

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 theobromae*
ASSOCIADO A FRUTEIRAS TROPICAIS

FORTALEZA-CEARÁ
ABRIL / 2014

JOSÉ GLAUBER MOREIRA MELO

ANÁLISE MOLECULAR E PROTEÔMICA DE
***Lasiodiplodiatheobromae* 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

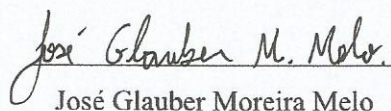
ABRIL / 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M485q Melo, José Glauber Moreira.
 Análise molecular e proteômica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a fruteiras tropicais /
José Glauber Moreira Melo. – 2014.
 88 f. il., color. enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Fortaleza,
2014.
 Área de concentração: Fitopatologia.
 Orientação: Prof. Dr. José Emilson Cardoso.
1. Doenças e pragas. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. *Lasiodiplodia theobromae*. I. Título.

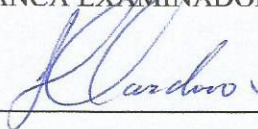
Esta tese de doutorado foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central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

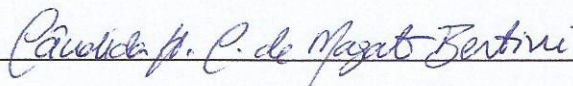

José Glauber Moreira Melo

Tese aprovada em: 30 / 04 / 2014.

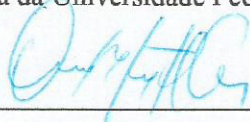
BANCA EXAMINADORA



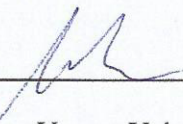
Prof. Dr. José Emilson Cardoso (Orientador)
Pesquisador Embrapa Agroindústria Tropical



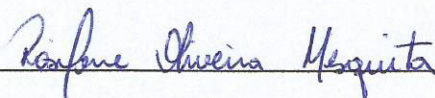
Profª. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini
Professora da Universidade Federal do Ceará



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



Dr. Marlon Vagner Valentim Martins
Pesquisador Embrapa Agroindústria Tropical



Dra. Rosilene Oliveira Mesquita
Pesquisadora da Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, José Pereira e Edinar.

Aos meus irmãos, Cláudio e Clauber.

À minha irmã, Marie (*In memoriam*).

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 dados a mim.

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

Em especial, à minha amada esposa, 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 Prof. Dra. Cândida Bertini, pelos ensinamentos, conselhos e pela pronta aceitação em participar da avaliação deste trabalho, contribuindo com valiosas sugestões.

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 ao Dr. Freire pelos grandes ensinamentos passados durante todo esse período de convivência.

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

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, Gislane, Henrique, Ingrid, Joilson, Lais, Larissa, Renato, Sérgio, Samara, Suane, Thiago e todos aqueles 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 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 Frederico Brunopelo apoio na realização das análises de espectrometria de massas.

Ao grupo do mestrado, Afrânio, Aline, Ana Lúcia, Hayna, Nathália, Ravena, pelo companheirismo e pelos 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 concedida.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro, dado à realização desse trabalho.

“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 fitopatogênico responsável por inúmeras doenças em variadas plantas, sendo um fungo tipicamente de regiões tropicais e subtropicais. O fungo ataca diversas plantas tropicais, dentre elas destacam-se a mangueira, as *Spondias* spp., o coqueiro, o cajueiro, entre tantas outras. Seu controle é basicamente genético realizado com o plantio de clones resistentes, entretanto, para sua obtenção torna-se necessário o conhecimento das características do patógeno. As informações disponíveis sobre a variabilidade genética de *L. theobromae* são insuficientes para assegurar o sucesso em qualquer programa de melhoramento genético visando à resistência a este patógeno. Levando-se em conta que as proteínas são produtos funcionais dos genes, torna-se importante conhecê-las, visando um melhor entendimento do modo de ação dos patógenos, sendo este entendimento, útil como estratégia a ser utilizada no melhoramento vegetal buscando a resistência genética. Assim, o objetivo desse estudo foi realizar um estudo genético molecular em uma população de *L. theobromae* e uma análise proteômica diferencial do fungo entre isolados, mais e menos agressivos, visando identificar proteínas responsáveis por essa agressividade. Uma população composta de 105 isolados foi usada na caracterização molecular, extraindo-se o DNA a partir do micélio do fungo crescido em meio líquido. Cada amostra foi submetida à reação em cadeia da polimerase (PCR) com 15 pares de primers específicos para essa espécie, além de um par de primer da região ITS e outro da região EF-1 α . Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose, corados com brometo de etídio e os dados tabulados em planilha binária e foram 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. Já o estudo proteômico foi realizado visando avaliar diferenças qualitativas, ou seja, a presença/ausência de uma determinada proteína, em relação ao grupo antagonico. Para tal, utilizaram-se dois isolados do mesmo fungo, diferenciando-se quanto a sua agressividade, em que um era altamente agressivo, enquanto o outro apresentava uma baixa 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 diversas funções celulares. Com essa abordagem foi possível a caracterização preliminar do perfil proteico deste fungo, obtendo-se alguns indícios dos 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, Botryosphaeriaceae.

