, auxiliando na compreensão das redes de funcionamento e regulação celular, representando a ponte de ligação entre o genótipo e o fenótipo de um organismo.

Na era pós-genômica, o surgimento da proteômica está diretamente relacionado à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica e seus impactos no metabolismo celular. Neste aspecto, a proteômica pode gerar informações importantes, tais como: quais proteínas são expressas, o nível e o momento de sua expressão, modificações pós-traducionais, respostas expressas pelas células em diferentes situações ou tratamentos.

Assim, a proteômica complementa outras abordagens, incluindo genômica funcional do transcriptoma, que trata do estudo da mudança global da expressão gênica em nível mRNA. Porém, a proteômica é uma técnica mais confiável do que transcriptoma porque as proteínas estão diretamente relacionadas à função (ou fenótipo) (BHADARIA *et al.*, 2007).

A execução de um estudo proteômico envolve a integração de um determinado número de tecnologias, que permeiam os campos da biologia molecular, bioquímica, fisiologia, estatística, da bioinformática, entre outros. Os passos-chave destes estudos são a separação de misturas complexas e a identificação das proteínas (MACDONALD; BORMAN, 2004).

A proteômica auxilia ainda a genômica funcional, uma vez que nem sempre a sequência genômica pode caracterizar funcionalmente a proteína correlacionada (RAPPSILBER; MANN, 2002). Por outro lado, embora para grande parte dos genes a função seja desconhecida, bases de dados de sequências genômicas de organismos de interesse são necessárias para identificar e caracterizar proteínas por espectrometria de massa (MS). Por sua vez, a análise proteômica refere-se à avaliação sistemática da expressão proteica comparativa em tecidos e/ou organismos em momentos fisiológicos diferentes, como tecidos doentes e saudáveis, tratados e não tratados, resistentes e suscetíveis (WASINGER; CORTHALS, 1995).

De acordo com Correa (2009), se o objetivo da proteômica for listar todas as proteínas presentes em uma amostra, metodologias baseadas em cromatografia multidimensional acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS/MS) podem fornecer resultados superiores. Porém, se o intuito for observar as mudanças quantitativas na expressão de proteínas ou suas modificações pós-traducionais durante um processo biológico, os géis bidimensionais são os mais recomendados.

Dentre as diversas abordagens aplicáveis para análise proteômica, a separação de proteínas por meio da Eletroforese Bidimensional (2D) e subsequente identificação por Espectrometria de Massas (MS) combinada com ferramentas de bioinformática, vem sendo as estratégias mais empregadas no estudo do proteoma (MOURA, 2013).

A eletroforese bidimensional (2D) associada à espectrometria de massas (MS) aplica-se, principalmente, ao estudo funcional comparativo da fisiologia celular, permitindo a identificação de proteínas já conhecidas, expressas em concentrações diferentes por meio de análises de sua impressão digital (*mass-fingerprinting*) (JAMES *et al.*, 1993).

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) permite, simultaneamente, a separação, detecção e quantificação de grandes quantidades de proteínas presentes em amostras biológicas. Por esta técnica, as proteínas são separadas pelo ponto isoelétrico (pI) na primeira dimensão – focalização isoelétrica (IEF) – e pela massa molecular na segunda dimensão (SDS-PAGE). Quando combinadas, estas duas etapas permitem a separação de milhares de proteínas, levando à construção de mapas proteicos bidimensionais (ANDRADE, 2006), contendo numerosos spots, bem separados, em que cada um corresponde a uma proteína (ou a uma forma proteica). A eletroforese 2D é considerada o método de maior eficiência e sucesso na resolução de um proteoma, com altas reprodutibilidade e automação (WESTERMEIER, 2001), além de apresentar uma maior capacidade para separar misturas proteicas complexas (SANTOS *et al.*, 2004).

Esta técnica permite observar, diversas proteínas num único gel, bem como analisar expressão diferencial de proteínas para comparar diretamente, em um único gel, as diferenças nos níveis de expressão de proteínas entre diferentes amostras proteicas complexas. Permite ainda, a separação, detecção e quantificação de grandes quantidades de proteínas presentes em amostras biológicas (ANDRADE, 2006).

Patton *et al.* (2002), relata que a sua principal vantagem está no fato da possibilidade da visualização direta de mudanças quantitativas e qualitativas na expressão de proteínas. No entanto, apresenta como desvantagens, a necessidade de grandes quantidades da amostra e como consequência, dificuldade na detecção de proteínas presentes em pequenas quantidades.

Assim, a análise proteômica de extratos obtidos do fungo irá facilitar a identificação dos produtos dos “genes de virulência”, o que certamente contribuirá intensamente na elucidação e eficácia para escolha dos melhores genótipos de tais plantas, podendo por sua vez, ser usados na construção de plantas resistentes ao patógeno (MESQUITA, 2007).

A proteômica permite medições qualitativas e quantitativas de um grande número de proteínas que influenciam diretamente a morfologia celular e bioquímica, e, assim, proporcionar uma análise precisa do status de proteína celular ou alterações durante o crescimento, diferenciação e resposta a fatores ambientais (KIM *et al.*, 2008), complementando ainda outras abordagens genômicas funcionais como a transcriptômica, sendo entretanto, uma técnica mais confiável pois as proteínas estão diretamente relacionadas com o fenótipo (BHADARIA *et al.*, 2007).

De acordo com Santos *et al.* (2004), estudos de proteômica quantitativa, permitem a análise comparativa dos proteomas obtidos em duas ou mais situações em estudo, tendo por objetivo identificar e quantificar as possíveis alterações ao nível da abundância relativa de cada espécie proteica separada nos géis bidimensionais. Desta forma, torna-se possível identificar as proteínas envolvidas na resposta celular à alteração imposta. Normalmente, é construído um mapa de referência do proteoma. Este mapa é construído através da catalogação das várias espécies proteicas separadas em géis 2D após a sua identificação.

A abordagem proteômica exige a separação de proteínas com alta resolução para posterior análise. A separação das proteínas de uma mistura complexa de géis de poliacrilamida por eletroforese bidimensional, seguida de identificação MS/MS é um método bastante utilizado (WASHBURN *et al.*, 2001).

Embora já existam mapas disponíveis para os proteomas de um número significativo de organismos as particularidades da técnica utilizada em cada laboratório podem dificultar o

recurso aos mapas de referência disponíveis, além de que estes podem não incluir as proteínas que, num determinado estudo, interesse analisar (BABNIGG; GIOMETTI, 2004).

Segundo Santos *et al.* (2004), torna-se necessária a construção de um mapa baseado nas condições experimentais escolhidas para a execução das experiências de 2D, que possam posteriormente servir como base para análise de todos os trabalhos sobre o mesmo sistema biológico em que o protocolo de eletroforese bidimensional aplicado seja semelhante.

Estudos de proteômica de fungos filamentosos identificaram proteínas relacionadas às respostas de antibióticos e anti-fúngicos, osmo-adaptação, repressão catabólica e interações patógeno-hospedeiro (KNIEMEYER *et al.*, 2009; GAUTAM *et al.*, 2008).

De acordo com Bhadauria *et al.* (2007), o sequenciamento de mais de 25 genomas de fungos foi concluído. O grande desafio na biologia de fungos moderno é entender a expressão, função e regulação de todo o conjunto de proteínas codificadas por genomas de fungos. Este é o objetivo do campo emergente da proteômica, ou seja, a proteômica fúngica. Esta informação é de valor inestimável para a compreensão de interações planta-fungo, a sua patogênese a colonização fúngica, bem como para os estudos de melhoramento vegetal visando a resistência a doenças.

Segundo Paz e Georg (2011), a análise de genomas de fungos tem avançado bastante, desde o término do sequenciamento de *Saccharomyces cerevisiae*, o primeiro representante do reino Fungi a ter o seu genoma completamente conhecido. Desde a sua publicação, o genoma de *S. cerevisiae* tem se mostrado de inestimável importância para o estudo de uma série de estudos de fungos, incluindo os patogênicos. A análise comparativa de genomas de fungos patogênicos e não patogênicos, através de ferramentas como a bioinformática, pode fornecer subsídios para a identificação de proteínas específicas de fungos patogênicos que podem estar relacionadas com a interação fungo-hospedeiro.

O sequenciamento do genoma de um organismo é por si só, um primeiro passo, uma vez que permite o desenvolvimento de muitos outros estudos. No entanto, a análise do genoma por si só não permite obter informações sobre os níveis de proteína e expressão genética, ou sobre as características das proteínas expressas, tal como o seu tempo de vida, a sua localização subcelular, eventuais modificações pós-tradução, as interações proteína-proteína e interações proteína-DNA, a sua estrutura e a sua função biológica (SANTOS *et al.*, 2004).

Ainda segundo Santos *et al.* (2004), a análise da expressão global através do proteoma, ou seja, todas as proteínas expressas em um genoma, permite revelar proteínas (ou genes codificantes) envolvidas em processos dinâmicos que ocorrem após a perturbação de um dado estado fisiológico, através da comparação da sua concentração celular antes e após essa

perturbação. A monitorização do nível das proteínas através de proteômica quantitativa permite apreciar o efeito da regulação da expressão genética que ocorre pós-transcrição e pós-tradução, fornecendo numerosas pistas quanto à sua função biológica e envolvimento nos processos biológicos examinados.

A identificação das proteínas cuja expressão foi alterada de forma significativa permite a obtenção de pistas sobre seu possível envolvimento no processo biológico em estudo. Existem várias etapas para a identificação de proteínas numa amostra complexa, porém, de modo resumido, seguem três passos básicos: a separação da proteína, digestão com uma enzima conhecida e a determinação da massa dos peptídeos (que permite a identificação de proteínas) (FÉLIX, 2012).

Como a maioria dos fungos possui uma parede celular robusta, uma eficaz extração de proteínas é um passo fundamental para estudos de proteômica de fungos. Para a extração de proteína, um protocolo ideal deve ser reprodutível, capturar todas as espécies de proteínas num proteoma, bem como, apresentar uma baixa contaminação de outras moléculas (BHADAURIA *et al.*, 2007).

Os *fingerprints* de massa de peptídeos (PMF) são utilizados para a identificação de proteínas através da análise dos tamanhos de fragmentos típicos via software MASCOTE (<http://www.matrixscience>), buscando em todo o banco de dados de proteínas fúngicas do NCBI.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica capaz de determinar a relação entre massa e carga ( $m/z$ ) de espécies ionizadas em fase gasosa. Um espectrômetro de massas é um instrumento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. As fontes de ionização empregadas em MS aplicada à análise proteômica são *Electrospray* (ESI) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), tendo a função de ionizar (de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica) e transferir as espécies a serem analisadas para a fase gasosa. Os analisadores de massas, como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações  $m/z$ . Diversos analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros, são comercialmente disponíveis e cada um possui aspectos positivos e negativos, de acordo com o experimento planejado e o resultado experimental requerido (CANTÚ *et al.*, 2008).

De acordo com Santos *et al* (2004), existem várias soluções em termos de equipamento, para a determinação das massas de peptídeos obtidos por hidrólise enzimática. Entre essas

soluções, a mais comum é o espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF, que é composto por um ionizador, MALDI (matriz assistida a laser por dessorção/ionização), um analisador, (TOF, *time-of-flight*), e um detector de que registra o tempo de voo (time of flight) dos vários peptídeos ionizados. À medida que os íons menores “voam” com uma velocidade mais elevada que os maiores, a proporção de  $m/z$  (massa/carga) pode ser calculada a partir dos tempos de voo registrados, após calibração do aparelho, permitindo assim determinar as massas de cada peptídeo.

Segundo Domon e Aebersold (2006), entre os principais tipos de ionização, destacam-se a *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI), geralmente utilizada na identificação de proteínas a partir de spots retirados de géis, e a *Electrospray ionization* (ESI), que pode ser utilizada na análise de soluções contendo a amostra. Essas técnicas são utilizadas juntamente com diferentes técnicas de espectrometria na geração do PMF (MALDI-TOF-MS) ou no sequenciamento *de novo* (MALDI-TOF MS/MS, LS-ESI-Q-TOF MS/MS) de peptídeos gerados através da digestão proteolítica.

O analisador por tempo de voo, os íons podem ser formados na fase gasosa por diversas fontes, no vácuo por ionização por elétrons (EI) ou por dessorção assistida por laser (MALDI), ou ainda em pressão atmosférica por ionização por eletrospray (ESI), e finalmente, por ionização química (APCI) (SAWAYA, 2009).

Os programas mais comumente empregados para a identificação de proteínas em bancos de dados a partir de informações obtidas em MS são o Sequest e o Mascot. Ambos os programas correlacionam espectros de massas de fragmentação (não interpretados) de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados (CANTÚ *et al.*, 2008).

Uma vez entendida a sistemática aplicada pelos softwares para a identificação de proteínas em bancos de dados usando dados de espectrometria de massas, faz-se extremamente necessário e de suma importância o completo entendimento de como ocorre a fragmentação dos peptídeos. Além disso, a interpretação manual de espectros de MS/MS é recomendada em todos os casos e indispensável em algumas situações. Por fim, existem situações nas quais o genoma de uma determinada espécie ainda não está completamente sequenciado ou disponível e, neste cenário, é necessário derivar a sequência primária de aminoácidos de um determinado peptídeo baseado única e exclusivamente nos dados obtidos por espectrometria de massas, isto é, sem recorrer a banco de dados (sequenciamento “*de novo*”) (CANTÚ *et al.*, 2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADISA, V.A. Cell wall degrading enzymes of *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 475-483, 1984.

ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J.; PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 3, p. 598-613, 2004.

ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodyplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2008.

ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. 2006. 120p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005. 176 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BABNIGG, G.; GIOMETTI, C. S. GELBANK: a database of annotated two-dimensional gel electrophoresis patterns of biological systems with completed genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.582-585, 2004.

BHADAURIA, V.; ZHAO, W. S.; WANG, L. X.; ZHANG, Y.; LIU, J. H.; YANG, J.; KONG, L. A.; PENG, Y. L. Advances in fungal proteomics. **Microbiological Research**, v. 162, p. 193-200, 2007.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J. E.; WINGFIELD, B. D. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical pathogen *Botryosphaeria rhodina*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 1. p. 91-94, 2003.

BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; MOHALI, S.; PEGG, G.; BEER, W.; WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006b.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.7, p.46-50, 2003.

CANTÚ, D.; VICENTE, A. R.; GREVE, L. C.; DEWEY, F. M.; BENNETT, A. B.; LABAVITCH, J. M.; POWELL, A. L. T. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 859–864, 2008.

CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; SÁ, F. T.; SOUZA, R. N. M. **Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1998. 2 p. (Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico 17).

CARDOSO, J. E.; WILKINSON, M. J. Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 55-57, 2008.

CORREA, J. F. **Análise proteômica do fungo *Cryptococcus gatii* em diferentes temperaturas**. 2009. 39 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CROUS, P. W. Impact of molecular phylogenetics on the taxonomy and diagnostics of fungi. **OEPP/EPPO Bulletin**, v. 35, p. 47–51, 2005.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

DENMAN, S.; CROUS, P. W.; TAYLOR, J. E.; KANG, J. C.; PASCOE, I.; WINGFIELD, M. J. An overview of taxonomic history of Botryosphaeria and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, v. 45, p. 129–140, 2000.

DE WET, J.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. **Mycological Research**, v. 107, p. 557–566, 2003.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

FÉLIX, C. R. F. C. ***Lasiodiplodia theobromae*: um fungo fitopatogénico que infeta humanos**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada) – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.

GAUTAM, P.; SHANKAR, J.; MADAN, T.; SIRDESHMUKH, R.; SUNDARAM, C. S.; GADE, W. N.; BASIR, S. F.; SARMA, P. U. Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 4220-4227, 2008.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

JAMES, P.; QUADRONI, M.; CARAFOLI, E.; GONNET, G. Protein identification by mass profile fingerprinting. **Biochem. Bioph. Research Commum**, v. 195, p. 58-64, 1993.

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 7, p. 87-94, 2008.

KNIEMEYER, O.; LESSING, F.; BRAKHAGE, A. A. Proteome analysis for pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 47. Suppl. I, p. 248-254, 2009.

KOGA, H.; DOHI, K.; NISHIUCHI, T.; KATO, T.; TAKAHARA, H.; MORI, M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of susceptible rice plants expressing the whole plant-specific resistance against *Magnaporthe oryzae*: Involvement of a thaumatin-like protein. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 77, p. 60-66, 2012.

MACDONALD, J. A.; BORMAN, M. A. Analysing biological function with emerging proteomic technologies. **International Congress Series**, v. 1275, p. 14-21, 2004.

MANCINI, V.; DAPPORTO, L.; BARACCHI, D.; LUCHI, N.; TURILLAZZI, S.; CAPRETTI, P. Phenotypic characterization of *Diplodia* species by MALDI-TOF MS and the bias of mycelium age. **Forest Pathology**, v. 43, p. 455-461, 2013.

MELO, J. G. M. **Diversidade genética e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado ao cajueiro**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MESQUITA, R. O. **Análise proteômica de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* que apresentam respostas diferenciadas em diversas fruteiras**. 2007. 54 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MOURA, H. F. N. **Análise proteômica diferencial da interação incompatível entre o feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)] e o fitopatógeno *Colletotrichum***

***gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.** 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

O'FARRELL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133–1141, 1997.

PALOMBI, M. A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reporter**, v. 20, p.1061–1066, 2002.

PATTON, W. F. Detection technologies in proteomic analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 771, p. 3-31, 2002.

PAVLIC, D.; SLIPERS, B.; COUTINHO, T. A.; GRYZENHOUT, A.; WINGFIEL, M. J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 313-322, 2004.

PAZ, M. G.; GEORG, R. C. Caracterização de proteínas de fungos patogênicos potencialmente associadas com a patogenicidade. In: 63º Reunião Anual da SBPC, 2011, Goiania. **Anais...** Goiania: SBPC, 2011. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, v.97, n.2, p. 513-529, 2005.

QUIRINO, B. F.; CANDIDO, E. S.; CAMPOS, P. F.; FRANCO, O. L.; KRÜGER, R. L. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, p. 351-362, 2010.

RAPPSILBER, J.; MANN, M. What does it mean to identify a protein in proteomics? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, p. 74-78, 2002.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; CORREIA, I. S. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim Biotecnologia**, v. 77, p. 7-17, 2004.