ABSTRACT

Lasiodiplodia theobromae is a plant pathogenic fungus responsible for many diseases in various plants, is a fungus typically tropical and subtropical regions. The fungus attacks many tropical plants, among them, including mango, *Spondias* sp., coconut, cashew, and many others. His control is basically genetic performed by planting resistant clones, however to obtain it becomes necessary to know the pathogen characteristics. The information available on the genetic variability of *L. theobromae* is restricted to ensure success in any breeding program for resistance to this pathogen. Taking into account that proteins are functional products of genes, it is important to know them, to improve the understanding of the mode of action of pathogens, with this understanding, useful as a strategy to be used in plant breeding seeking genetic resistance. The objective of this study were to conduct a genetic study molecular in a population of *L. theobromae* and a differential proteomic analysis of the fungus among isolates, more and less aggressive, to identify proteins responsible for this aggressivity. A population consisting of 105 strains was used for molecular characterization, extracting the DNA from mycelia grown in liquid medium. Each sample was subjected to polymerase chain reaction (PCR) with 15 pairs of primers specific for the species, and a primer pair of the ITS region and other EF-1 α region. The amplified products were visualisados agarose gel, stained with ethidium bromide and spreadsheet data in binary tabulated and analyzed by unbalanced grouping method based on the arithmetic mean (UPGMA) using the MVSP program. Genetic similarities were estimated by Jaccard's coefficient. The results indicated a high genetic variability of the studied population. Since the proteomic study was conducted to assess qualitative differences, that is, the presence/absence of a specific protein in relation to the opposite 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 low aggressiveness when inoculated seedlings of cashew. When the electrophoretic profile was analyzed, 96 were detected differentially expressed spots. By LC-ESI-Q-TOF MS / MS, 84 proteins were identified having the most diverse cellular functions. With this approach it was possible preliminary characterization of the protein profile of this fungus to give some evidence of the mechanisms involved in their aggressiveness. This is the first study seeking to know the proteins responsible for the aggressiveness *L. theobromae*.

Keywords: Gummosis, molecular markers, Botryosphaeriaceae.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figure 1 -Dendrograms based on DNA amplification profile 105 single spore isolates to *L. theobromae* using 15 microsatellite primer, a pair ITS primer and a pair of EF1- α primer. Dendrogram was estimated by clustering a dissimilarity matrix (Jaccard's Coeficient) of binary DNA data using the unweighted pair group method of arithmetic means in the MVSP program.....52

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.....53

CAPÍTULO II

Figura 1 - Teor de proteínas totais extraídas dos diferentes métodos para eletroforese 2D PAGE. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ($p=0,05$). Fortaleza, 2014..67

Figura 2 - Gel SDS-PAGE a 12,5% dos protocolos de extração de proteínas do fungo *L. theobromae*. M - marcador, I – método 1, II – método 2, III – método 3, IV – método 4. Fortaleza, 2014.....68

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.). Foi usada a mesma quantidade de proteínas para os 2 grupos. 250 μ g 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 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 μ g 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.....71

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.....72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 - . Botryosphaeriaceae isolates collected from tropical trees used in this study, host and origin. The isolates are maintained in a fungal culture collection, hosted at the CNPAT (Fortaleza, Ceará, Brazil).....50

CAPÍTULO II

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$73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
EDTA	Ácido Etileno diaminotetracético
DTT	Ditiotreitol
TFA	Ácido Trifluoracético
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	Gradiente de pH imobilizados em géis de poliacrilamida
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonyl
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS
TCA	Ácido tricloroacético
ACN	Acetonitrila
MS	Espectrometria de Massas
UPLC	Sistema de Cromatografia Líquida de Ultrapformance
ESI	Ionização por Eletrospray