SAWAYA, A. C. H. F. Analisadores de massas. In: EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F.; VAZ, B. G.; QUEIROGA, C. L.; FERREIRA, C. R (eds.). **Espectrometria de massas**. Disponível em: < <http://www.espectrometriademassas.com.br/>>. Acesso em: 04 mar. 2014.

SLIPPERS, B.; CROUS, P. W.; DENMAN, S.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 83-101, 2004b.

SLIPPERS, B.; FOURIE, G.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; CARNEGIE, A. J.; WINGFIELD, M. J. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 343-358, 2004a.

SLIPPERS, B.; JOHNSON, G. I.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 99-110, 2005b.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 2-3, p. 90-106, 2007.

TAVARES, S. C. C. de H. Principais doenças da mangueira e alternativas de controle. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido (Petrolina, PE). **Informações técnicas sobre a cultura da manga no semi-árido brasileiro**. Brasília: EMBRAPA-SPI, vol. 1, 1995.

URASAKI, N.; TOKUMOTO, M.; TARORA, K.; BAN, Y.; KAYANO, T.; TANAKA, H.; OKU, H.; CHINEN, I.; TERAUCHI, R.. A male and hermaphrodite specific RAPD markers for papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 281-285, 2002.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J.R. III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnological**, v. 19, p. 242–247, 2001.

WASINGER, V. C.; CORTHALS, G. L. Proteomic tools for biomedicine. **Journal of Chromatography B**, v. 771, p. 33-48, 2002.

WESTERMEIER, Reiner. **Electrophoresis in practice**. 3° ed. Weinheim, Germany: Wiley - VCH, 2001.

WET, J. D.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O.; WINGFIELD B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, p. 116–126, 2008.

**CAPÍTULO II**  
**MOLECULAR AND PATHOGENIC DIVERSITY OF BOTRYOSPHAERIACEAE**  
**ASSOCIATED TO TROPICAL PLANTS**

## Molecular and pathogenic diversity of Botryosphaeriaceae associated to tropical plants

José G. M. Melo<sup>1\*</sup>; Joilson S. Lima<sup>1</sup>; José E. Cardoso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n-Campus do Pici, 60.020-181, Fortaleza, CE, Brazil; <sup>2</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Sara Mesquita, 2227, 60.511-110, Fortaleza, CE, Brazil

\* Autor for correspondence: [joseglauber@yahoo.com.br](mailto:joseglauber@yahoo.com.br)

---

### Abstract

Botryosphaeriaceae species represent some of the most important fungal pathogens of woody plants, especially tropical trees. Morphological characteristics give us a fine indication about the characterization of the pathogen, but not precisely. Thus, genetic characterization appears as an auxiliary mechanism for identifying these fungi. DNA sequence data (SSR, ITS1, ITS4 and EF-1 $\alpha$ ) were used to identify known members and describe new members Botryosphaeriaceae. The aim of this study was to characterize a population diversity of Botryosphaeriaceae associated with tropical trees in northeastern Brazil. A total of 105 isolates obtained from tropical plants species were used. A dendrogram was constructed and there was a vast variability among isolates. We also conducted a test pathogenicity of a group of 18 isolates was inoculated in two clones on seedlings of cashew, BRS 226 and BRS 265. There was also a large variation among these isolates, these results were analyzed using the program SISVAR 3.1, and means were compared by Scott-Knott ( $p>0.05$ ).

**Key words:** *Lasiodiplodia theobromae*, gummosis, molecular markers.

---

### Introduction

The exploitation of many tropical fruits trees is an important economic and social activity in Northeastern Brazil. The main areas of cultivation are located in the semi-arid northeast, where plants are usually subject to water stress due to low rainfall period. These factors, associated with a genetic uniformity of the proper culture (diversity within the species), contribute to the increase infecting plant pathogens.

The Botryosphaeriaceae (Dothideales) is a cosmopolitan family of fungi with a very wide host range of mostly woody plants. They can be primary or opportunistic pathogens, endophytes or saprobes, as reviewed by Slippers & Wingfield (2007). The Botryosphaeriaceae is one of the most important group of plant pathogens in northern Brazil, causing many diseases in a very wide range of plants, mainly woody plants including cultivated fruit crops such as cashew (Cardoso et al., 1998; Cardoso et al., 2002; Darvas & Kotze, 1987), mango (Freire et al., 2002; Rubini et al., 2005), avocado (Costa et al., 2010), *Annona* spp (Mullen et al., 1991), and *Spondias* spp. (Ponte, 1985). These microorganisms are

ubiquitous and plurivorous fungi, able to infect over 500 plant species causing symptoms as damping-off, root rot, plant wilt, leaf blight, canker, gummosis, fruit & seed rot, dieback of trees, witches broom, and stain in timber (Ponte et al., 1988; Punithaligam, 1976). The infection is generally associated to wound or stressed-weakened plants (Baird & Carling, 1998; Britton & Hendrix, 1986), as these fungi are considered a latent pathogen capable of endophytic infection (Cardoso et al., 2009; Levinson & Gutman, 1987; Mohali et al., 2005; Punithaligam, 1976). The taxonomic position these fungi are based on culture characteristics and asexually reproductive structures (*e. g.* pycnidium, conidiophores, and conidiospores).

Since the 1990's significant advances have been made in the identification of species in the Botryosphaeriaceae using DNA-based techniques. Specifically, comparisons of sequence data for the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) region have been used to analyse intraspecific and interspecific relationships in the Botryosphaeriaceae (Smith et al., 2001; Smith & Stanosz, 2001; Denman et al., 2000, Alves et al., 2006; Phillips et al., 2006). Thus, a relatively robust taxonomy is emerging for the Botryosphaeriaceae and this is already leading to a deeper understanding of host pathogen relationships and geographic distribution of species.

Identification and taxonomy of this family has long been complex because the teleomorph is rarely seen in nature. Consequently, anamorphic characteristics have been used for identification. The combination of molecular methods and anamorphic characters has simplified species identification in the Botryosphaeriaceae family (Denman et al., 2000).

Relationships among isolates were suggested to be more closely linked to host than to geographical origin (Burgess et al., 2003). Nevertheless, in another study with 177 isolates from *Pinus* spp, *Eucalyptus urophylla* and *Acacia mangium* originated from Venezuela, Mexico and South Africa (Mohali et al., 2005), no evidence of host specificity for isolates of *L. theobromae* was found and a very high gene flow between populations from those hosts and some geographic isolation were also found.

Culture morphology has rarely been used as a character for species separation in Lasiodiplodia. Thus, cultural characters can vary widely between isolates of any given species, and thus are of limited value in species determination. Making it necessary to use other tools to aid in their distinction.

Slippers et al (2004) aimed to recognize and characterize populations, DNA molecular markers have been used to follow genes and evidences of speciation of a countless number of pathogenic fungi. These markers have recently been used to analyse genes and genotype flow,

his reproductive mode as well as the speciation of a big number of fungi, including *Botryosphaeria* spp. and its anamorphs.

A recent study with *L. theobromae*, suggests that the relations between isolates are closer relatively to the type of host each isolate infects, rather than to their geographical proximity (Burgess et al., 2003)

Simple sequence repeat (SSR) or microsatellite markers is a group of co-dominance molecular markers rich in polymorphisms with allele size determined by addition or deletion of one or more repeats (Levinson & Gutman, 1987). SSR markers have recently been developed for *L. theobromae* (Burgess et al., 2003; Cardoso & Wilkinson, 2008) and used to study relationship among isolates, population structures (Mohali et al., 2005), and speciation (Pavlic et al., 2004).

Based on 28S rDNA sequence data Crous et al. (2006) showed that *Botryosphaeria* is polyphyletic and they divided it into several genera distinguishable by conidial morphology and phylogenetic data. *Botryosphaeria* was thus restricted to species with *Fusicoccum* anamorphs. However, the clade containing *Diplodia*/*Lasiodiplodia* could not be fully resolved. In a multigene genealogy Phillips et al. (2008) resolved and separated this clade into six genera including *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neodeightonia*, *Barriopsis*, *Phaeobotryon* and *Phaeobotryosphaeria*. Morphological characters of the anamorphic and teleomorphic states also supported the separation of these genera.

Species in *Lasiodiplodia* have been distinguished based on their DNA phylogeny in association with conidial morphology and dimensions, and morphology and size of paraphyses. Burgess et al. (2006) used septation of pycnidial paraphyses to differentiate *Lasiodiplodia* species including *L. crassispora*, *L. gonubiensis*, *L. rubropurpurea*, *L. theobromae* and *L. venezuelensis*.

Adesemoye et al. (2014) studying species of *Botryosphaeriaceae*, aimed to identify which pathogens are associated with bot gummosis on citrus in California. The species were identified morphologically and by phylogenetic comparison of the complete sequence of the internal transcribed spacer regions,  $\beta$ -tubulin gene, and elongation factor  $\alpha$ -1 genes. In this study were used 74 isolates belonging to the *Botryosphaeriaceae* family. A consensus-unrooted most-parsimonious tree showed the existence of three major clades in the *Botryosphaeriaceae* isolates. In pathogenicity tests, 14 isolates were tested, where all these isolates showed significantly differed ( $P < 0.05$ ) in the size of lesions produced on Eureka lemon shoots

The diversity and spatial distribution of the Botryosphaeriaceae, associated with a specific host, is important. Whether it accommodates similar or different fungal assemblages depending on the environment is useful in understanding the ecology and host–pathogen relationships of these fungi. This knowledge in turn can be applied where recommendations for disease management strategies are required. Several studies have compared assemblages of fungal endophytes in different geographic regions (Fisher et al. 1994; Gallery et al. 2007; Gilbert et al. 2007; Taylor et al. 1999). However, such studies dealing with a specific endophytic group of fungi are limited. Similarly, very few studies have compared the assemblages of Botryosphaeriaceae from a specific host at a regional level (Taylor et al. 2005; Úrbez-Torres et al. 2006).

Thus, the aim of this study was to characterize a population of Botryosphaeriaceae associated with tropical plants by using molecular markers SSR, ITS and EF-1 $\alpha$  and pathogenicity tests.

## **Materials and Methods**

### **Collection of isolates**

Samples of diseased or healthy branches and trunks of various tropical plants were collected in northern, northeastern and central western regions of Brazil at different geographically and ecologically areas. Diseased plants were characterized by canker or black branch dieback symptoms as early described (Cardoso et al., 2002; Freire et al., 2002). Healthy plant organs were only collected when no disease symptoms were found in a particular orchard.

Plant samples were brought to the laboratory and examined by longitudinal and transversal cuts for any internal symptom. Plant tissues were washed thoroughly with running tap water, surface-sterilized with 70% ethanol for 30 s, 2% NaOCl for 1.5 min, and then rinsed twice with sterile distilled water. Small sections (1 x 2 mm) from the margin of diseased or from bud of healthy tissues were placed on potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) in petri dishes. Monosporic cultures were obtained upon sporulation after subculturing.

A total of 105 single-spore cultures (Table 1), previously characterized morphologically by Lima (2010), and transferred onto PDA slants and stored at 5° C for further studies.

### **DNA isolation and MP-PCR amplification**

Mycelia (50 to 200 mg) grown on liquid-still potato dextrose broth at 26° C for 15 days were air-dried and ground to a fine powder using liquid nitrogen. Total genomic DNA was extracted using the protocol described by Cavalcanti (2004) slightly modified. The concentration of the

resulting DNA was determined using a NanoDrop® 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) version 1.0.

Microsatellite-primed polymerase chain reaction (MP-PCR) mixtures contained 10.0 µl GoTaq Flexi buffer, 1.0 µl dNTP, 0.25 µl GoTaq Hot Start Polymerase (5u/ µl), 1.0 µl of each SSR-primer at 1 µM, 2.0 µl of template DNA and 34.75 µl ultrapure water. Amplifications were carried out in total reaction volume of 50 µl. PCR's were performed in a Techne Flexigene Thermocycler (Model TC-512 Techne Inc. Barloworld Scientific, Burlington, NJ) programmed for an initial 94°C denaturing step for 1 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 54°C for 30 s and extension at 72°C for 2 min, with a final extension step at 72°C for 10 min. PCR's were performed on all isolates of the population of Botryosphaeriaceae (Table 1) with fifteen primers, specifically designed to amplify regions containing SSR (Burgess et al., 2003; Cardoso & Wilkinson, 2008), two oligonucleotide primers ITS1 and ITS4 (White et al., 1990), and two primers EF1 $\alpha$ -728F and EF1 $\alpha$ -986R (Carbone et al., 1999) were respectively used to amplify and sequence the internal transcribed spacer regions (ITS), and the translation elongation factor (EF).

The PCR amplification products were separated by electrophoresis for 2 hours in 2% agarose gels in 1x TBE running buffer (0.4M tris-borate and 0.01M EDTA) and visualized under UV light following ethidium bromide (0.08 µg.ml<sup>-1</sup>) staining.

For each marker each isolate was scored for the presence or absence of each amplicon and a binary matrix was constructed. The frequency of each locus for entire population was calculated. These data were then used to generate an unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram based on Jaccard's Coefficient using the statistical package MVSP (Multi-Variate Statistical Package v.3.1) (Kovach Computing Services, Anglesey, Wales).

### **Pathogenicity tests**

Eighteen Botryosphaeriaceae isolates were chosen for pathogenic test to determine the aggressiveness of these isolates (Table 1) into two commercially growing cashew cloned varieties with known different reaction to gummosis caused by a Botryosphaeriaceae species, *Lasiodiplodia theobromae* (Cardoso et al. 2006). Ninety-days-old grafted plants of BRS 226 and BRS 265 dwarf cashew varieties, resistant and susceptible to gummosis, respectively, were used for this test.

The inoculation was done by punching up a 2 by 2 mm hole into the stem at 15 cm from above grafting site using an electric hand drill, followed by filling the holes with disks of PDA containing fungal mycelia, in order to assure a contact of the fungus to the plant

vascular tissue. After inoculation, the wounds were covered with 100% pure Vaseline petroleum jelly and wrapped with parafilm®. Immediately after inoculation, the plants were transferred to a greenhouse at  $30 \pm 5^\circ\text{C}$  and relative humidity of  $70 \pm 10\%$ . For the control treatment, PDA medium without fungal mycelia was used. The experiments were carried out in randomized complete block design with four replications of one plant each.

The aggressiveness of isolates was estimated by measuring the length of the internal lesions observed in the stem after 15 days. Reisolation of the fungus from diseased tissues was attempted by transferring small pieces of necrotic tissue from the edges of lesions on PDA and incubating at room temperature.

Data collected from experiment was subjected to analysis of variance (ANOVA) and mean compared using the test group Scott-Knott, the 5% level of significance using the statistical program Sisvar 5.3 (Ferreira, 2011).

## **Results**

### **DNA isolation and MP-PCR amplification**

Substantial amount of genomic DNA was isolated from mycelium mat of Botryosphaeriaceae isolates. All 17 pairs of primers consistently generate strong amplification products with at least one DNA sample. No changes in banding patterns were observed. Cluster analysis of the MP-PCR profile data revealed that genetic distances among isolates were large. The dendrogram showing diversity and relationship among Botryosphaeriaceae isolates was constructed (Figure 1). Various isolates showed a hundred percent similarities for the used markers. Many similarity groups were derived out of 105 Botryosphaeriaceae isolates with similarity coefficient of 0.9 or more, showing the high variability of this family.

There was no correlation between the origin and the host of the isolates. We can observe that there is a relationship between the origin of the isolates and their host, where isolates from different regions show similarity of 100%, as the isolates, 29 and 30, originating from Beberibe-CE and Alto Santo-CE, respectively, as well as isolates 51 and 58, Crato- CE and Picos-PI, respectively. The isolates 3 and 8, isolates Ateira and Cashew, respectively, showed 100% similarity.

Data indicate a remarkably high level of genetic variability among isolates, which confirmed the cosmopolitan distribution and the lack of specificity of this family (Burgess et al., 2003; Cardoso & Wilkinson, 2008; Mohali et al., 2005). This high level of genetic diversity may suggest that these fungi species are either well adapted to tropical trees plants or it is a native species. The main question arises by the fact that the population of these isolates are not host specific as endophyte organism, consequently their diversity is less

affected by host diversity, however it can become specialized to infect host tissues as undergoes to specific kind of stress response. Isolates originated from asymptomatic tissues presented higher variability, which implies a greater stability and evolution towards pathogenic ability, in agreement with earlier reports (Mohali et al., 2005).

### **Pathogenicity tests**

The inoculation trials conducted in this study have shown that some isolates of Botryosphaeriaceae were more pathogenic of others the species tested. Similarly to the previous experiment, there was no correlation between the origin and the host. Analyses of variance of the lesion length data indicated a significant treatment effect according test Scott-Knott ( $P=0.0001$ ).

All species caused lesions in seedlings cashew. The isolates 13, 68, 90, 103 lesion lengths caused larger (Figure 2). Re-isolation from the branches of isolates inoculated plants showed up to 90% recovery of the fungus. These isolates all the different sites and hosts, yet show great variability of the fungus Botryosphaeriaceae because no one pattern with respect to molecular characterization tests, with 30% similarity (Figure 1).

### **Discussion**

In this study a collection of isolates of Botryosphaeriaceae was obtained from various species of tropical plants in Northeast in Brazil, exhibiting disease symptoms such diebacks, and canckers, and tissues without symptoms. With this study the geographical and especially the host range of all species was expanded.

The obtained results demonstrate that there is no specific pathogen, for example, the isolates 3 and 8 showed a 100% similar (figure 1), even when isolated from different hosts, *A. squamosa* and *A. occidentale*. The same occurs with isolates 29 and 30 (*A. muricata* and *A. occidentale*), however the isolates 32 and 63 both isolates of *A. occidentale* Showed 100% of similarity.

Host specialization has been widely used to identify new taxa in Botryosphaeria (Slippers & Wingfield, 2007), but this is criticized because of its wide host range (Burgess et al., 2006; Mohali et al., 2005; Slippers & Wingfield, 2007). This study did not aim to identify neither the number of alleles nor the relationship between host and geographical origin of isolates but to provide information on the genetic structure of isolates associated to tropical trees plants tissues, which might help to understand this host-pathogen relationship. Therefore, results should be understood within this narrow focus of the study.

Preliminary study with 9 isolates from *Pinus* sp. and *Eucaliptus* spp. has indicated that host plant was more important than geographical origin (Burgess et al., 2003), however the

lack of host specificity was later found by Mohali et al. (2005) among three host species (*i.e.* *Pinus caribaea*, *Eucaliptus urophylla* and *Acacia mangium*). In this study, the great variability among isolates of has been assured as earlier implied (Cardoso & Wilkinson, 2008).