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	19
3.2 Ferramentas para identificação de fungos.....	20
3.2.1 Ferramentas moleculares.....	20
3.2.2 Abordagens proteômicas para a identificação de fungos.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO I - MOLECULAR AND PATHOGENIC DIVERSITY OF BOTRYOSPHAERIAEAE ASSOCIATED TO TROPICAL PLANTS.....	37
Abstract.....	38
Introduction.....	38
Materials and methods.....	41
Colection of isolates.....	41
DNA isolation and PCR amplification.....	41
Pathogenicit tests.....	42
Results.....	43
DNA isolation and PCR amplification.....	43
Pathogenicit tests.....	43
Discussion.....	44
Acknowledgments.....	46

References	46
CAPÍTULO II - ESTUDO PROTEÔMICO DO FUNGO <i>LASIODIPLODIA THEOBROMAE</i> AGENTE CAUSAL DA RESINOSE EM CAJUEIRO (<i>ANACARDIUM OCCIDENTALE</i> L.).....	54
RESUMO	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Obtenção do material fúngico	59
2.2 Cultivo dos fungos	59
2.3 Estabelecimento do método de extração de proteínas de <i>L. theobromae</i> para análise proteômica	60
2.3.1. Método 1: Precipitação com solução de acetona, TCA e Fenol.....	60
2.3.2. Método 2: Precipitação com TCA/acetona	61
2.3.3. Método 3: Solubilização com Tris-fenol.....	62
2.3.4. Método 4: Precipitação com TCA.....	62
2.4 Dosagem de proteínas	63
2.5 Eletroforese unidimensional.....	63
2.6 Eletroforese bidimensional de isolados de <i>L. theobromae</i>	64
2.7 Visualização das proteínas e análise de imagens.....	65
2.8 Processamento dos spots, espectrometria de massas e identificação de proteínas.....	65
3. RESULTADOS.....	66
3.1 Estabelecimento do método de extração de proteínas do fungo <i>L. theobromae</i> para análise proteômica	66
3.2 Análise proteômica de isolados de <i>L. theobromae</i> em relação ao seu nível de agressividade.....	68
4. DISCUSSÃO	78
4.1. Método de extração de proteínas.....	78
4.2. Análise proteômica de isolados de <i>L. theobromae</i> em relação ao seu nível de agressividade.....	79
AGRADECIMENTOS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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 (FREIRE; CARDOSO, 2003).

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. Em cajueiro, por exemplo, 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 (CARDOSO *et al.*, 2006).

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 (QUIRINO *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 em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) tem sido frequentemente utilizada por vários autores (PERES *et al.*, 2002, CROUS *et al.*, 2006, SLIPPERS, WINGFIELD, 2007). Atualmente, as técnicas moleculares, associadas às características morfológicas e biológicas, têm sido empregadas para diferenciação e caracterização de espécies (PERES *et al.*, 2002).

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

No caso das espécies de *Lasiodiplodia*, várias regiões do gene do RNA ribossomal (ITS1, ITS2, 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 que proteínas diferentes podem funcionar de forma semelhante, ou seja, codificando um mesmo

gene (GONDIM, 2010), é válido assim, 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.

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, vêm sendo as estratégias mais empregadas no estudo do proteoma (QUIRINO *et al.*, 2010).

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 às medidas de controle convencionalmente utilizadas, sejam elas químicas ou através da introdução de hospedeiro resistente (CARLIER *et al.*, 2003).

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

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levando-se em conta a inexistência de pesquisas a nível proteômico do fungo *L. theobromae*, objetivou-se ainda, realizar um estudo proteômico pioneiro sobre este fungo, estabelecendo um método de extração de proteínas adequado para uma comparação dos perfis bidimensionais (2D), visando obter mapas iniciais de referência 2D do proteoma do referido fungo, verificando a presença ou ausência de proteínas expressas entre isolados contrastantes para agressividade.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Lasiodiplodiasp.*

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, sendo encontrados como fungos saprófitas, parasitas e endofíticos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Espécies de Botryosphaeriaceae podem causar uma variedade de sintomas em plantas, tais como cancos, seca descendente em ramos, manchas em madeiras, podridão de frutos, manchas foliares, *damping-off* e podridão de colo em mudas, secas em brotos e mudas, gomose *edieback* (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Gêneros da família Botryosphaeriaceae como *Diplodia* possuem nos 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).

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.

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 apresentados 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, o controle biológico e genético (TAVARES, 1995).

3.2 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 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 (DE 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).

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 conidiogênese que distinguem este gênero de fungos de outros intimamente relacionados. A presença de paráfises e estrias longitudinais em conídios maduro são também bastante observadas. Seus conídios são hialinos quando jovens, tornando-se posteriormente uniseptados, marrom escuro, com paredes espessas, elipsóide, base truncada, com estrias longitudinais (SLIPPERS; WINGFIELD, 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; WINGFIELD, 2007).

3.2.1 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 ou sequências simples repetidas (SSR) 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).

Em genomas de eucariotos, essas pequenas sequências repetitivas de DNA são mais freqüentes, mais bem distribuídas e formam loci genéticos muito polimórficos que podem ser amplificados via PCR a partir de um par de *primers* específicos (de vinte a trinta bases) que

flanqueiam os microssatélites. Os segmentos amplificados a partir destes sítios, quase invariavelmente, apresentam um extenso polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada microssatélite, independente do elemento repetido (e.g. CA, TG e ATG) constitui um locus genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (SUNNUCKS, 2000).

Hoje, os microssatélites são um dos mais poderosos métodos para estudos genéticos de populações (SELKOE;TOONEN, 2006). Podem ser utilizados para a determinação do grau de relação entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie (BLOUIN *et al.*, 1996), para análise de ascendência (ISAGI *et al.*, 2004), como ferramenta para avaliar os níveis de endogamia de uma população (ARBELÁEZ-CORTES *et al.*, 2007) e avaliar a magnitude e direcionamento do fluxo de genes entre as populações (GAGGIOTTI *et al.*, 2002).

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo o desenho de *primers* para amplificações específicas desses locos, via PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Essas amplificações tendem a mostrar extensivo polimorfismo, que é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Além da capacidade de gerar altos níveis de polimorfismo, os microssatélites ainda possuem, como vantagens, a alta reprodutibilidade, a simplicidade e a rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo e o grande poder de resolução (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

De acordo com Slippers e Wingfield (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 quanto a sua morfologia, mas também com base em dados de sequência de ITS e EF-1 α (DENMAN *et al.*, 2000; CROUS *et al.*, 2006).

Segundo Buso *et al.* (2003), o conteúdo genético informativo de um loco SSR é elevado, 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 iniciadores que serão usados na PCR para amplificar alelos em cada loco.

Sequências de DNA ribossomômico (rDNA) são universais e contém regiões conservadas e variáveis que permitem a discriminação de fungos em diferentes níveis taxonômicos. Regiões não codificantes semelhantes ao espaçador interno transcrito (ITS) evoluem 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 PCR, sendo usados 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* spp. por análises de sequências do ITS (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, desenvolveram 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, além de 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 β -tubulina e fator de alongamento 1-alfa (EF1- α), têm dado uma significativa contribuição para resolver problemas taxonômicos na família Botryosphaeriaceae (ALVES *et al.*, 2004; SLIPPERS *et al.*, 2004b; PHILLIPS *et al.*, 2005).

Dessa forma, isolados que eram classificados como *Botryosphaeria dothidea*, foram posteriormente classificados como *B. dothidea*, *B. parva* e *B. ribis* (SLIPPERS *et al.*, 2004a). Slippers *et al.* (2005), 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 β -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.* (2006) descreveram três novas espécies de *Lasiodiplodia* (*L. crassispora*, *L. venezuelensis* e *L. rubropurpurea*) com base em dados de sequência ITS, EF1- α 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- α .

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.

3.2.2 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 e transcriptômica, 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) (BHADAURIA *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, 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, possua sua função

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, 2002).

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 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 técnica da eletroforese bidimensional 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; TEIXEIRA; CORREIA, 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 (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 na elucidação e eficácia para escolha dos melhores genótipos de plantas, podendo por sua vez, serem usados na obtenção 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, proporcionando uma análise precisa do status de proteína celular ou alterações durante o crescimento, diferenciação e resposta a fatores ambientais (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008).