Pavlic et al. (2004) used ITS sequence data to distinguish *L. gonubiensis* from *L. theobromae*. Burgess et al. (2006) described a further three new *Lasiodiplodia* species clearly separated from *L. theobromae* based on ITS sequences. Inclusion of EF-1 $\alpha$  sequences in the phylogenetic analysis gave stronger support for these species (Burgess et al. 2006).

In a study of Botryosphaeriaceae on *Prunus* species in South Africa, Damm et al. (2007) described *L. purivora* as a new species. This species is closely related to *L. theobromae* and the two species could not be distinguished solely on the basis of ITS sequence data but they were clearly separated when EF-1 $\alpha$  data was included.

Alves et al. (2008) used ITS and EF-1 $\alpha$  to characterise a collection of isolates originally identified as *L. theobromae*. In this way they showed that *L. theobromae* is a complex of cryptic species and described *L. pseudotheobromae* and *L. parva* as new specie.

Botryosphaeriaceae may have been co-evoluted with species tropical trees plants to a very intimate condition and later becomes pathogenic, as plants become threaten by environmental stresses. These fungi has been isolated very frequently from asymptomatic tissues of many species of Anacardiaceae family, which might imply the intimate association as an endophyte or a weak opportunistic pathogen with low if any host specificity within this group of plant.

Phylogenetic relationships for the Botryosphaeriaceae from other known members of this fungal family were determined using combined sequence datasets of the ITS and EF-1 $\alpha$  gene regions. However, the resulting phylogenies did not clearly separate all the species (Pavlic et al. 2007; Slippers et al. 2004b).

An important finding is that the Botryosphaeriaceae interaction with tropical trees plants as endophyte or as a pathogen would depend on the environmental conditions which are related to the geographic location.

According to the results obtained in the pathogenicity test (figure 2), the isolates 90, 68, 103 and 13, from *Mangifera indica*, *Spondias purpurea*, *Anacardium occidentale* and *Paersea Americana*, respectively, may be considered to potentially pathogenic of cashew while isolates 32, 81 and 69, all of *Anacardium occidentale* showed to be less aggressive under the same conditions tested here. This indicates that the infections occurred in the field may be originated from pathogens of differents hosts.

*Lasiodiplodia theobromae* have previously been shown to be pathogens of several hosts (Davidson & Tay 1983; Mohali et al. 2007; Pavlic et al. 2007; Slippers et al. 2004a). This fungus has a wide host range and has been reported on native and introduced hosts on many continents, may have been introduced to Brazil. Population genetic studies on this fungus will likely provide answers to the questions related to its origin and movements.

The results of this study provide an interesting insight into the diversity of Botryosphaeriaceae occurring on various species of tropical plants in Brazil. Some of these fungi appear to be potentially important pathogens of tropical plants and future surveys should recognize this fact. Population studies on other species of the Botryosphaeriaceae are, therefore, planned to provide further insight into their movement between native and cultivated hosts in Northeast in Brazil.

There was evidence of variation in pathogenicity between isolates of same hosts and location. This difference in pathogenicity between isolates of the same *Botryosphaeria* species is not a new phenomenon. For example, studies on isolates of *B. australis* (van Niekerk et al. 2004), *B. obtuse* (Larignon et al. 2001), *B. rhodina* (Leavitt, 2003) and *B. dothidea* (Parker & Sutton 1993) showed differences in pathogenicity between isolates.

This study provides a basis for future work to understand the occurrence and importance of *Botryosphaeria* spp. on tropical plants. Quarantine measures, specifically designed to restrict further introductions of new genotypes, as well as currently unknown pathogens, is of increasing importance, especially in Northeast in Brazil.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work is a part of the doctoral thesis of the first author.

### **References**

- Alves A, Correia A, Phillips AJL (2006) Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* 23:1-15.
- Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1–13.
- Baird R, Carling D (1998) Survival of parasitic anal saprophytic fungi on intact senescent cotton roots. *The Journal of Cotton Science* 2:27-34.
- Britton KO, Hendrix FF (1986) Population dynamics of *Botryosphaeria* spp. in peach gummosis canker. *Plant Disease* 70:134-136.

- Burgess TI, Barber, PA Mohali S, Pegg G, De Beer W, Wingfield MJ (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423-435.
- Burgess T, Wingfield MJ, Wingfield BD (2003) Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. *Molecular Ecology Notes* 3:91-94.
- Carbone I, Anderson JB, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Cardoso JE, Bezerra MA, Viana FMP, Sousa TRM, Cysne AQ, Farias FC (2009) Ocorrência endofítica *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. *Summa Phytopathologica* 35:262-266.
- Cardoso JE, Freire FCO, Sá FT (1998) Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. *Fitopatologia Brasileira* 23:48-50.
- Cardoso JE, Vidal JC, Santos AA, Freire FCO, Viana FMP (2002) First report of black branch dieback of cashew by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *Plant Disease* 86:558-558.
- Cardoso JE, Paiva JR, Cavalcanti JJV, Santos AA, Vidal JC (2006) Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. *Crop Protection* 25: 855–859.
- Cardoso JE, Wilkinson MJ (2008) Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Summa Phytopathologica* 34:55-57.
- Cavalcanti JJV (2004) Genetic mapping and QTL identification in cashew (*Anacardium occidentale* L.). PhD Thesis, University of Reading. Reading, Berkshire, UK.
- Costa VSO, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG, Camara MPS (2010) Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *European Journal Plant Pathology* 127:509-519.
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Phillips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235 – 253.
- Damm U, Crous PW, Fourie PH. (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia Africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99: 664 – 680.
- Darvas JM, Kotze JM (1987) Fungi associated with pre and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. *Phytophylactica* 19:83-85.
- Davidson EM, Tay CS (1983) Twig, branch, and upper trunk cankers of *Eucalyptus marginata*. *Plant Disease* 67:1285–1287.

- Denman S, Crous PW, Taylor JE, Kang JC, Pascoe I, Wingfield MJ (2000) An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45:129-140.
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042.
- Fisher PJ, Petrini O, Petrini LE, Sutton BC (1994) Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist* 127:133–137.
- Freire FCO, Cardoso JE, Santos AA, Viana FMP (2002) Diseases of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. *Crop Protection* 21:489-494.
- Gallery RE, Dalling JW, Arnold AE (2007) Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with cecropia. *Ecology* 88:582–588.
- Gilbert GS, Reynolds DR, Bethancourt A (2007) The patchiness of epifoliar fungi in tropical forests: host range, host abundance, and environment. *Ecology* 88:575–581.
- Larignon P, Fulchic R, cere L, Dubos B (2001) Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40:S336-S342.
- Leavitt GM (2003) The occurrence distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and Northern Mexico. In: ‘Proceedings of the 3rd international workshop on grapevines trunk diseases’. Christchurch, New Zealand. p. 30.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4:203-221.
- Lima JS (2010) Diversidade cultural, morfológica e patogênica de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* associados a fruteiras tropicais. Dissertação, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza CE, Brasil.
- Mohali S, Burgess TI, Wingfield MJ (2005) Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35:385-396.
- Mohali S, Slippers B, Wingfield MJ (2007) Identification of Botryosphaeriaceae from Eucalyptus, Acacia and Pinus in Venezuela. *Fungal Diversity* 25:143–165.
- Mullen JM, Gilliam CH, Hagan AK, Morgan-Jones G (1991) Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced stress or cultivar selection. *Plant Disease* 75:886-889.

- Parker KC, Sutton TB (1993) Susceptibility of Apple fruit to *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. *Plant disease* 77:385-389.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Gryzenhout M, Wingfield MJ (2004) *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50:313-322.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to Eucalyptus. *Plant Pathology* 56:624–636.
- Phillips AJL, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, Akulov A, Crous PW (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21: 29 – 55.
- Phillips AJL, Oudemans PV, Correia A, Alves A (2006) Characterisation and epitypification of *Botryosphaeria corticis*, the cause of blueberry cane canker. *Fungal Diversity* 21:141-155.
- Ponte JJ (1985) Uma nova doença da ateira (*Annona squamosa*) e da gravioleira (*A. muricata*) causada por *Botryodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira* 10:689-690.
- Ponte JJ, Athayde C, Sena CB, Vale CC, Bezerra JL (1988) Etiologia da resinose de frutíferas do gênero *Spondias*. *Fitopatologia Brasileira* 13:280-281.
- Punithalingam E (1976) *Botryodiplodia theobromae*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, n. 519. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWW, Maki CS, Araújo WL, Santos DRD, Azevedo JL (2005) Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobromae cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosus*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1:24-33.
- Slippers B, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21:90-106.
- Slippers B, Fourie G, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD, Carnegie AJ, Wingfield MJ (2004a) Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced Eucalyptus trees in Australia and South Africa. *Studies in Mycology* 50:343–358.
- Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004b) Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83–101.
- Smith DR, Stanosz GR (2001) Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorphs *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. *Mycologia* 93: 505-515.

- Smith H, Crous PW, Wingfield MJ, Coutinho TA., Wingfield, BD (2001) *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on Eucalyptus in South Africa. *Mycologia* 93: 277-285.
- Taylor JE, Hyde KD, Jones EBG (1999) Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist* 142:335–346.
- Taylor A, Hardy G, Wood P, Burgess T (2005) Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34:187–195.
- Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Voegel TM, Gubler WD (2006) Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90:1490–1503.
- Van Niekerk JM, Crous PW, Groenewald JZ, Fourie PH, Hallen F (2004) DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96:781-798.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Snisky JJ, White TJ (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego CA, USA. Academic Press.

Table 1. Botryosphaeriaceae isolates collected from tropical trees used in this study, host and origin.

| Identification | Host                             | Origin                         |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 1*             | <i>Spondias</i> sp.              | Fortaleza – Ceará              |
| 2              | <i>Ficus</i> sp.                 | Fortaleza – Ceará              |
| 3              | <i>Annona squamosa</i>           | Pacajús – Ceará                |
| 4              | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Aracati – Ceará                |
| 5              | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Terra Nova – Mato Grosso       |
| 6              | <i>Annona</i> × <i>atemoya</i>   | Limoeiro do Norte – Ceará      |
| 7              | <i>Malpighia emarginata</i>      | Pacajús – Ceará                |
| 8              | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pacajús – Ceará                |
| 9              | <i>Annona muricata</i>           | Jaguaribe – Ceará              |
| 10             | <i>Annona muricata</i>           | Fortaleza – Ceará              |
| 11             | <i>Begonia elatior</i>           | Fortaleza – Ceará              |
| 12             | <i>Spondias tuberosa</i>         | Tauá – Ceará                   |
| 13*            | <i>Persea americana</i>          | Barra do Corda – Maranhão      |
| 14             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                 |
| 15             | <i>Spondias tuberosa</i>         | Crato – Ceará                  |
| 16             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                 |
| 17             | <i>Spondias</i> sp.              | Limoeiro do Norte – Ceará      |
| 18             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Palmácea – Ceará               |
| 19             | <i>Oreodoxa oleracea</i>         | Fortaleza – Ceará              |
| 20*            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Mauriti – Ceará                |
| 21             | <i>Spondias tuberosa</i>         | Cruz – Ceará                   |
| 22             | <i>Spondias tuberosa</i>         | Maranguape – Ceará             |
| 23             | <i>Spondias mombin</i>           | Crato – Ceará                  |
| 24*            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Ipiranga – Piauí               |
| 25             | <i>Spondias purpurea</i>         | Pires Ferreira – Ceará         |
| 26             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Areia – Paraíba                |
| 27             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                 |
| 28             | <i>Spondias purpurea</i>         | Pacajús – Ceará                |
| 29             | <i>Annona muricata</i>           | Beberibe – Ceará               |
| 30             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Alto Santo – Ceará             |
| 31             | <i>Annona squamosa</i>           | Alto Santo – Ceará             |
| 32*            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Ipú – Ceará                    |
| 33             | <i>Spondias</i> sp.              | Fortaleza – Ceará              |
| 34*            | <i>Mangifera indica</i>          | Varjota – Ceará                |
| 35             | <i>Annona squamosa</i>           | Varjota – Ceará                |
| 36             | <i>Spondias mombin</i>           | Goiana – Pernambuco            |
| 37*            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Potengi – Pernambuco           |
| 38             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Beberibe – Ceará               |
| 39             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Beberibe – Ceará               |
| 40             | <i>Spondias tuberosa</i>         | Cajazeiras – Paraíba           |
| 41             | <i>Spondias purpurea</i>         | Cachoeira dos Índios – Paraíba |
| 42             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Cachoeira dos Índios – Paraíba |
| 43             | <i>Mangifera indica</i>          | Milagres – Ceará               |
| 44             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Quixeramobim – Ceará           |
| 45             | <i>Mangifera indica</i>          | Parambú – Ceará                |
| 46             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Beberibe – Ceará               |
| 47             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Alto Santo – Ceará             |
| 48             | <i>Oreodoxa oleracea</i>         | Pacatuba – Ceará               |
| 49             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Alto Santo – Ceará             |
| 50             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                 |
| 51             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Crato – Ceará                  |
| 52             | <i>Spondias</i> sp.              | Goiana – Pernambuco            |
| 53             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                 |

| Identification | Host                             | Origin                             |
|----------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 54             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Serra do Mel – Rio Grande do Norte |
| 55             | <i>Annona squamosa</i>           | Parambú – Ceará                    |
| 56             | <i>Cocos nucifera</i> L.         | Recife – Pernambuco                |
| 57             | <i>Spondias purpurea</i>         | Quixeramobim – Ceará               |
| 58             | <i>Mangifera indica</i>          | Picos – Piauí                      |
| 59             | <i>Mangifera indica</i>          | Crato – Ceará                      |
| 60             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Paracuru – Ceará                   |
| 61             | <i>Spondias mombin</i>           | Pires Ferreira – Ceará             |
| 62             | <i>Cedrella fissilis</i> V.      | Viçosa – Ceará                     |
| 63             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Guaraciaba do Norte – Ceará        |
| 64             | <i>Spondias</i> sp.              | Fortaleza – Ceará                  |
| 65             | <i>Annona squamosa</i>           | Pacajús – Ceará                    |
| 66             | <i>Cocos nucifera</i> L.         | Varjota – Ceará                    |
| 67             | <i>Annona muricata</i>           | Pio IX – Piauí                     |
| 68*            | <i>Spondias purpurea</i>         | Ipueiras – Ceará                   |
| 69*            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Serra do Mel – Rio Grande do Norte |
| 70             | <i>Spondias mombin</i>           | Mombaça – Ceará                    |
| 71             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Serra do Mel – Rio Grande do Norte |
| 72             | <i>Annona muricata</i>           | Pacajús – Ceará                    |
| 73*            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Gurupi – Tocantins                 |
| 74             | <i>Carica papaya</i>             | Paraipaba – Ceará                  |
| 75             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Serra do Mel – Rio Grande do Norte |
| 76*            | <i>Spondias mombin</i>           | Pacajús – Ceará                    |
| 77*            | <i>Malpighia emarginata</i>      | Pacajús – Ceará                    |
| 78             | <i>Annona squamosa</i>           | Limoeiro do Norte – Ceará          |
| 79             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Germinião – Piauí                  |
| 80             | <i>Araucaria angustifolia</i>    | Fortaleza – Ceará                  |
| 81*            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Quixeramobim – Ceará               |
| 82             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Viçosa – Ceará                     |
| 83             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Picos – Piauí                      |
| 84             | <i>Spondias tuberosa</i>         | Picos – Piauí                      |
| 85             | <i>Mangifera indica</i>          | Picos – Piauí                      |
| 86             | <i>Mangifera indica</i>          | Mombaça – Ceará                    |
| 87             | <i>Spondias mombin</i>           | Pio IX – Piauí                     |
| 88             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                     |
| 89             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Ipueiras – Ceará                   |
| 90*            | <i>Mangifera indica</i>          | Pio IX – Piauí                     |
| 91             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                     |
| 92             | <i>Spondias mombin</i>           | Pacajús – Ceará                    |
| 93             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                     |
| 94             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                     |
| 95             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                     |
| 96             | <i>Cocos nucifera</i> L.         | Paraipaba – Ceará                  |
| 97             | <i>Annona squamosa</i>           | Mombaça – Ceará                    |
| 98*            | <i>Spondias mombin</i>           | Pacajús – Ceará                    |
| 99             | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Barra do Corda – Maranhão          |
| 100            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Bela Cruz – Ceará                  |
| 101            | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Bela Cruz – Ceará                  |
| 102            | <i>Spondias</i> sp.              | Fortaleza – Ceará                  |
| 103*           | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Palhano – Ceará                    |
| 104*           | <i>Anacardium occidentale</i> L. | Pio IX – Piauí                     |
| 105*           | <i>Persea americana</i>          | Pio IX – Piauí                     |

\* Isolates used in pathogenicity test.

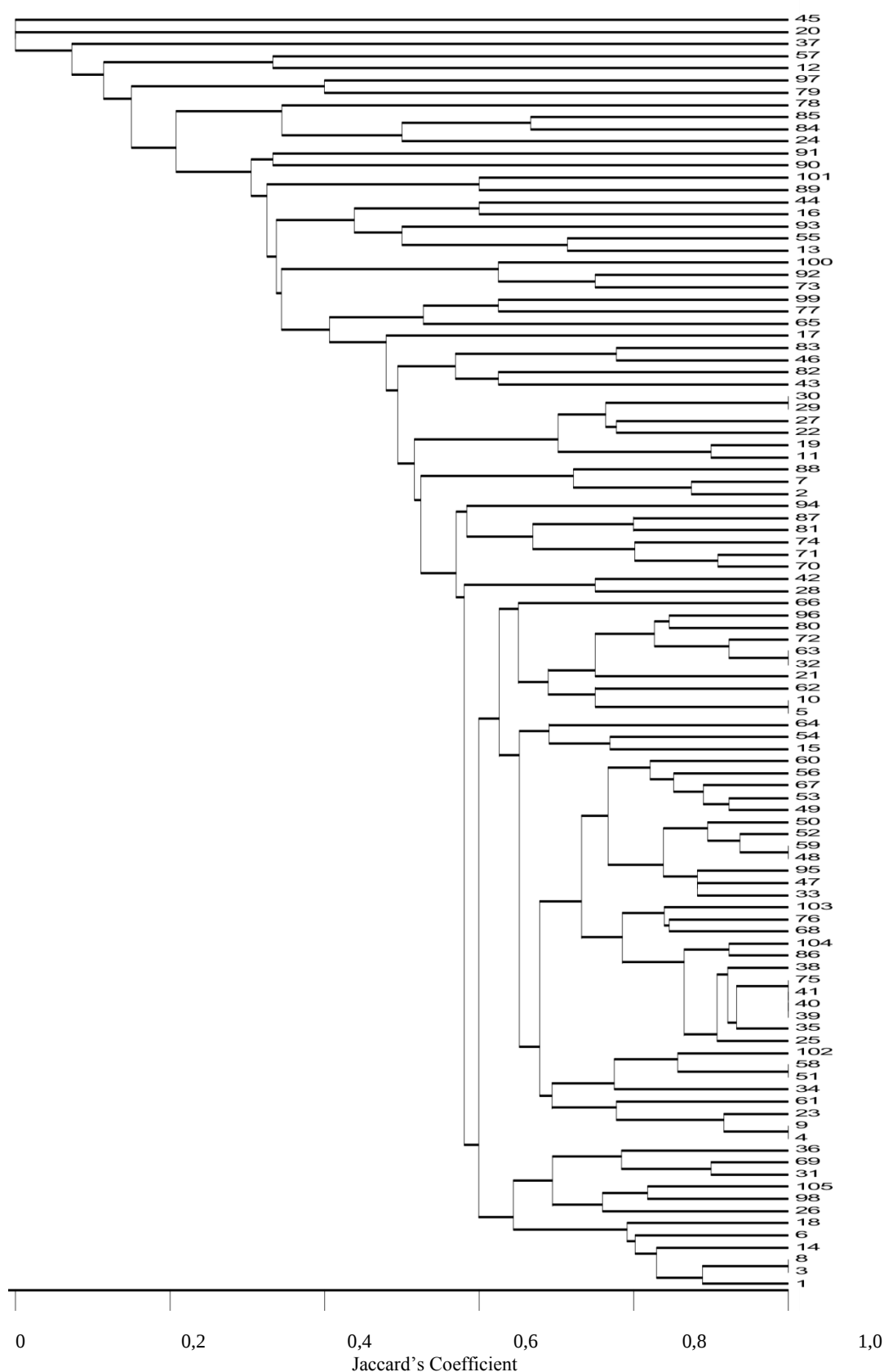


Fig. 1 – Genetic similarity among Botryosphaeriaceae isolates sampled from different hosts and sites. Dendrograma was estimated by clustering a similarity matrix (Jaccard's Coefficient) of binary random amplified polymorphic DNA data using the unweighted pair group method of arithmetic means in the MVSP program.

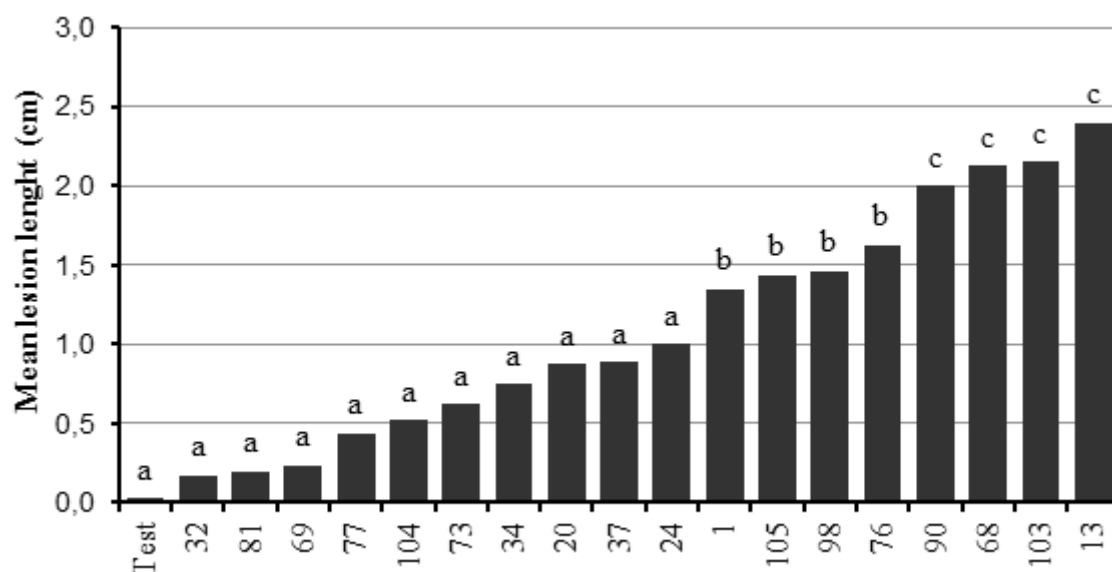


Fig. 2 – Mean lesion lengths on cashew seedlings inoculated with eighteen isolates of Botryosphaeriaceae. Means followed by different letters differ significantly ( $p > 0.05$ ) according to Scott-Knott's test. Bars represent standard error of the mean.

### **CAPÍTULO III**

#### **ESTUDO PROTEÔMICO DO FUNGO *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* AGENTE CAUSAL DA RESINOSE EM CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.)**

**Estudo proteômico do fungo *Lasiodiplodia theobromae* agente causal da resinose em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)**

José Glauber Moreira Melo<sup>1\*</sup>; Aline Kelly de Aquino Lima Cipriano<sup>1</sup>; José Emilson Cardoso<sup>2</sup>; Darcy Mayra Furtado Gondim<sup>3</sup>; José Tadeu Abreu de Oliveira<sup>1</sup>; Frederico Bruno Mendes Batista Moreno<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n - Campus do Pici, 60.020-181, Fortaleza, CE, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Sara Mesquita, 2227, 60.511-110, Fortaleza, CE, Brasil; <sup>3</sup>Universidade de Fortaleza, Avenida Washington Soares, 1321 - Edson Queiroz, 60811-905, Fortaleza, CE, Brasil.

\*Autor para correspondência: [joseglauber@yahoo.com.br](mailto:joseglauber@yahoo.com.br)

---

**RESUMO**

*Lasiodiplodia theobromae* é um fungo cosmopolita, endofítico e oportunista que ataca diversos hospedeiros, sendo considerado um grande problema na fruticultura tropical. A identificação das proteínas é um passo crucial para uma melhor compreensão das bases moleculares da sua patogenicidade, em que estas informações são de grande utilidade no melhoramento genético vegetal, bem como em estudos de manejo da doença. Diversos trabalhos sobre o referido patógeno são conhecidos, porém, nenhum estudo a nível proteômico pode ser encontrado na literatura. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de extração de proteínas fúngicas que contemple bom rendimento, solubilidade e compatibilidade com o método de eletroforese bidimensional; obter mapas bidimensionais das proteínas do fungo *L. theobromae*; além de identificar, por meio da espectrometria de massas, as proteínas diferencialmente expressas em isolados mais agressivos em comparação com os menos agressivos. Através da eletroforese bidimensional, seguida de análises por LC-ESI-Q-TOF MS/MS, foram definidos os padrões 2D do fungo em apreço na faixa de pH de 3-10. Quando o perfil eletroforético foi analisado, foi possível ainda identificar 700 spots, sendo 96 diferencialmente expressas, onde 95 spots foram exclusivos do grupo mais agressivo e somente um do grupo antagônico, onde foram identificadas 84 proteínas. Algumas proteínas expressas apenas em isolados mais agressivos têm sido descritos como fatores de virulência em outros fungos. As proteínas identificadas apenas em isolados mais agressivos são candidatos potenciais para o desenvolvimento de marcadores diagnósticos de patogenicidade, necessitando assim de maiores estudos para sua comprovação. Assim, através deste trabalho pioneiro, foi possível a caracterização preliminar do perfil proteico do fungo *L. theobromae*, obtendo-se alguns indícios dos mecanismos envolvidos em sua agressividade.

**Palavras-chave:** proteômica, fungo, eletroforese bidimensional, Botryosphaeriaceae.

---

## ABSTRACT

*Lasiodiplodia theobromae* is a cosmopolitan and opportunistic endophytic fungus that attacks many hosts and is considered a major problem in tropical fruit production. The identification of proteins is crucial for a better understanding of the molecular basis of pathogenicity, as this information is very useful in plant breeding step, as well as in studies of disease management. Several papers on the said pathogen is known, however, no studies to proteomic level can be found in the literature. Thus, the aim of this study was to establish a protocol for extraction of fungal proteins that includes good yield, solubility and compatibility with the method of two-dimensional electrophoresis; obtain two-dimensional maps of proteins from fungus *L. theobromae*, besides identifying, through spectrometry mass, proteins differentially expressed in more aggressive isolates in comparison with the less aggressive. By two-dimensional electrophoresis, followed by analysis by LC - ESI - Q - TOF MS / MS, 2D patterns of the fungus in question in the pH range of 3-10 were defined. When the electrophoretic profile was analyzed, it was still possible to identify 700 spots, 96 differentially expressed, where 95 spots were exclusive to the more aggressive group and only one of the antagonistic group, where 84 proteins were identified. Some proteins expressed only in the most aggressive isolates have been described as virulence factors in other fungi. Proteins identified only in the most aggressive isolates are potential candidates for the development of diagnostic markers for pathogenicity, thus requiring further studies for verification. Thus, through this pioneering work, it was possible preliminary characterization of the protein profile of the fungus *L. theobromae* give some indication of the mechanisms involved in their aggressiveness.

**Key words:** proteomic, fungi, two-dimensional electrophoresis, Botryosphaeriaceae.

---

## 1. INTRODUÇÃO

Entre os fitopatógenos, há uma grande variedade de mecanismos de patogênese capaz de se adaptar a determinados hospedeiros. Alguns patógenos têm a capacidade de infectar a planta inteira, enquanto outros, apenas tecidos específicos como folhas, raízes, sementes e estruturas florais ou órgãos. Além disso, a maioria dos patógenos - incluindo quase todos os biotróficos e necrotróficos - só pode infectar uma ou algumas espécies de plantas, alguns são ainda mais específicos, infectando apenas um subconjunto de genótipos vulneráveis dentro da mesma espécie (GIBSON *et al.*, 2011).

Devido às próprias defesas da planta, é necessário que o patógeno tenha a capacidade de degradar as paredes celulares de seus hospedeiros rapidamente, a fim de penetrar nos tecidos e assim, obter os nutrientes necessários para crescer e se reproduzir (HEMATY *et al.*, 2009).

Assim, torna-se de grande importância, compreender os mecanismos de patogenicidade dos patógenos, a fim de permitir o desenvolvimento de métodos eficientes para a proteção de culturas, quer por melhoramento genético quer pelo uso de fungicidas ou metodologias de controle biológico. As estratégias de virulência de fungos em plantas exigem uma grande atenção devido ao seu impacto sobre a produção de plantas e, portanto, a economia do mundo (BERG, 2009; GONZÁLEZ-FERNANDEZ; JORRIN-NOVO, 2012).

Fungos patogênicos são os principais patógenos de plantas, causando perdas significativas de culturas economicamente importantes. Uma melhor compreensão da biologia dos fungos, sua patogenicidade e as interações planta-patógeno, torna-se necessário para um eficiente esquema de manejo da doença (BREGAR *et al.*, 2013).

Provavelmente, nenhum outro microrganismo represente uma maior ameaça à fruticultura no nordeste do que o fungo *L. theobromae*, pelo seu caráter destrutivo dos sintomas por ele provocados, além da sua disseminação assintomática através de sementes, propágulos vegetativos e porta-enxertos (CARDOSO *et al.*, 1998).

*Lasiodiplodia theobromae* é um fungo cosmopolita, polífago e oportunista, com pouca especiação patogênica e, por conseguinte, é geralmente associado a processos patogênicos em plantas estressadas e submetidas a ferimentos naturais ou provocados por insetos, pássaros, primatas nativos e pelo próprio homem, através de práticas culturais (PUNITHALIGAM, 1976).

O controle das doenças causadas por este fungo é complicado, em virtude de ampla variedade de hospedeiros cujo controle químico, por si só, não oferece proteção nem controle curativo da cultura afetada, sendo então, indicada uma série de medidas adicionais, como os manejos culturais e genéticos (PEREIRA *et al.*, 2006).

Portanto, a introdução de novas estratégias de controle dessas doenças, torna-se de fundamental importância para o manejo das culturas. Para tanto, a identificação da origem do inóculo primário, a determinação dos níveis críticos de danos à fisiologia e à produção, além da identificação dos produtos gênicos da interação patógeno/hospedeiro constituem informações essenciais para a definição de medidas de manejo integrado das fitomoléstias causadas por *L. theobromae* (MESQUITA, 2007). Visando alcançar estes objetivos, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas fisiológicas, bioquímicas e moleculares sobre a interação patógeno-hospedeiro.

A ausência de informações sobre a caracterização do proteoma de fungos e a sua abundância relativa de proteínas, significa que a maior parte da investigação realizada neste domínio é ainda focada na otimização do processo de extração de proteínas, bem como, no estabelecimento de informações sobre os tipos e quantidades relativas de proteínas presentes em fungos (DOYLE, 2011; LAKSHMAN *et al.*, 2008).

O surgimento da proteômica está diretamente relacionado à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica e seus impactos no metabolismo celular. Neste aspecto, a proteômica pode gerar informações importantes tais como, determinar quais proteínas são expressas, o seu nível e o momento de sua expressão, as modificações pós-traducionais, suas respostas expressas pelas células em diferentes situações ou tratamentos (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007).

Os avanços na proteômica dos fungos vêm aumentando nos últimos anos, buscando um melhor entendimento de sua infecção em tecidos vegetais, sua natureza patogênica, além do potencial biotecnológico das enzimas fúngicas para a produção de biocombustíveis (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

Segundo Mesquita (2007), a análise proteômica de extratos obtidos de fungos, irá facilitar a identificação dos produtos dos “genes de virulência”, o que certamente contribuirá intensamente na elucidação e eficácia para escolha dos melhores genótipos de tais plantas. Estes genes por sua vez, poderão ser usados na construção de plantas resistentes ao patógeno.

Alterações no nível de expressão de proteínas podem ser detectadas entre duas ou mais condições biológicas relevantes. Além disso, isoformas proteicas podem ser separadas com acurácia, onde a massa molecular e o ponto isoelétrico são estimados. Em contrapartida, cabe citar as limitações da técnica em resolver proteínas hidrofóbicas, haja vista a necessidade de protocolos específicos para a solubilização de tais proteínas (ROGOWSKA-WRZESINSKA *et al.*, 2013).

A análise proteômica, definida como a avaliação global de proteínas celulares expressas em um estado biológico particular, é uma ferramenta poderosa que pode proporcionar uma compreensão sistemática de eventos no molecular nível. Estudos de proteômica de fungos filamentosos apenas recentemente começaram a aparecer na literatura, apesar da prevalência destes organismos na indústria biotecnológica, bem como a sua importância como fitopatógenos (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007). Análise proteômica também está sendo usado para desenvolver a compreensão sistemática de fatores de virulência em fungos patogênicos.

De acordo com Moura *et al.* (2014), dentre as diversas abordagens aplicáveis para análise proteômica, a separação de proteínas por meio da Eletroforese Bidimensional (2D) e subsequente identificação por Espectrometria de Massas (MS) combinada com ferramentas de bioinformática vem sendo as estratégias mais empregadas no estudo do proteoma.

A espectrometria de massas (MS) revelou-se uma técnica útil e confiável para a identificação de marcadores metabólicos que podem caracterizam organismos ao nível específico mostrando pequenas variações morfológicas e genéticas, incluindo vírus, bactérias e fungos (MANCINI *et al.*, 2013). Ao contrário dos métodos baseados em DNA, esta técnica distingue metabólitos

fenotipicamente funcionais do organismo alvo, incluindo aqueles envolvidos em interações patógenos-hospedeiro (HUANG et al. 2010).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica bastante abrangente, apresenta acurado grau de sensibilidade, em combinação com a rapidez da análise em identificar a massa molecular a partir da razão entre a massa e a carga das moléculas ionizadas ( $m/z$ ) (CUNHA et al., 2006). Geralmente um espectrômetro é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. A conjugação de analisadores em sequência (MS/MS) tem permitido a fragmentação dos peptídeos tripticos, possibilitando determinar sua sequência de aminoácidos. Sua principal desvantagem está na dificuldade de interpretação dos espectros e de distinção entre os aminoácidos isobáricos (CUNHA et al., 2006; CANTÚ, 2007).

A proteômica, em virtude de sua capacidade de produzir informações definitivas sobre a identidade da proteína, localização, modificação pós-tradução, tornou-se um componente integral de tudo em grande escala, além de sistemas de abordagens para a compreensão da rica complexidade da bioquímica de fungos.

O estudo em apreço tem como hipótese, verificar se há expressão proteica diferencial de isolados do fungo *L. theobromae* mais e menos agressivos, em relação à infecção em mudas de cajueiro.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de extração de proteínas do fungo *L. theobromae*, que contemple bom rendimento, solubilidade e compatibilidade com o método de eletroforese bidimensional, além de obter mapas bidimensionais das proteínas do referido fungo, verificar e identificar proteínas diferencialmente expressas entre isolados mais e menos agressivos do fungo em relação à infecção em mudas de cajueiro.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção do material fúngico**

Para o estudo proteômico de *L. theobromae* foi realizado previamente um teste de agressividade do fungo em mudas de cajueiro utilizando os clones BRS 226 e BRS 265, resistente e susceptível ao fungo, respectivamente. Para tanto, 18 isolados de *L. theobromae* oriundos de diferentes hospedeiros, foram utilizados neste teste. Obtiveram-se três grupos de agressividade, sendo um grupo altamente agressivo, um 2º grupo, com agressividade intermediária, e um último, onde praticamente não havia sintomas de infecção, ou seja, pouco agressivo. Para a realização da análise proteômica, foram utilizados os dois grupos extremos, em relação a sua agressividade, um isolado mais agressivo (isolado LT-13) e o outro isolado menos agressivo (isolado LT-81), sendo

então chamados de grupo I e grupo II, respectivamente. Visando uma maior representatividade, dois isolados de cada grupo foram selecionados.

## **2.2. Cultivo dos fungos**

Os isolados foram cultivados inicialmente em placas de petri em meio estéril contendo batata-dextrose-ágar (BDA). Após 10 dias, procedeu-se a repicagem dos isolados em BDA até a obtenção de culturas puras. Seguidos mais sete dias, realizou-se uma nova repicagem, agora para erlemeyers em meio de cultivo líquido contendo batata-dextrose (BD) com a finalidade de formar mantas dos fungos, para a extração de suas proteínas. As mantas adquiriam maturação com aproximadamente 10 dias, quando estas apresentavam coloração acinzentada, que lhe é característica. Após o crescimento dos isolados em meio líquido, suas mantas lavadas com água ultrapura, secadas ao ar livre em temperatura ambiente e em seguida, liofilizadas durante 48 horas.