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 em géis de poliacrilamida por eletroforese bidimensional, seguida de identificação MS/MS é um método bastante utilizado (WASHBURN; WOLTERS; YATES, 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; GELBANK, 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; LESSING; BRAKHAGE, 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 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 patogênesea 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 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-traducionais, as interações proteína-proteína e interações proteína-DNA, a sua estrutura e a sua função biológica (SANTOS, TEIXEIRA; CORREIA, 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 da proteômica quantitativa permite apreciar o efeito da regulação da expressão gênica 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, a 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 parede celular, uma eficaz extração de proteínas é um passo fundamental para estudos de proteômica de fungos. Para a extração de proteína, um método 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 MASCOT (<http://www.matrixscience>), buscando em todo o banco de dados de proteínas fúngicas depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

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 ionização, 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 volatilizar as espécies a serem analisadas. Os analisadores de massas, como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas razões 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 uma fonte de ionização, MALDI (ionização/desorção a laser assistida por matriz), 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 (SAWAYA, 2014).

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 para o completo entendimento de como ocorre a fragmentação dos peptídeos. Além disso, a interpretação manual de espectros de MS/MS é recomendada 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 baseada 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

ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J.; PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria corticolasp.* 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 *Lasiodiplodia 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.

ARBELÁEZ-CORTES, E.; CASTILLO-CÁRDENAS, M. F.; TORO-PEREA, N.; CÁRDENAS-HENAO, H. Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. **Hydrobiologia**, v. 583, p. 321-330, 2007.

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.

BLOUIN, M. S.; PARSONS, M.; LACAILLE, V.; LOTZ, S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 393-401, 1996.

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, 2006.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microsatélites 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.; PAIVA, J. R.; CAVALCANTI, J. J. V.; SANTOS, A. A.; VIDAL, J. C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, v. 25, n° 8, p. 855-859, 2006.

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.

CARLIER, J.; HAYDEN, H.; RIVAS, G.; ZAPATER, M.-F.; ABADIE, C.; AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. *In: Workshop on Mucosphaerella leaf spot diseases held in San Jose, Costa Rica. Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*, p.123-129, 2003.

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.

DE 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.

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

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.

GAGGIOTTI, O. E.; LANGE, O.; RASSMANN, K.; GLIDDON, C. A. Comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1513-1520, 2002.

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.

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.

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

ISAGI, Y.; KANAZASHI, T.; SUZUKI, W.; TANAKA, H.; ABE, T. Highly variable pollination patterns in *Magnolia obovata* revealed by microsatellite paternity analysis. **International Journal of Plant Sciences**, v. 16, p. 1047-1053, 2004.

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.

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.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

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.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

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: 63° 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.

SELKOE K. A.; TOONEN R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615-629, 2006.

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, 2004a.

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, 2004b.

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.

SUNNUCKS P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends Ecology Evolution**, 15: 199-203, 2000.

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.

VAN NIEKERK, J. M.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; FOURIE, P. H.; HALLEN, F. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v. 96, p. 781-798, 2004.

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^o ed. Weinheim, Germany: Wiley - VCH, 2001.

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^{1*}; Joilson S. Lima¹; José E. Cardoso²

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

*Autor for correspondence: 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, molecular characterization appears as an auxiliary mechanism for identifying these fungi. DNA sequence data (SSR, ITS and EF-1 α) were used to identify known members. The aim of this study was to characterize the population diversity of Botryosphaeriaceae associated with tropical trees in northeastern Brazil. A total of 105 isolates obtained from tropical plants species were used. An UPGMA dendrogram was constructed using Jaccard's Coefficient and there was a high variability among isolates. We also conducted a pathogenicity test of a group of 18 isolates. They were inoculated in two clones of cashew seedlings, BRS 226 and BRS 265. The data were analyzed using ANOVA, and means were compared by Scott-Knott's tests ($p > 0.05$). A high variation was observed among the isolates.

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

Introduction

The exploitation of many tropical fruit trees is an important economic and social activity in northeastern Brazil, such as the species of cashew, mango, *Spondias* sp., and sugar-apples. The main areas of cultivation are located in the semi-arid northeast, where these plants are usually subject to water stress due to the long period of low rainfall, leading the plants to stay stressed, making them vulnerable to attack by opportunistic pathogens such as *Lasiodiplodia theobromae*.

The Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Dothideomycetes, Ascomycota) 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., 2002), mango (Rubini et al., 2005), avocado (Costa et al., 2010), *Annona* spp (Mullen et al., 1991), and

Spondias spp. (Ponte et al., 1988). These microorganisms are ubiquitous and plurivorous fungi, able to infect over 500 plant species causing symptoms such as damping-off, root rot, plant wilt, leaf blight, canker, gummosis, fruit and seed rot, dieback of trees, witches broom, and stain in timber. The infection is generally associated to wound or stressed-weakened plants (Baird & Carling, 1998), as these fungi are considered a latent pathogen capable of endophytic infection (Cardoso et al., 2009). The taxonomic position of 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 (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). However, 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.

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 (Alves et al., 2008).

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 has 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., 2007), 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, β -tubulin gene, and elongation factor α -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, its important. Whether it accommodates similar or different fungal 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 (Gallery 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 α and pathogenicity tests.

Materials and Methods

Collection of isolates

Samples of diseased or asymptomatic branches and trunks of various tropical plants were collected in northeastern region of Brazil at different geographical and ecological areas. Diseased plants were characterized by canker or black branch dieback (Cardoso et al., 2002; Freire et al., 2002).

Plant samples were taken 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 asymptomatic 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 isolates (Table 1), previously characterized morphologically by Lima (2010), and transferred to Castellani and stored at room temperature in a fungal culture collection, hosted at the CNPAT (Fortaleza, Ceará, Brazil).

DNA isolation and 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), with modification. The concentration of the resulting DNA was determined using a NanoDrop® 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) version 1.0.

PCR mixtures contained 1X (1,5mM MgCl₂) GoTaq® Reaction buffer, 0.2 mM each dNTP, 1.0 μ M of each SSR-primer (upstream and downstream), 1.25 u GoTaq® Hot Start Polymerase (5u/ μ L), <0.5 μ g/50L of template DNA. Amplifications were carried out in total reaction volume of 50 μ L. 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 were performed on all isolates of the population of Botryosphaeriaceae (Table 1) using 15 primers, specifically designed to amplify regions containing SSR (Burgess et al., 2003; Cardoso & Wilkinson, 2008). The reactions using primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990), and primers EF1 α -728F and EF1 α -986R (Carbone et al., 1999) were performed in the same manner as previously described with the only change was the annealing temperature to 58°C. They used for amplifying and sequencing the internal transcribed spacer (ITS) and translation elongation factor (EF) regions respectively.

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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 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

Based on a total of 105 isolates Botryosphaeriaceae eighteen were selected based on the results obtained in this molecular characterization where they used for pathogenicity tests to determine the aggressiveness of these isolates (Table 1) into two commercially cashew varieties with known different reactions 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 petroleum jelly to prevent desiccation 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 means compared using the Scott-Knott's test, the 5% level of significance using the statistical program Sisvar 5.3 (Ferreira, 2011).

Results

DNA isolation and PCR amplification

Substantial amount of genomic DNA was isolated from mycelium mat of Botryosphaeriaceae isolates. All 17 pairs of primers (15 SSR, one pair ITS and one EF1- α) consistently generate strong amplification products with at least one DNA sample. Cluster analysis of the 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, such as the isolates 3 and 8, 4 and 9, 5 and 10, 29 and 30, 39, 40, 41 and 75, 48 and 59, 51 and 58, and the isolates 32 and 63. Some similarity groups were obtained from 105 isolates of Botryosphaeriaceae. Despite this, we observe a great variability of this family.

There was no association between the origin and the host of the isolates. Isolates from different regions show similarity of 100%, as the isolates, 29 and 30 (isolate to *Annona muricata* from Beberibe - CE and *Anacardium occidentale* from Alto Santo - CE, respectively), as well as isolates 51 (*A. occidentale* form Crato - CE) and 58 (*Mangifera indica* from Picos - PI, respectively). As well as the isolates 3 and 8, from sugar-apple (Pacajús - CE) and cashew (Pacajús - CE), respectively.

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 association between the origin and the host. Analyses of variance of the lesion length data indicated a significant treatment effect according to the Scott-Knott's test ($P=0.05$).

All species caused lesions and were significantly differed ($P < 0.05$) in the size of lesions produced on cashew seedlings. The isolates 13, 68, 90, 103 lesion lengths caused larger

(Figure 2). All 18 isolates used in the pathogenicity test showed a great variation in both the molecular level (Figure 1) at the level of aggressiveness (Figure 2). It is noteworthy that these isolates originated from different hosts and regions, showing that there is a wide adaptability of this group of fungi, as the same were obtained under different conditions, in other words, different hosts and regions.

In re-isolations, all fungal pathogens used in inoculation were successfully recovered (80 to 90%) when small pieces of inoculated shoots were placed on agar medium.

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 to different hosts, 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.

Data indicate a remarkably high level of genetic variability among isolates, which confirmed the cosmopolitan distribution and the lack of specificity of this family (Cardoso & Wilkinson, 2008; Mohali et al., 2007). 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.

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.

Preliminary study using nine isolates from *Pinus* sp. and *Eucalyptus* spp. has indicated that host plant was more important than geographical origin (Burgess et al., 2003), however the lack of host specificity was later suggested by Mohali et al. (2005) among three host species (*i.e. Pinus caribaea*, *Eucalyptus urophylla* and *Acacia mangium*). In this study, the great variability among isolates has been assured as earlier described by Cardoso and 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 α 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 α data was included.

Alves et al. (2008) used ITS and EF-1 α 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 species.

Botryosphaeriaceae may have been co-evolved with tropical trees to a very intimate condition and later became pathogenic, as plants became threatened by environmental stresses. These fungi have been isolated very frequently from asymptomatic tissues of many species of Anacardiaceae, 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 α gene regions. However, the resulting phylogenies did not clearly separate all the species (Pavlic et al. 2007; Slippers et al. 2004).

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 different hosts.

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

- Adesemoye AO, Mayorquin JS, Wang DH, Twizeyimana M, Lynch SC, Escalen A (2014) Identification of species of Botryosphaeriaceae causing Bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease* 98:55-61.
- 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 and saprophytic fungi on intact senescent cotton roots. *The Journal of Cotton Science* 2:27-34.
- 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, 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, 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, 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.
- 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.
- 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.
- 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, Athayde C, Sena CB, Vale CC, Bezerra JL (1988) Etiologia da resinose de frutíferas do gênero *Spondias*. *Fitopatologia Brasileira* 13:280-281.

Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araújo WL, Santos DRD, Azevedo JL (2005) Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobromae cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, 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, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004) Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83–101.
- 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, Sninsky 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. The isolates are maintained in a fungal culture collection, hosted at the CNPAT (Fortaleza, Ceará, Brazil).

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>atemoia</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.