## **2.3. Estabelecimento de protocolo de extração de proteínas de *L. theobromae* para análise proteômica**

Os materiais fúngicos obtidos após a liofilização foram pulverizados utilizando almofariz e pistilo, onde foi adicionado nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Para a extração proteica, foram adicionados 350g dos materiais em tubos tipo Falcon de 15 ml e lavados por duas vezes em solução salina (NaCl 0,9%) da seguinte forma: adicionou-se 3ml da solução salina misturando cuidadosamente nas amostras obtidas por maceração, seguido de homogeneização em vórtex por 30 seg. e centrifugados a  $16.000 \times g$  por 2 min. O sobrenadante foi removido e o material resultante foi utilizado para extração de proteínas. Foram testados quatro diferentes métodos de extração de proteínas com o intuito de se definir a melhor metodologia buscando obter um bom rendimento e solubilidade. As análises eletroforéticas e as comparações entre os quatro métodos de extração de proteínas para o fungo *L. theobromae* foram realizadas tendo como referencial o isolado LT-81, causador da resinose em cajueiro.

A quantificação de proteínas, o perfil de bandas proteicas formadas no gel unidimensional, bem como o padrão proteico nos géis bidimensionais foram os parâmetros utilizados, buscando determinar o melhor método de extração de proteínas para o fungo *L. theobromae*, sendo este usado no prosseguimento dos trabalhos. Os métodos testados estão descritos a seguir. As extrações foram realizadas em triplicata.

### 2.3.1. Método 1: Precipitação com solução de acetona, TCA e 2-ME

Este método foi baseado no descrito por Gondim (2010) com algumas alterações. Nas amostras foram adicionadas 7 ml da solução TCA:2-ME (100%:10%:2%) e homogeneizadas por 1 h em vórtex a 4°C, em seguida armazenadas a -80°C por 2 h. Após centrifugação (15.000 x g, 20 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante, lavado por duas vezes usando 6 ml de acetona : 2-ME (100%:2%) e homogeneizado em vórtex por 15 min a 4°C, seguido de centrifugação a 15.000 x g por 20 min a 4°C. O precipitado resultante foi deixado *overnight* a -20°C para secagem em sílica gel.

As proteínas foram extraídas em 3,5 ml de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,65, contendo 30% de sacarose, 2% de SDS, 1 mM de PMSF, 2% de 2-ME e 10% de PVPP. A amostra foi homogeneizada por 1 h a 4°C em vórtex e centrifugada a 15.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C. Ao precipitado restante, adicionou-se 2 ml do tampão Tris-HCl, seguido de homogeneização por 30 min a 4°C, centrifugação a 15.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao material inicialmente coletado para prosseguir a extração.

Um volume igual de reagente Tris-Fenol com pH 8,0 (Across Organics, USA) foi adicionado ao material coletado anteriormente. A suspensão foi agitada por 15 min a 4°C. Após centrifugação (10.000 x g a 4°C por 10 min) a fase fenólica superior foi coletada e re-extraída com 1 ml da solução de extração Tris-Fenol, sendo o material agitado por 10 min a 4°C, seguido de centrifugação (10.000 x g a 4°C por 10 min).

Posteriormente as proteínas presentes na fase fenólica foram precipitadas em quatro volumes de 0,1M de acetato de amônio em metanol, permanecendo o material em repouso por 1 h a -80°C. Após centrifugação (15.000 x g a 4°C por 30 min) o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 0,1M de acetato de amônio em metanol gelado e em seguida, duas vezes com acetona gelada 80%. Entre cada lavagem o precipitado foi armazenado a -20°C por 20 min e a suspensão centrifugada a 15.000 x g a 4°C por 10 min. O precipitado foi deixado para secar em sílica gel durante *overnight* a 4°C.

O material foi ressuscitado com 300 µl da solução uréia:tiouréia:chaps (7M:2M:2%) por agitação a 120 rpm por 10 min seguido de sonicação por 10 min a temperatura ambiente. Após 20 min de repouso à mesma temperatura, procedeu-se uma nova centrifugação (10.000 x g a 4°C por 10 min). O sobrenadante foi coletado em um novo microtubo e armazenado a -20°C. Adicionou-se mais 100 µl da solução uréia:tiouréia:chaps (7M:2M:2%) ao precipitado e repetiu o passo anterior até coletar um novo sobrenadante e adicionar ao já obtido, armazenando-o a -20°C. Este material foi utilizado para dosagem de proteínas (Método 1).

### 2.3.2. Método 2: Precipitação com TCA/acetona

Este método é uma modificação do protocolo descrito por Isola *et al.* (2011). Cerca de 350 mg do material fúngico foi transferido em um tubo tipo Falcon de 15 ml e adicionado 5 ml de solução gelada contendo TCA (Sigmae Aldrich, Steinheim, Alemanha), 10% (v/v) em acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha), homogeneizadas em vórtex a 4°C por 10 min e incubadas *overnight* a -20°C.

Após centrifugação (10.000 x g a 4°C por 30 min), o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 2 ml de acetona 80%. Após nova centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4°C, descartou-se novamente o sobrenadante e procedeu-se a ressuspensão do precipitado, adicionando 1 ml do tampão uréia:tiouréia:chaps (7%:2%:4%). O precipitado obtido após centrifugação (10.000 x g a 4°C por 30 min) onde se coletou o sobrenadante que foi transferido para um novo mibrotubo, onde este material foi armazenado a -20°C sendo utilizado para dosagem de proteínas (Método 2).

### 2.3.3. Método 3: Precipitação com Tris-fenol

Este método é uma variação do protocolo descrito por Tesei *et al.* (2012). Adicionou-se 3 ml de fenol tamponado com solução de Tris pH 8,0 (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, EDTA 5 mMm KCl 100 mM, 1% PVPP, 30% de sacarose) (Sigmae Aldrich, Steinheim, Alemanha) a cada amostra, num tubo tipo Falcon de 15 ml.

Após uma homogeneização em vórtex por 10 min a 4°C seguida de centrifugação a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C o sobrenadante foi coletado e transferido para um microtubo e armazenado a -20°C. Ao precipitado, foram adicionados mais 1,5 ml do tampão Tris-HCL, seguido de nova homogeneização e centrifugação visando coletar o sobrenadante e somar ao já coletado.

A este material foi adicionado 3 ml de Tris-fenol pH 8,0, visando a extração fenólica. A suspensão foi homogeneizada por 15 min a 4°C e centrifugada (10.000 x g a 4°C por 10 min) e a fase fenólica (superior) foi transferida para um novo microtubo, sendo adicionado 5 vezes o volume de acetato de amônio 0,1 M (gelado) em metanol.

Após precipitação *overnight* a -80°C, o pellet da proteína foi obtido por centrifugação a 10.000 x g por 30min a 4°C. Depois de lavá-lo com 2 ml de metanol (absoluto) gelado procedeu-se com nova lavagem, agora com 1 ml de acetona gelada (80% v/v). Entre cada lavagem, seguia-se uma centrifugação (10. 000 x g por 30min a 4°C). O pellet foi ressuspensionado em 200 µl do tampão uréia:tiouréia:chaps (7%:2%:4%) e armazenado a -20°C. O material resultante da extração foi utilizado para dosagem das proteínas (Método 3).

#### **2.3.4. Método 4: Precipitação com TCA**

Este método é denominado “extração com TCA”, foi descrito por Isola *et al.* (2011), com algumas modificações. Em um tubo tipo Falcon de 15 ml, 350 mg do material fúngico foi homogeneizado com 3 ml do tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM NaCl) durante 5 min a 4°C seguido de centrifugação (16.000 x g a 4°C por 10 min), o sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Falcon de 15 ml.

Adicionou-se TCA gelado, para obter uma concentração final de 20% (v/v). A amostra foi armazenada por 30 min a -20°C. Após centrifugação (10.000 x g a 4°C por 20 min), o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado três vezes com 1 ml de acetona gelada 80%, sendo o material transferido para um microtubo de 1,5 ml. Após cada ciclo de lavagem com acetona, o pellet de proteínas foi coletado por centrifugação (10.000 x g a 4°C por 2 min). Depois de lavado, o pellet foi secado à vácuo por 20 min e em seguida ressuscitado em 500 µl do tampão uréia:tiouréia:chaps (7%:2%:4%) e armazenado a -20°C. O material resultante da extração foi utilizado para dosagem das proteínas (Método 4).

#### **2.4. Dosagem de proteínas**

O teor de proteínas totais no extrato foi determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976), onde 2,5 mL do reagente Bradford foram adicionados a alíquotas de 0,1 mL dos extratos totais. Após 10 min de repouso, a absorbância foi determinada a 595 nm em espectrofotômetro (Novaspec III, Pharmacia). Albumina sérica bovina foi utilizada para obtenção de uma curva padrão e definição do fator de correção, necessário para determinar o teor de proteínas solúveis nos extratos. A dosagem foi realizada utilizando triplicatas de cada amostra, onde se obteve uma média do teor de proteínas totais. Os resultados da quantificação proteica foram avaliados, tanto por meio da dosagem das proteínas, como em eletroforese SDS-PAGE unidimensional.

#### **2.5. Eletroforese unidimensional**

Para a preparação do gel unidimensional, visando verificar a distribuição das proteínas, utilizou-se em um volume total de 25 µL, onde quantidades iguais de extrato de proteína (4 mg) foram adicionados ao tampão de amostra de SDS que consiste em 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, glicerol 85%, 10% (m/v) de SDS e 0,1% de azul de bromofenol. As amostras foram incubadas durante 10 min a 90°C, agitadas a 500 rpm usando um *Thermomixer* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e carregados para um gel pré-fundido de Tris-Glicina 4-20% de 1,0 milímetros com 12 poços (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A corrida foi realizada em 125 V e 13 mA. Um *ladder* padrão

de proteínas de 4-20% de Tris-Glicina SDS-PAGE (Fermentas, Vilnius, Lituânia) foi usado como marcador e as bandas de proteínas foram visualizadas por coloração com prata (RABILLOUD, 1992 apud ISOLA *et al.*, 2011).

## 2.6. Análise proteômica diferencial de isolados de *L. theobromae*

A análise proteômica da expressão diferencial de proteínas entre os isolados de *L. theobromae* mais e menos agressivos foi realizada por meio da eletroforese bidimensional. Foram utilizadas seis repetições de cada grupo de fungos.

A eletroforese bidimensional consiste inicialmente na separação das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por meio de focalização isoelétrica. Foram utilizadas fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) de 13 cm, com pH 3-10 (GE Healthcare). As amostras proteicas foram solubilizadas em solução de rehidratação [uréia 7M, tiouréia 2M, DTT 65 mM, CHAPS 2% (m/v), tampão IPG 2% (v/v) e azul de bromofenol 0,02 %] durante 16 h em cubas de reidratação (Reswelling Tray II, Pharmacia Biotech). Em seguida as fitas reidratadas foram submetidas à separação isoelétrica utilizando a seguinte programação: 200 V (Stp) por 45 min; 500 V (Stp) por 45 min; 1000 V (Grd) por 30 min; 1000 V (Stp) por 30 min; 5000 V(Grd) por 30 min; 5000 V (Stp) por 30 min; 8000 V até atingir 18000 Volts/hora.

Após a focalização isoelétrica, as fitas foram equilibradas sob agitação lenta por 20 min em solução de equilíbrio e redução [Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30% (v/v), ureia 6 M, SDS 2% (m/v), DTT 2% (m/v) e azul de bromofenol], sendo posteriormente lavadas com solução de alquilação [Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glicerol 30% (v/v), ureia 6 M, SDS 2% (m/v), iodoacetamida 2,5% (m/v) e azul de bromofenol] por 20 min, sob leve agitação.

A 2ª dimensão (SDS-PAGE) foi realizada em gel vertical homogêneo (14 x 14 cm) por meio da fixação das fitas focalizadas sobre o gel de poliacrilamida, utilizando solução de agarose 0,5% (m/v). A separação das proteínas, de acordo com suas massas moleculares, foi realizada a 5°C, por uma fonte Power-Pac 300 (Bio-Rad). A corrida foi composta de duas etapas: 15 mA/gel durante 30 min e 25 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel o que ocorreu aproximadamente 5h após o início. As proteínas foram visualizadas com Comassie Brilliant Blue Coloidal (CANDIANO, 2004). As imagens dos géis com proteínas coradas foram obtidas por meio do ImageScanner (Amersham Biosciences) e analisadas pelo programa LabScan v. 5.0 (GE Healthcare). As imagens dos géis foram processadas e analisadas utilizando o software PD-Quest versão 7.3.1 (Bio-Rad, EUA). Para tanto, as etapas de processamento da imagem incluíram filtração da imagem, detecção dos *spots* e quantificação da intensidade, além da eliminação de

*back-ground*. Os mapas bidimensionais foram avaliados como um conjunto único, representado por um gel de referência (gel máster) gerado a partir dos demais mapas experimentais.

Assim, os *spots* consistentemente presentes nos géis remanescentes foram adicionados ao gel máster, de modo que pudessem ser combinados para todas as amostras. Além disso, a massa molecular (kDa) de cada proteína foi estimada utilizando um conjunto padrão de marcadores, enquanto os pontos isoelétricos foram determinados pelas posições do *spot* ao longo das tiras com o gradiente de pH imobilizado. Em seguida, todos os *spots* marcados nos géis pelo PD-Quest foram avaliados quanto à presença/ausência nos dois grupos estudados, onde a presença de um *spot* foi determinada quando o mesmo aparecia em pelo menos três repetições num mesmo grupo e na ausência total em qualquer repetição no grupo antagônico.

## **2.7. Visualização das proteínas e análise de imagens**

As proteínas foram visualizadas com o corante Coomassie Brilhante Blue G coloidal (CBB) (Sigma). Os géis foram fixados durante 1 h [40% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético], sendo coradas durante 1 h na mesma solução contendo 0,5% (p/v) de CBB coloidal e corado novamente durante a noite em uma solução contendo [50% (v / v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético]. As imagens dos géis foram digitalizadas com o software Image Master<sup>®</sup> (GE Healthcare) e analisadas com o software PD-Quest<sup>™</sup> (Bio-Rad) usando o critério de presença/ausência de spots, em que a presença foi determinada quando um spot aparecia em pelo menos três repetições por grupo analisado e em nenhuma repetição no grupo antagônico. Todos os dois tratamentos com suas seis repetições foram analisados simultaneamente.

Depois da detecção dos *spots*, os géis foram combinados uns com os outros e se fundiram em um gel máster que contém os *spots* encontrados em todos os géis analisados. A comparação do gel máster com os outros géis dos tratamentos permitiu a visualização de *spots* diferencialmente expressos.

## **2.8. Processamento dos *spots*, espectrometria de massas e identificação de proteínas diferencialmente expressas**

A identificação dos *spots* de interesse foi realizada usando espectrometria de massas. Os *spots* foram excisados manualmente a partir dos géis corados com CBB coloidal, sendo então descorados e digeridos com tripsina (Promega, Madison, WI, USA), conforme descrito por Shevchenko *et al.* (1996). Os *spots* excisados foram descorados com 400 µl de 25 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (m/v) e acetonitrila (ACN) 50% (v/v) até a remoção completa do corante. Posteriormente, o material resultante foi desidratado com 200 µl de ACN 100% por 5 min e então,

secas a vácuo utilizando o equipamento “Speed Vac” (Savant, Thermo Scientific, USA) por 15 min a 30°C. As porções de gel secas foram incubadas com tripsina grau sequenciamento (20 ng/μL em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM) a 37 °C em banho-maria por 17 h. Os peptídeos tripsinizados foram extraídos de cada *spot*-gel com 30 μl da solução de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM (m/v), ACN 50% (v/v) e ácido trifluoracético 5% (v/v), com auxílio de vórtex a 90 rpm por 30 min. O sobrenadante foi coletado para um novo microtubo. Esta etapa foi repetida uma vez. Os sobrenadantes contendo os peptídeos tripticos extraídos foram então centrifugados e concentrados em “Speed Vac”.

Os peptídeos secos foram dissolvidos em solução de ácido fórmico 1% (v/v) e posteriormente submetidos à análise por espectrometria de massas. Análises de MS/MS foram realizadas em um espectrômetro de massas caracterizado por uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), dois analisadores de massas - um quadrupolo (Q) associado a um tubo no qual se mede o tempo de voo dos íons (TOF) e um detector de íons. Um sistema de cromatografia de líquida de ultra performance - UPLC (Waters, Milford, USA) foi acoplado *on-line* ao ESI-Q-TOF. Os peptídeos foram separados em uma coluna capilar nano - C18 (75 μm ID) por eluição, com um gradiente de água - ACN contendo 0,1% de ácido fórmico.

Os espectros de massas resultantes (.raw) foram coletados e processados utilizando o programa ProteinLynx Global Server 2 (Waters Co.), sendo posteriormente convertidos para arquivos de micromassa (.pkl). Esses arquivos foram carregados no programa Mascot v.2.2 (Matrix Science) para a confirmação da identidade das proteínas em pesquisa de sequências contra o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

As buscas de dados foram conduzidas com os seguintes critérios: tolerância de, no máximo uma perda de clivagem para peptídeos semi-trípticos, carbamidometilação de cisteína, possível oxidação de metionina, tolerância do peptídeo de 0,2 Da e tolerância de MS/MS de 0,2 Da. Os peptídeos foram considerados identificados quando o valor do escore excedeu valor limiar de extensa homologia ou identidade calculado pelo Mascot. As buscas por homologia foram realizadas contra o banco de dado proteico do NCBI escolhendo como limitação taxonômica *Fungi taxa*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estabelecimento de protocolo de extração de proteínas do fungo *L. theobromae* para análise proteômica

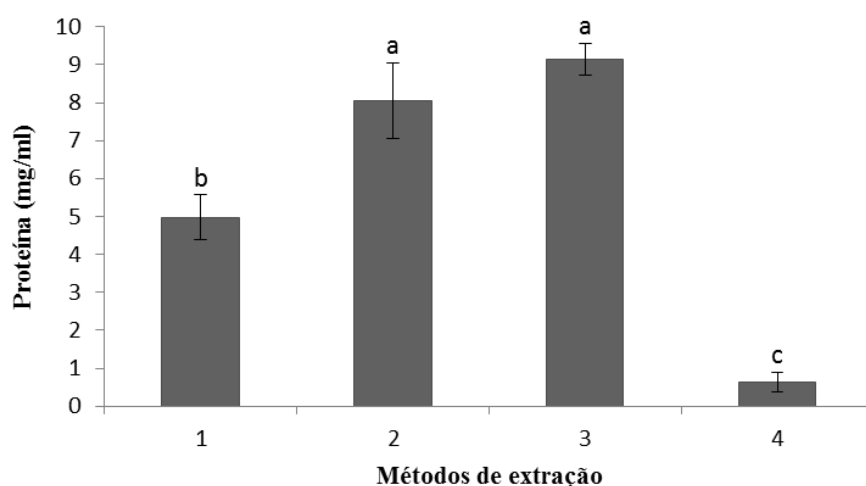
Com o objetivo de avaliar os marcadores protéicos que confirmam a agressividade do fungo *L. theobromae* em mudas de cajueiro, foi definido um protocolo de extração de proteínas do fungo compatível com eletroforese bidimensional.

Inicialmente, foi avaliado o teor de proteínas totais do fungo para cada método testado. O conteúdo de proteínas variou bastante entre os diferentes protocolos avaliados. Para os métodos 1, 2, 3 e 4, os valores encontrados foram, respectivamente, 4,97, 8,05, 9,13 e 0,64 mg de proteínas / mL do extrato (figura 1).

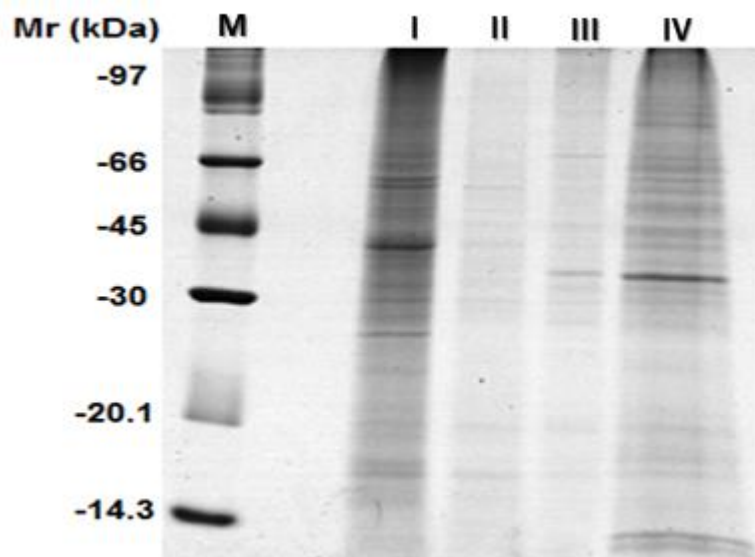
De acordo com os dados apresentados, o método “4” apresentou resultados bem abaixo dos demais, não contendo uma quantidade mínima necessária para a preparação das amostras para os géis bidimensionais, sendo então este método descartado. O mesmo ocorreu com o método “2”, que apesar de apresentar altos teores de proteínas, o seu extrato proteico estava bastante contaminado, sua coloração apresentava-se bastante turva, sendo este método também descartado.

Um gel SDS-PAGE foi realizado no intuito de verificar a eficácia dos diferentes protocolos conforme pode ser visto na figura 2. O método “2” apresentou pouca separação das bandas (ou seja, proteínas), fato este que pode ter sido causado pelas contaminações que se observou no seu extrato proteico. Já o método “4”, mesmo apresentando uma separação razoável das proteínas, pelos motivos já descritos, ou seja, uma ínfima quantidade de proteínas, não foi utilizado para a preparação dos géis 2-D-PAGE.

**Figura 1** - Teor de proteínas totais extraídas dos diferentes métodos para eletroforese 2-D PAGE. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ). Fortaleza, 2014.



**Figura 2** - Gel SDS-PAGE a 12,5% dos protocolos de extração de proteínas do fungo *L. theobromae*. I - marcador, II – método 1, III – método 2, IV – método 3, V – método 4. Fortaleza, 2014.



Os mapas bidimensionais mostraram diferentes perfis de proteínas para os métodos testados. A partir da análise das imagens dos géis pelo software PD-Quest foi possível detectar o número de spots para cada método testado. Foram detectados 799 e 667 spots totais nos métodos “1” e “3”, respectivamente.

Apesar de o método “1” extrair um menor conteúdo de proteínas totais, este apresentou um maior número de spots além de um melhor perfil proteico (figura 3) com ausência de arrastados e uma focalização melhor dos spots e principalmente, a facilidade de sua realização, sendo considerado o método mais adequado para a extração de proteínas de *L. theobromae*.

### **3.2. Análise proteômica de isolados de *L. theobromae* em relação ao seu nível de agressividade**

Após a determinação do melhor método para extração de proteínas, foi realizada uma análise proteômica comparativa entre os dois grupos de *L. theobromae* separados de acordo com sua agressividade (grupo I – mais agressivo e grupo II – menos agressivo) em mudas de cajueiro.

Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose, para em seguida serem liofilizados e submetidos ao processo de extração de proteínas totais utilizando o método “1” (Precipitação com solução de acetona, TCA e 2-ME).

Para cada grupo testado foi obtido um mapa bidimensional com seis géis cada, totalizando doze géis sendo em seguida, analisados quanto à ocorrência dos spots.

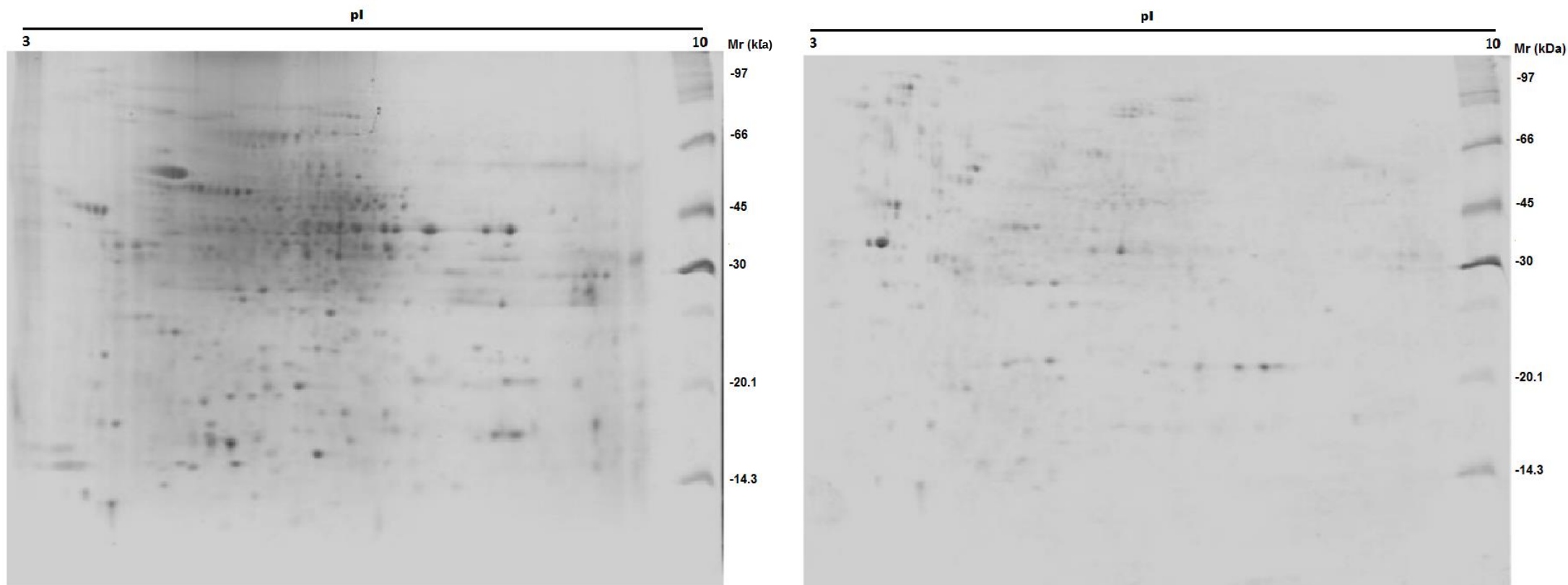
No presente estudo, apenas as diferenças qualitativas entre os perfis de expressão foram avaliadas, ou seja, a ausência ou presença de spots em um grupo de fungos. A comparação entre os perfis de expressão entre estes dois grupos revelou grandes diferenças entre os conjuntos de proteínas e/ou isoformas presentes nos grupos de fungos estudados (figura 4).

Os perfis dos géis bidimensionais dos grupos estudados estão demonstrados na figura 4. Com relação ao número total de spots, foram detectados em média,  $586 \pm 20$  spots para o grupo I e  $492 \pm 16$  spots para o grupo II. Vale ressaltar que destes spots, 491 foram detectados em ambos os grupos (figura 5). Muito embora não tenha havido grande diferença entre o número de spots entre os dois grupos, pode-se notar visualmente nos perfis proteicos dos géis a predominância de spots no primeiro grupo (figura 4).

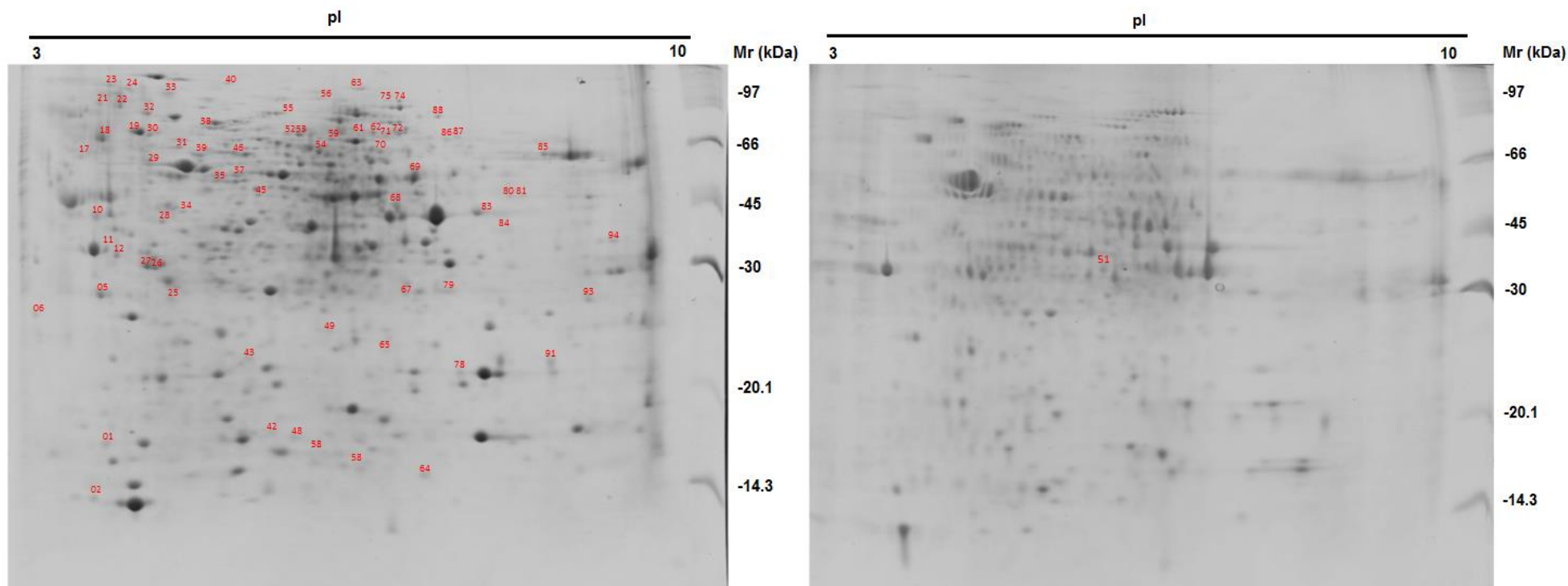
Foram identificados 96 spots diferencialmente expressos, onde 95 foram detectados nos perfis proteicos do isolado do grupo I, enquanto um único spot foi verificado como exclusivo para o grupo II. A partir destas informações, os spots foram excisados dos géis bidimensionais, digeridos com tripsina e submetidos à identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF MS/MS).

A figura 4 apresenta os spots selecionados que foram analisados. Alguns destes spots localizados em pontos próximos nos géis, como por exemplo, os spots 26=27, 57=58 e 71=72 demonstraram serem isoformas de uma mesma proteína.

**Figura 3** - Comparação dos perfis de géis bidimensionais de proteínas de *L. theobromae* extraídas por diferentes métodos. Método “1” (à esq.) e método “3” (à dir.). 250 µg de proteínas foram separadas por focalização isoeétrica em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear e visualizadas após coramento com CBB coloidal. SDS-PAGE 12,5%. Géis foram analisados pelo programa PD-Quest 7.3.1 (Bio-Rad, EUA). Fortaleza, 2014.



**Figura 4** - Perfil dos géis bidimensionais de proteínas extraídas de *L. theobromae* pelo método “1” dos isolados mais agressivos – grupo I (à esq.) e menos agressivos – grupo II (à dir.), separados em gel de acrilamida a 12,5%. 250 µg de proteínas foram separadas por focalização isoeétrica em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear e visualizadas após coramento com CBB coloidal. SDS-PAGE 12,5%. Géis foram analisados pelo programa PD-Quest 7.3.1 (Bio-Rad, EUA). Os spots analisados por MS/MS estão identificados por números. Fortaleza, 2014.



Dentre os 96 spots selecionados para análise por Espectrometria de Massas (MS), 84 apresentaram similaridade com sequências já depositadas no banco de dados do NCBI. Porém, conforme citado anteriormente, alguns spots de números diferentes, pertencentes a regiões coincidentes nos diferentes géis representam, na verdade, o mesmo spot.

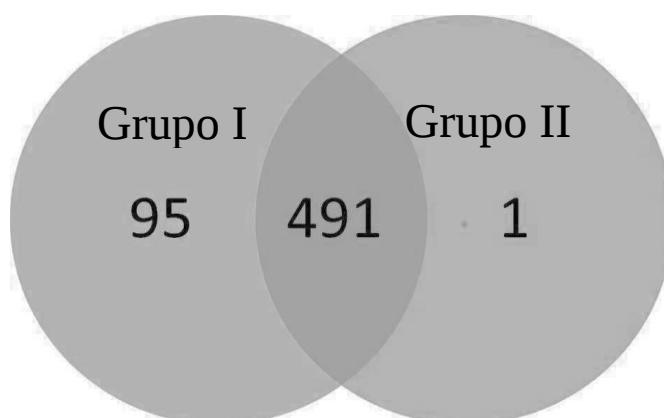
As proteínas identificadas foram organizadas na tabela 1, conforme a análise da similaridade com outras sequências de proteínas já depositadas no NCBI (banco de dados para pesquisa em bioinformática). Na tabela constam: número do spot, número de acesso no banco de dados, identidade das proteínas, organismo de referência, os valores de ponto isoelétrico e massa molecular (experimentais e teóricos), escore e a cobertura da sequência.

De modo geral, é válido mencionar a diversidade de proteínas diferencialmente expressas envolvidas em vias de resposta ao estresse, sinalização celular, defesa e resistência à doença e manutenção da homeostase redox, considerando a importância desses processos durante a interação planta-patógeno. Nesse contexto, algumas proteínas devem ser citadas.

Diversas outras proteínas merecem destaque, dentre elas, *alpha-mannosidase*, *ATP synthase*, *fungus lignin peroxidase*, *peptidyl-prolylcis-trans isomerase*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *glycoside hydrolase*, *heat shock protein*, *pathogenesis associated protein*, *peptidase*, *NADH:ubiquinone oxidoreductase 75kDa*, *glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*, *succinyl-CoA synthetase* e a *Thioredoxin*. As demais proteínas identificadas constam na tabela 1.

Quanto à identificação geral das proteínas, vale ressaltar o spot 64, identificado como uma glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (DAPDH), tendo como organismo de referência, o próprio fungo *L. theobromae*. Trata-se de uma enzima responsável por catalisar um passo da glicólise, servindo para quebrar a glicose para a energia e moléculas de carbono.

**Figura 5** - Número de spots detectados em média, nos grupos avaliados. Total de spots diferenciais entre os grupos testados. Número de spots de proteínas em gel 2-D de *L. theobromae*, extraídos de isolados mais e menos agressivos. Fortaleza, 2014.



**Tabela 1** - Identificação das proteínas diferencialmente expressas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, através de análise por UPLC-ESI-Q-TOF e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi  $p < 0,05$ .

| N° do spot <sup>a</sup> | Acesso (NCBI) | Proteína                                     | Espécie                               | pI/Mr (kDa) <sup>b</sup> |            | Score <sup>c</sup> | Cobertura da sequência (%) |
|-------------------------|---------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------|--------------------|----------------------------|
|                         |               |                                              |                                       | Experimental             | Teórico    |                    |                            |
| 1                       | gi 485929592  | putative regulatory protein suaprga1 protein | <i>Neofusicoccum parvum</i>           | 3.57/16.58               | 4.18/29.27 | 67                 | 4                          |
| 2                       | gi 429857347  | guanyl-specific ribonuclease f1              | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 3.58/15.02               | 6.23/13.18 | 70                 | 10                         |
| 4                       | gi 539437474  | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3     | <i>Endocarpon pusillum</i>            | 3.63/19.13               | 4.36/10.90 | 141                | 19                         |
| 5                       | gi 407927209  | Fungal lignin peroxidase                     | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.67/36.25               | 5.22/32.85 | 86                 | 4                          |
| 6                       | gi 385302704  | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase          | <i>Dekkera bruxellensis</i>           | 3.03/26.12               | 7.56/42.19 | 76                 | 2                          |
| 10                      | gi 407928836  | Peptidase A1                                 | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.65/61.58               | 5.93/26.85 | 68                 | 5                          |
| 11                      | gi 407927242  | Glycoside hydrolase family 17                | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.74/51.93               | 4.55/32.00 | 80                 | 3                          |
| 12                      | gi 407927242  | Glycoside hydrolase family 17                | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.85/50.15               | 4.55/32.00 | 332                | 20                         |
| 13                      | gi 407928836  | Peptidase A1                                 | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.77/55.99               | 5.93/26.85 | 68                 | 5                          |
| 14                      | gi 407924694  | Peptidase A1                                 | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.80/72.91               | 4.58/41.10 | 188                | 9                          |
| 17                      | gi 407916986  | Peptidase S8/S53 subtilisin/kexin/sedolisin  | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.62/94.07               | 4.75/65.94 | 59                 | 1                          |
| 18                      | gi 485917627  | putative oxalate protein                     | <i>Neofusicoccum parvum</i>           | 3.72/104.37              | 4.57/48.87 | 157                | 13                         |
| 19                      | gi 407917126  | Thioredoxin                                  | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 4.01/106.88              | 4.68/58.42 | 373                | 14                         |
| 21                      | gi 407924694  | Peptidase A1                                 | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.72/ 127.03             | 4.58/41.10 | 118                | 5                          |
| 22                      | gi 407928836  | Peptidase A1                                 | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 3.94/130.31              | 5.93/26.85 | 77                 | 5                          |
| 23                      | gi 485926408  | putative a chain endothiapepsin              | <i>Neofusicoccum parvum</i>           | 3.80/141.75              | 5.44/42.53 | 108                | 7                          |
| 24                      | gi 485916460  | putative choline dehydrogenase protein       | <i>Neofusicoccum parvum</i>           | 4.02/138.68              | 4.68/71.34 | 76                 | 1                          |
| 25                      | gi 407929406  | Inorganic pyrophosphatase                    | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 4.50/32.98               | 5.41/22.58 | 415                | 34                         |
| 26                      | gi 356578610  | heat shock protein 70                        | <i>Alternaria alternata</i>           | 4.31/44.08               | 5.10/70.07 | 309                | 11                         |
| 27                      | gi 356578610  | heat shock protein 70                        | <i>Alternaria alternata</i>           | 4.15/45.76               | 5.10/70.07 | 299                | 12                         |
| 28                      | gi 171110     | F1-ATPase beta-subunit precursor             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>       | 4.41/58.46               | 5.71/54.89 | 135                | 10                         |
| 29                      | gi 258571577  | ATP synthase F1, beta subunit                | <i>Uncinocarpus reesii</i>            | 4.26/87.76               | 5.34/55.76 | 386                | 17                         |
| 30                      | gi 407917126  | Thioredoxin                                  | <i>Macrophomina phaseolina</i>        | 4.27/103.54              | 4.68/58.42 | 330                | 15                         |

**Tabela 1** - Identificação das proteínas diferencialmente expressas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, através de análise por UPLC-ESI-Q-TOF e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi  $p < 0,05$  (Continuação).

| N° do spot <sup>a</sup> | Acesso (NCBI) | Proteína                                                      | Espécie                          | pI/Mr (kDa) <sup>b</sup> |             | Score <sup>c</sup> | Cobertura da sequência (%) |
|-------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------|--------------------|----------------------------|
|                         |               |                                                               |                                  | Experimental             | Teórico     |                    |                            |
| 31                      | gi 407916991  | Peptidase A1                                                  | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 4.61/95.63               | 4.74/47.31  | 182                | 9                          |
| 32                      | gi 576931550  | GMC oxidoreductase                                            | <i>Bipolaris oryzae</i>          | 4.12/119.45              | 6.85/74.16  | 183                | 8                          |
| 33                      | gi 407918255  | Alpha-12-mannosidase putative                                 | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 4.51/134.55              | 4.85/91.55  | 136                | 5                          |
| 34                      | gi 407919646  | Aldose 1-epimerase                                            | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 4.67/60.91               | 4.96/34.94  | 179                | 12                         |
| 35                      | gi 116180670  | cell cycle control protein-related                            | <i>Chaetomium globosum</i>       | 5.06/76.54               | 5.01/44.85  | 186                | 8                          |
| 36                      | gi 407927250  | Succinyl-CoA synthetase beta subunit                          | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 5.19/80.12               | 5.68/48.10  | 395                | 20                         |
| 37                      | gi 494827992  | succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial | <i>Coniosporium apollinis</i>    | 5.26/76.13               | 5.69/48.28  | 234                | 10                         |
| 38                      | gi 494825843  | V-type proton ATPase catalytic subunit A                      | <i>Coniosporium apollinis</i>    | 4.76/107.26              | 5.14/66.87  | 223                | 10                         |
| 39                      | gi 407924800  | Hexokinase                                                    | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 4.87/90.25               | 5.29/45.46  | 271                | 10                         |
| 40                      | gi 407920048  | Heat shock protein Hsp70                                      | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 4.81/109.44              | 5.08/70.43  | 959                | 32                         |
| 41                      | gi 485924857  | putative hsp70 family chaperone lhs1 protein                  | <i>Neofusicoccum parvum</i>      | 5.05/139.54              | 5.90/143.56 | 86                 | 3                          |
| 42                      | gi 320590717  | 14-3-3 family protein                                         | <i>Grosmannia clavigera</i>      | 5.66/17.11               | 4.98/34.45  | 172                | 9                          |
| 43                      | gi 407925485  | Scytalone dehydratase                                         | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 5.41/23.00               | 5.37/21.22  | 113                | 17                         |
| 44                      | gi 407925266  | E3 binding protein                                            | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 5.68/22.13               | 9.28/27.59  | 96                 | 4                          |
| 45                      | gi 407919141  | Adenosine kinase                                              | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 5.54/65.95               | 7.66/45.53  | 256                | 15                         |
| 46                      | gi 407916799  | Rab GDI protein                                               | <i>Macrophomina phaseolina</i>   | 5.34/86.42               | 5.30/51.89  | 504                | 23                         |
| 47                      | gi 305381752  | cyclophilin 1 short isoform                                   | <i>Alternaria longipes</i>       | 6.04/14.35               | 6.82/20.23  | 145                | 18                         |
| 48                      | gi 389645829  | hypothetical protein                                          | <i>Magnaporthe oryzae</i>        | 6.20/16.65               | 5.50/16.57  | 63                 | 7                          |
| 49                      | gi 239614827  | ATP-citrate-lyase                                             | <i>Ajellomyces dermatitidis</i>  | 6.16/26.02               | 6.40/52.94  | 125                | 7                          |
| 51                      | gi 552919150  | hypothetical protein                                          | <i>Rhizophagus irregularis</i>   | 6.14/51.37               | 8.84/96.95  | 54                 | 2                          |
| 52                      | gi 557722301  | phosphoglucosomutase                                          | <i>Byssoschlamys spectabilis</i> | 5.87/99.64               | 6.14/87.68  | 217                | 5                          |

**Tabela 1** - Identificação das proteínas diferencialmente expressas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, através de análise por UPLC-ESI-Q-TOF e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi  $p < 0,05$  (Continuação).

| N° do spot <sup>a</sup> | Acesso (NCBI) | Proteína                                                    | Espécie                             | pI/Mr (kDa) <sup>b</sup> |             | Score <sup>c</sup> | Cobertura da sequência (%) |
|-------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------|--------------------|----------------------------|
|                         |               |                                                             |                                     | Experimental             | Teórico     |                    |                            |
| 53                      | gi 407921831  | AICARFT/IMPCHase bienzyme                                   | <i>Macrophomina phaseolina</i>      | 6.20/98.33               | 6.27/65.49  | 188                | 11                         |
| 54                      | gi 116181954  | glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase                         | <i>Chaetomium globosum</i>          | 6.29/95.27               | 7.11/56.52  | 92                 | 4                          |
| 55                      | gi 407928167  | NADH:ubiquinone oxidoreductase 75kDa subunit conserved site | <i>Macrophomina phaseolina</i>      | 5.82/115.19              | 5.79/81.73  | 318                | 10                         |
| 56                      | gi 407922497  | Transketolase                                               | <i>Macrophomina phaseolina</i>      | 6.27/126.94              | 5.87/74.92  | 283                | 13                         |
| 57                      | gi 407925824  | hypothetical protein                                        | <i>Macrophomina phaseolina</i>      | 6.62/14.08               | 5.20/14.50  | 126                | 25                         |
| 58                      | gi 407916430  | hypothetical protein                                        | <i>Macrophomina phaseolina</i>      | 6.44/16.05               | 5.59/15.34  | 72                 | 15                         |
| 59                      | gi 212526916  | N-acetylglucosamine-phosphate mutase                        | <i>Talaromyces marneffeii</i>       | 6.34/97.85               | 5.90/59.27  | 149                | 4                          |
| 60                      | gi 85109951   | vacuolar ATP synthase subunit B                             | <i>Neurospora crassa</i>            | 6.49/103.50              | 5.83/56.77  | 195                | 7                          |
| 61                      | gi 115402019  | glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial precursor | <i>Aspergillus terreus</i>          | 6.66/100.47              | 6.57/77.69  | 97                 | 3                          |
| 62                      | gi 46126305   | hypothetical protein                                        | <i>Fusarium graminearum</i>         | 6.72/109.02              | 7.41/75.05  | 91                 | 3                          |
| 63                      | gi 146412442  | hypothetical protein                                        | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>    | 6.52/127.92              | 6.13/55.07  | 61                 | 2                          |
| 64                      | gi 294957165  | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial (GAPDH)   | <i>Lasiodiplodia theobromae</i>     | 7.35/14.87               | 5.31/18.47  | 62                 | 11                         |
| 65                      | gi 146412442  | hypothetical protein                                        | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>    | 6.96/23.38               | 6.13/55.07  | 61                 | 2                          |
| 66                      | gi 485925663  | putative mn superoxide dismutase protein                    | <i>Neofusicoccum parvum</i>         | 7.16/27.90               | 9.14/25.34  | 145                | 11                         |
| 67                      | gi 189194551  | dihydrolipoamide succinyltransferase                        | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 7.25/32.41               | 6.09/50.67  | 65                 | 4                          |
| 68                      | gi 407918916  | Thiamine pyrophosphate enzyme TPP-binding protein           | <i>Macrophomina phaseolina</i>      | 7.06/63.43               | 5.91/63.95  | 292                | 16                         |
| 69                      | gi 485916230  | putative elongation factor 2 protein                        | <i>Neofusicoccum parvum</i>         | 7.27/76.43               | 6.31/93.54  | 234                | 6                          |
| 70                      | gi 407920945  | Acyltransferase ChoActase/COT/CPT                           | <i>Macrophomina phaseolina</i>      | 6.96/98.72               | 8.49/73.11  | 172                | 9                          |
| 71                      | gi 494827166  | alpha-mannosidase                                           | <i>Coniosporium apollinis</i>       | 7.10/100.35              | 5.96/123.00 | 130                | 3                          |

**Tabela 1** - Identificação das proteínas diferencialmente expressas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, através de análise por UPLC-ESI-Q-TOF e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi  $p < 0,05$  (Continuação).

| N° do spot <sup>a</sup> | Acesso (NCBI) | Proteína                                          | Espécie                              | pI/Mr (kDa) <sup>b</sup> |             | Score <sup>c</sup> | Cobertura da sequência (%) |
|-------------------------|---------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------|--------------------|----------------------------|
|                         |               |                                                   |                                      | Experimental             | Teórico     |                    |                            |
| 72                      | gi 494827166  | alpha-mannosidase                                 | <i>Coniosporium apollinis</i>        | 7.16/101.00              | 5.96/123.00 | 60                 | 1                          |
| 73                      | gi 407929339  | Cytochrome b5                                     | <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 7.17/104.36              | 6.61/68.50  | 194                | 6                          |
| 74                      | gi 226287792  | elongation factor 2                               | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 7.10/126.51              | 6.36/93.63  | 299                | 6                          |
| 75                      | gi 407917511  | Methionine synthase vitamin-B12 independent       | <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 6.93/127.07              | 6.43/86.29  | 383                | 10                         |
| 76                      | gi 171677169  | hypothetical protein                              | <i>Podospira anserina</i>            | 6.85/127.22              | 9.42/54.84  | 54                 | 3                          |
| 78                      | gi 387233033  | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial | <i>Neocallimastix frontalis</i>      | 7.75/21.24               | 6.45/35.90  | 76                 | 4                          |
| 79                      | gi 296416283  | hypothetical protein                              | <i>Tuber melanosporum</i>            | 7.62/34.67               | 7.94/72.40  | 137                | 7                          |
| 80                      | gi 832919     | BMH1                                              | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>      | 8.34/63.09               | 5.89/22.02  | 57                 | 5                          |
| 81                      | gi 407921479  | Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase          | <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 8.49/62.81               | 8.87/41.20  | 179                | 13                         |
| 83                      | gi 145252658  | oxidoreductase, 2-nitropropane dioxygenase family | <i>Aspergillus niger</i>             | 8.17/57.16               | 6.67/37.55  | 96                 | 6                          |
| 84                      | gi 385302704  | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase               | <i>Dekkera bruxellensis</i>          | 8.32/52.19               | 7.56/42.19  | 60                 | 2                          |
| 85                      | gi 145253056  | ATP synthase subunit alpha                        | <i>Aspergillus niger</i>             | 8.73/83.72               | 9.14/60.02  | 540                | 19                         |
| 86                      | gi 398409000  | hypothetical protein                              | <i>Zymoseptoria tritici</i>          | 7.61/96.58               | 6.05/59.17  | 66                 | 2                          |
| 87                      | gi 145253056  | ATP synthase subunit alpha                        | <i>Aspergillus niger</i>             | 7.73/97.56               | 9.14/60.02  | 144                | 4                          |
| 88                      | gi 407916900  | Short-chain dehydrogenase/reductase SDR           | <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 7.56/124.73              | 8.53/97.12  | 492                | 14                         |
| 90                      | gi 4588118    | alkaline serine protease Pen c2                   | <i>Penicillium citrinum</i>          | 9.45/17.14               | 6.00/48.14  | 123                | 4                          |
| 91                      | gi 407924727  | pathogenesis associated protein Cap20, putative   | <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 8.81/21.27               | 8.54/19.88  | 166                | 22                         |
| 93                      | gi 407917508  | hypothetical protein                              | <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 9.24/29.13               | 8.53/20.97  | 77                 | 11                         |

**Tabela 1** - Identificação das proteínas diferencialmente expressas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, através de análise por UPLC-ESI-Q-TOF e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi  $p < 0,05$  (Conclusão).

| N° do spot <sup>a</sup> | Acesso (NCBI) | Proteína                                    | Espécie                        | pI/Mr (kDa) <sup>b</sup> |            | Score <sup>c</sup> | Cobertura da sequência (%) |
|-------------------------|---------------|---------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------|--------------------|----------------------------|
|                         |               |                                             |                                | Experimental             | Teórico    |                    |                            |
| 94                      | gi 407928557  | Porin eukaryotic type                       | <i>Macrophomina phaseolina</i> | 9.50/50.24               | 8.99/29.72 | 151                | 17                         |
| 95                      | gi 407929121  | Aspartate/other aminotransferase            | <i>Macrophomina phaseolina</i> | 9.38/66.53               | 9.18/46.21 | 401                | 21                         |
| 96                      | gi 407917511  | Methionine synthase vitamin-B12 independent | <i>Macrophomina phaseolina</i> | 9.38/77.91               | 6.43/86.29 | 481                | 17                         |

<sup>a</sup> – os spots estão identificados na figura 4.

<sup>b</sup> – ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (Mr).

<sup>c</sup> – todos os valores de escores listados estão acima do escore limite. Valores calculados pelo programa Mascot, indicando extensa similaridade ( $p < 0,05$ ) nas buscas pelo NCBI.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Protocolo de extração de proteínas

A enorme variabilidade genética apresentada pelo fungo *L. theobromae* o torna uma importante ameaça à fruticultura nacional. Fato que se torna mais agravante pela inexistência de um controle efetivo para reduzir os danos causados por este fitopatógeno. Diante disto, o controle genético, ou seja, o uso de variedades resistentes ao seu ataque torna-se cada vez mais necessário cujo os estudos ao nível de DNA são fundamentais, porém ainda incompletos. As ferramentas proteicas surgem como complementariedade da etapa do melhoramento genético, buscando respostas mais precisas e pontuais sobre o comportamento dos indivíduos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro.

É do interesse da população científica entender melhor a relação de agressividade da interação *L. theobromae*-cajueiro e os fatores envolvidos com tal característica, objetivando assim, lançar estratégias eficazes de prevenção e controle, sejam elas culturais ou genéticas.

Melo (2010) utilizando marcadores microssatélites, avaliou a diversidade genética de 22 isolados de *L. theobromae* em cajueiro e observou uma ampla variabilidade genética, sendo esta independente do local de origem, bem como sua patogenicidade. Esta característica representa um grande avanço no entendimento da relação patógeno-hospedeiro. As técnicas proteômicas podem ser usadas para complementar as informações obtidas nas análises genômicas, pois refletem o produto final dos transcritos.

Uma das etapas mais cruciais no estudo proteico é a extração das proteínas, onde um protocolo visando obedecer a critérios como a obtenção de maior rendimento, solubilização e pouca contaminação com contaminantes deve ser estabelecido. Não existe um método único de preparação do material que possa ser utilizado para todos os indivíduos e tipos de amostras analisadas por 2-DE. Embora um grande número de protocolos padrões já tenha sido evidenciado, estes têm de ser adaptados ao tipo de amostra a ser analisada, o objetivo do estudo, bem como às proteínas de interesse (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004).

Inicialmente, o tecido deve ser macerado a fim de favorecer a interação do conteúdo celular com as substâncias extratoras. A obtenção do pó fúngico por pulverização em nitrogênio líquido é eficaz para esse propósito, além de minimizar a degradação proteolítica durante o rompimento do tecido (WANG *et al.*, 2008).

Além das proteases, os metabólitos secundários podem afetar severamente o processo de extração de proteínas e separação em géis 2D. Por exemplo, compostos fenólicos podem formar complexos irreversíveis com proteínas, e a oxidação de fenólicos pelas enzimas fenol-oxidases e peroxidases pode originar compostos que aumentam o background impedindo a

resolução das proteínas nos géis. Pigmentos, polissacarídeos e lipídios também podem comprometer a separação das proteínas durante a eletroforese bidimensional (VÂLCU; SCHLINK, 2006).

Desta forma, protocolos de extração de proteínas à base de TCA/acetona são muito utilizados, pois o seu papel baseia-se em minimizar a degradação das proteínas, além da remoção de compostos interferentes, como o sal e polifenóis (GÖRG *et al.*, 2000).

Assim, neste estudo quatro protocolos de extração foram testados com o objetivo de determinar qual destes melhor se adequa para a extração de proteínas do fungo *L. theobromae*.

Dentre os métodos de extração de proteínas avaliados no trabalho, o método “1”, baseado na precipitação com acetona/TCA/2-ME apresentou uma ótima eficiência na extração de proteínas do fungo, além de géis bidimensionais apresentando excelente resolução, uma maior distribuição das proteínas nos géis e um maior número de spots totais (Figura 3). Esses resultados corroboram ao apresentado por Gondim (2010), onde o autor avaliou diferentes protocolos e, mesmo com materiais diferentes, no caso tecido lenhoso do cajueiro, o mesmo protocolo permitiu obter os melhores resultados, tanto ao nível de teor de proteínas como na qualidade dos géis bidimensionais.

Vale salientar que os mapas bidimensionais obtidos no método “1”, quando comparado com o método “3”, revelaram um maior número de spots e uma melhor resolução dos géis (Figura 3).

Apesar de o método “1” não ter apresentado os maiores teores de proteínas (4,97mg/ml), resultados que estão de acordo com os dados observados por Maldonado *et al.* (2008), em que ele testou três diferentes protocolos de extração de proteínas de *Arabidopsis thaliana*. O método que apresentou maiores teores de proteínas foi o baseado em TCA/acetona. Estes resultados reafirmam que o TCA/acetona quando comparado com o fenol, fornece um *pellet* que é mais difícil de dissolver no tampão, permanecendo sempre algum material insolúvel.

#### **4.2. Análise proteômica de isolados de *L. theobromae* em relação ao seu nível de agressividade**

A fim de compreender a interação entre o fungo e a planta, torna-se extremamente importante investigar os mecanismos envolvidos com a resistência à doença, além dos responsáveis pela agressividade do patógeno. Assim, o uso da proteômica pode auxiliar na identificação de proteínas envolvidas nestes processos e, por conseguinte, seus genes associados.

Uma análise comparativa foi realizada entre os dois grupos de *L. theobromae*, a fim de identificar as proteínas expressas diferencialmente que poderia fornecer uma visão inicial sobre os mecanismos moleculares de especificidade de hospedeiro ou virulência do fungo.

Os perfis bidimensionais obtidos por meio do protocolo de extração definido como o mais adequado para *L. theobromae*, apresentaram excelente resolução e boa reprodutibilidade, aliado a um elevado número de spots.

Observou-se uma grande variação entre os dois grupos I e II, onde as mudanças foram visivelmente detectadas, como a presença e a intensidade dos spots nos géis. A partir da análise das imagens dos géis 2D-PAGE (software PD-Quest), foi possível verificar as alterações nos padrões de expressão de proteínas, principalmente no grupo I (fungo mais agressivo).

Vale salientar que, de acordo com um dendrograma genético feito pelo próprio autor, contata-se que os isolados usados neste trabalho, referentes ao grupo I e II, são geneticamente distantes, apresentando uma similaridade de apenas 35%, fato este que corrobora com os dados aqui apresentados, ou seja, existe uma grande diferença a nível genético, à agressividade e ainda a um nível proteômico entre estes dois grupos estudados.

Foram detectadas centenas de spots, sendo considerado para o prosseguimento das análises, apenas os spots diferenciais, ou seja, aqueles exclusivos em um grupo de fungo. Desta forma, observaram-se noventa e seis spots diferenciais, sendo estes, excisados, digeridos com tripsina, sendo então, submetidos à identificação das proteínas, por MS.

Comparando-se os padrões eletroforéticos 2D dos isolados do grupo I (mais agressivo) e grupo II (menos agressivo), verifica-se que os mesmos apresentaram 491 proteínas em comum. Tendo em vista que o objetivo do trabalho busca justamente identificar os possíveis fatores que possam ser responsáveis pela patogenicidade, apenas as proteínas diferenciais foram utilizadas como parâmetro. Essas proteínas estão descritas na tabela 1.

Mancini *et al.* (2013) estudando com três espécies de *Diplodia* apresentando características morfológicas e genéticas muito semelhantes, conseguiu distinguir estes três espécimes por meio da identificação dos metabólitos utilizando a técnica do MALDI-TOF MS.

Além disso, 95 proteínas foram exclusivas do grupo I, enquanto apenas uma (01) foi exclusiva do grupo II (Tabela 1). Embora o grupo I seja geneticamente distante do grupo II (apenas 35% de similaridade genética), conforme citado anteriormente, os mesmos apresentam várias proteínas em comum. Estas proteínas presentes no grupo mais agressivos e ausentes no grupo antagônico podem estar associadas com a agressividade do fungo, além de poderem estar relacionadas com fatores evolutivos destes indivíduos.

As proteínas identificadas por MS são envolvidas em diversos processos bioquímicos e fisiológicos do fungo, corroborando a complexidade do proteoma no que concerne ao amplo espectro de respostas que o patógeno pode ativar/reprimir após o contato com a planta.

Devido à ausência de sequências de DNA e proteínas de *L. theobromae* em bancos de dados, as pesquisas com FMP não tiveram sucesso. Assim, a identificação das proteínas foi conseguida por homologia com sequências de busca experimentais obtidos no banco de dados do NCBI. Identificações positivas foram realizadas pelos correspondentes domínios de sequências bem conservadas dentro das proteínas semelhantes a partir de outros organismos relacionados (*Fungi* taxa).

Todas as proteínas identificadas neste trabalho apresentaram correlação com outras proteínas similares, de outras espécies de fungos, sendo 38 de *Macrophomina phaseolina*, uma única de *L. theobromae*, considerando que o seu genoma ainda não foi sequenciado, 8 de *Arabidopsis thaliana*, 6 de *Neofusicoccum parvum*, 3 de *Aspergillus niger*, além de diversas outras espécies de fungos utilizadas como organismos de referência (Tabela 1).

No entanto, a relação entre estas proteínas e a especificidade do hospedeiro ainda não está claro. Na maioria dos casos, a especificidade de hospedeiro está associada com a produção de toxinas específicas do hospedeiro, como por exemplo, a toxina Ptr ToxA do patógeno do trigo *Pyrenophora tritici-repentis* (CIUFFETTI et al., 1998). As funções de algumas destas proteínas estão listadas a seguir.

A tiorredoxina (TRX-1) é uma pequena proteína composta por 105 aminoácidos, com peso molecular de 12,5 kDa, servindo como um importante anti-oxidante em células animais. Do ponto de vista da evolução é uma proteína muito conservada. Foi clonado pela primeira vez na bactéria *Escherichia coli* e subsequentemente encontrado em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e, gradualmente, em outras espécies de animais.

Algumas das outras proteínas que tenham sido identificadas mostram ter um papel em virulência, tanto em plantas como em animais. A interrupção do gene de isomerase de fosfoglucoose no patógeno arroz *Xanthomonas oryzae* levou a atenuação da virulência, conforme verificado por McCourt e Duggleby (2006). Já a fosfogluconato desidrogenase mostrou estar envolvida com a adesão do agente patogênico bacteriano *Streptococcus suis* nas células hospedeiras (VIAUD; BALHADÈRE; TALBOT, 2002).

Peptidyl-prolylcis-trans isomerase mostrou ser determinante de virulência do patógeno arroz *Magnaporthe grisea*, uma vez que os mutantes foram alterados em funções associados à virulência, tais como a formação de penetração e geração do turgor do apressório (VIAUD; BALHADÈRE; TALBOT, 2002). Chaperonas moleculares são também fatores de virulência

importantes, permitindo que os agentes patogênicos possam superar um ambiente hostil, resultante de respostas do hospedeiro, tais como o estresse oxidativo (NECKERS; TATU, 2008).

Outra proteína que merece destaque é a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). O papel de GAPDH no ciclo glicolítico é bem conhecida, mas estudos recentes têm atribuído a esta enzima cerca de 15 funções diferentes em células de mamíferos e de agentes patogênicos microbianos.

GAPDH também está envolvida na exportação nuclear de tRNA, na regulação dos filamentos de actina em microfilamentos, no reparo do DNA, e na regulação da liberação de cálcio para o retículo endoplasmático (FERNÁNDES-ACERO *et al.*, 2006). Variações na atividade GAPDH podem influenciar muitas outras atividades celulares, facilitando uma maior capacidade de adaptação aos desafios ambientais ou condições de crescimento. Além disso, estudos mostram a importância de certas enzimas de limpeza, entre os quais GAPDH está incluída, como fatores de virulência para uma grande variedade de patógenos microbianos (DEVESE-ALVAREZ *et al.*, 2001).

Outra proteína que merece destaque é a BMH1 que pertence à família das proteínas 14-3-3. O mecanismo de ação destas proteínas envolve, inicialmente, um estímulo que aciona rotas de sinalização celular, com consequente fosforilação de proteínas que são, por sua vez, reconhecidas pelas 14-3-3 (DENISON *et al.*, 2011). O número de proteínas identificadas em plantas e que são candidatas à regulação mediada por membros desta família é superior a 300 (PAUL *et al.*, 2009; SCHOONHEIM *et al.*, 2009). A crescente expansão de dados relacionados a estas proteínas sugerem seu envolvimento em vários processos fisiológicos e vias de sinalização nas plantas.

O spot 47 foi identificado como uma isoforma da cyclophilin citosolic. Ciclofilinas têm atividade prolylcis-transisomerase peptidil que direciona e acelera o dobramento de proteínas, ao catalisar a isomerização de ligações peptídicas anteriores resíduos de prolina (FISCHER; SCHMIDT, 1990). Elas estão ainda envolvidas numa larga variedade de processos celulares, incluindo a resposta a estresse ambiental, controle do ciclo celular, regulação da sinalização de cálcio e o controle de transcrição (VIAUD *et al.*, 2003). Em *Cryptococcus neoformans*, foi relatado que esta proteína pode ter um papel no crescimento celular comum, acasalamento e virulência (WANG *et al.*, 2001). Em *Magnaporthe grisea*, uma ciclofilina parece regular funções relacionadas com a virulência, incluindo geração de turgor dos apressórios e biossíntese de lipídios (VIAUD *et al.*, 2002). O papel de ciclofilina como um fator de

virulência em *B. cinerea* foi demonstrado usando a inativação do gene, a inibição de drogas e abordagens de macroarranjo de cDNA (FISCHER; SCHMIDT, 1990).

Vale destacar o spot 51 que se refere ao o único spot exclusivo para o grupo menos agressivo, sendo este identificado como uma proteína hipotética, com base nas pesquisas no banco de dados do NCBI.

Os dados aqui apresentados corroboram com os demonstrados por Fernández-Acero *et al.* (2006) que forneceram o primeiro mapa proteico 2D do fungo *Botrytis cinerea* que descobriram que muitas das proteínas identificadas foram as isoformas de malato desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, correlacionando-as com a natureza fitopatogênica deste fungo. Os autores identificaram ainda, os fatores de patogenicidade de *B. cinerea*. Da mesma forma, o proteoma de outro fungo fitopatogênico, *Sclerotinia sclerotiorum*, foi mapeado e forneceram dados de que a  $\alpha$ -L-arabino-furanosidase pode estar envolvido na sua patogenicidade.

A proteômica comparativa de espécies de fungos tem contribuído para a compreensão do processo de infecção fúngica (BHADAURIA *et al.*, 2010), patogenicidade e identificação de proteínas candidatas de virulência (EL-BEBANY *et al.*, 2010).

Embora não tenham sido identificadas proteínas com função evidente em relação à agressividade (patogenicidade), muitas das proteínas parecem exercer funções secundárias relativas a esse processo. Vale ainda salientar que este é um trabalho pioneiro ao nível do patógeno e que muitas outras informações podem ser exploradas com o intuito de se explicar a patogenicidade dos isolados de *L. theobromae*.

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Embrapa Agroindústria Tropical e a Universidade Federal do Ceará por apoiarem a realização do presente estudo. Este trabalho é parte da tese de doutorado do primeiro autor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. **Fungal Diversity**, v. 23, p. 1-15, 2006.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 11-18, 2009.

BHADAURIA, V.; BANNIZA, S.; WANG, L. X.; WEI, Y. D.; PENG, Y. L. Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 81-95, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREGAR, O.; MANDELIC, S.; CELAR, F.; JAVORNIK, B. Proteome analysis of plant pathogen *Monilia laxa*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 326–333, 2012.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CANTÚ, M. D. **Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros**. 2007. 229 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; SÁ, F. T. Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 48-50, 1998.

CIUFFETTI, L. M.; FRANCL, L. J.; BALLANCE, G. M.; BOCKUS, W. W.; LAMARI, L.; MEINHARDT S.W.; RASMUSSEN, J. B. Standardization of toxin no-menclature in the *Pyrenophora tritici-repentis*/wheat interaction. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 20, p. 421–424, 1998.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M.S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia**, Ciência e Desenvolvimento, ano IX, v. 36, 2006.

DENISON, F. C.; PAUL, A. L.; ZUPANSKA, A. K.; FERL, R. J. 14-3-3 proteins in plant physiology. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, p. 720-727, 2011.

DEVEZE-ALVAREZ, M.; GARCIA-SOTO, J.; MARTINEZ-CADENA, G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is negatively regulated by ADP-ribosylation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. **Microbiology**, v. 147, p. 2579–2584, 2001.

DOYLE, S. Fungal proteomics: from identification to function. **FEMS Microbiology Letters**, v. 321, p. 1-9, 2011.

EL-BEBANY, A. F.; RAMPITSCH, C.; DAAYF, F. Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness. **Proteomics**, v. 10, p. 289–303, 2010.

FERNÁNDES-ACERO, F. J.; JORGE, I.; CALVO, E.; VALLEJO, C.; CARBÚ, M.; CAMAFEITA, E.; LÓPEZ, J. A.; CANTORAL, J. M.; JORRÍN, J. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Proteomics**, v. 6, p. S88–S96, 2006.

FISCHER, G, SCHMID, F. X. The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. **Biochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2205-2212, 1990.

GIBSON, D. M.; KING, B. C.; HAYES, M. L.; BERGSTROM, G. C. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 264-270, 2011.

GONDIM, D. M. F. **Bases Bioquímicas da Interação do Cajueiro Anão Precoce com o Fungo *Lasiodiplodia theobromae* causador da Resinose**. 2010. 143 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GONZALEZ-FERNANDEZ, R.; JORRIN-NOVO, J. V. Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 3–16, 2012.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v. 4, ed. 12, p. 3665-3685, 2004.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, ed. 6, p. 1037-1056, 2000.

HEMATY, K.; CHERK, C.; SOMERVILLE, S. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 406-413, 2009.

HUANG, C.; JENG, R.; SAIN, M.; HUBBES, M.; DUMAS, M. T. Rapid differentiation of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* isolates by matrix-assisted-laser-desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry. **Forest Pathology**, v. 40, p. 1–6, 2010.

ISOLA, D.; MARZBAN, G.; SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; LAIMER, M.; STERFINGER, K. Sample preparation and 2-DE procedure for protein expression profiling of black microcolonial fungi. **Fungal Biology**, v. 115, p. 971-977, 2011.

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends of Biotechnology**, v. 25, n. 9, 395-400, 2007.

LAKSHMAN, D. K.; NATARAJAN, S. S.; LAKSHMAN, S.; GARRETT, W. M.; DHAR, A. K. Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. **Mycologia**, v. 100, p. 867–875, 2008.

MALDONADO, A.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; JEAN-BAPTISTE, S.; HERNÁNDEZ, M.; JORRÍN-NOVO, J. V. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Proteomics**, v. 71, p. 461-472, 2008.

MANCINI, V.; DAPPORTO, L.; BARACCHI, D.; LUCHI, N.; TURILLAZZI, S.; CAPRETTI, T. Phenotypic characterization of cryptic *Diplodia* species by MALDI-TOF MS and the bias of mycelium age. **Forest Pathology**, v. 43, p. 455-461, 2013.

MCCOURT, A.; DUGGLEBY, R. G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. **Amino Acids**, v. 31, p. 173–210, 2006.

MELO, J. G. M. **Diversidade genética e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado ao cajueiro**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MESQUITA, R. O. **Análise proteômica de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* que apresentam respostas diferenciadas em diversas fruteiras**. 2007. 54 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MOURA, H. F. N.; VASCONCELOS, I. M.; SOUZA, C. E. A.; SILVA, F. D. A.; MORENO, F. B. M. B.; LOBO, M. D. P.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOURA, A. A.; COSTA, J. H. OLIVEIRA, J. T. A. Proteomics changes during the incompatible interaction between cowpea and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. **Plant Science**, v. 217-218, p. 158-175, 2014.

NECKERS, L.; TATU, U. Molecular chaperones in pathogen virulence: Emerging new targets for therapy. **Cell Host Microbe**, v. 4, p. 519–527, 2008.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electroforesis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

PAUL, A. L.; LIU, L.; LAUGHNER, B.; MCCLUNG, S.; CHEN, S.; FERL, R. Comparative interactomics: analysis of *Arabidopsis* 14-3-3 complexes reveals highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 1913-1924, 2009.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 572-578, 2006.

PUNITHALINGAM, E. *Botryodiplodia theobromae*. CMI. **Description of Pathogenic Fungi and bacteria**. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, England, 1976, n. 519, 3p.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M. C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. 2D gels still have a niche in proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 88, p. 4-13, 2013.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 7-17, 2004.

SCHOONHEIM, P. J.; VEIGA, H.; PEREIRA, D. C.; FRISO, G.; VAN WIJK, K. J.; DE BOER, A. H. A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. **Plant Physiology**, v.143, p. 670-683, 2007.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appl Microbiol Biot**, v. 87, p. 787–799, 2010.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O. N.; PODTELEJNIKOV, A. V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large scale identification of yeast proteins from two-dimensional gels. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 93, p.14440-14445, 1996.

SILVA, A. M. S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica – uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2007.

TESEI, D.; MARZBAN, G.; ZAKHAROVA, K.; ISOLA, D.; SELBMANN, L.; STERFLINGER, K. Alteration of protein patterns in black rock inhabiting fungi as a response to different temperatures. **Fungal Biology**, v. 116, p. 932-940, 2012.

VIAUD, M. C.; BALHADÈRE, P. V.; TALBOT, N. J. A *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. **Plant Cell**, v. 14, p. 917–930, 2002.

VIAUD, M.; BRUNET-SIMON, A.; BRYGOO, Y.; PRADIER, J. M.; LEVIS, C. Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology*, v. 50, n. 5, p. 1451–1465, 2003.

WANG, P.; CARDENAS, M. E.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HEITAMN, J. Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Reports**, v. 2, p. 511-518, 2001.