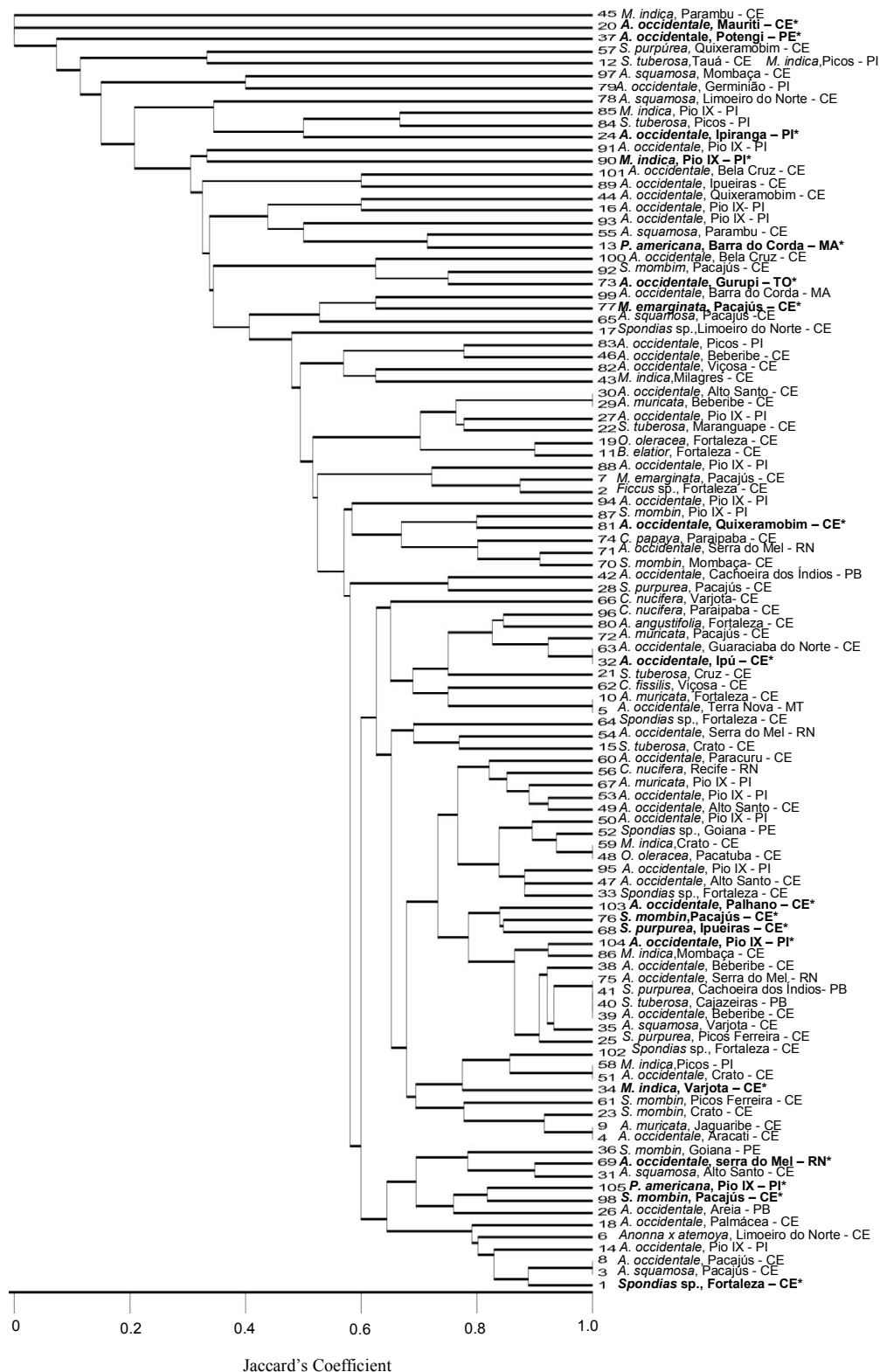


Fig. 1 – Dendrograms based on DNA amplification profile 105 single spore isolates to *L. theobromae* using 15 microsatellite primer, a pair ITS primer and a pair of EF1- α primer. Dendrogram was estimated by clustering a dissimilarity matrix (Jaccard's Coefficient) of binary DNA data using the unweighted pair group method of arithmetic means in the MVSP program.

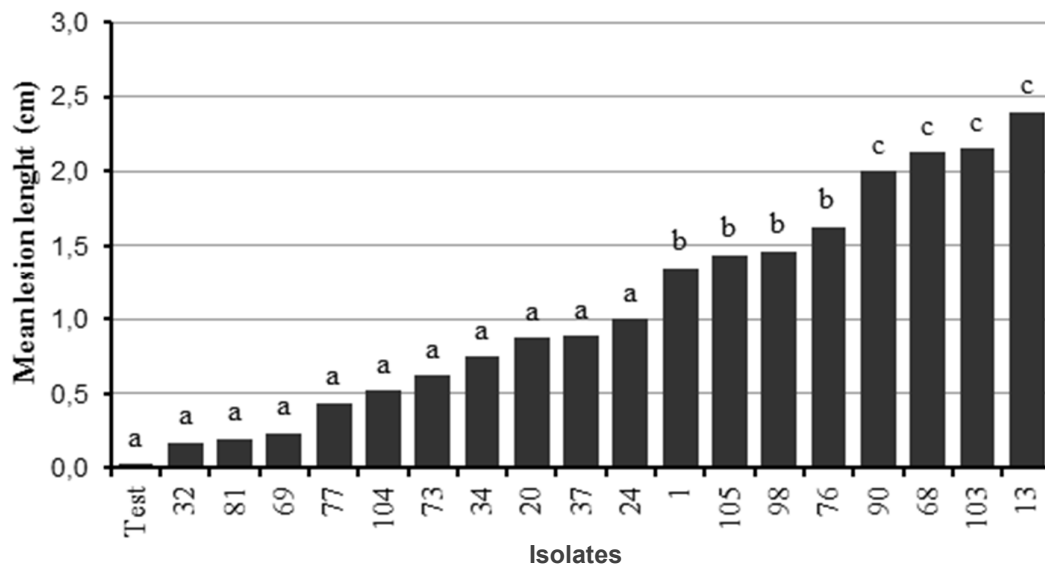


Fig. 2 – Mean lesion lengths on cashew seedlings inoculated with eighteen isolates of Botryosphaeriaceae. Means followed by different letters differ significantly ($p > 0.05$) according to Scott-Knott's test.

CAPÍTULO III
ESTUDO PROTEÔMICO DO FUNGO *Lasiodiplodia theobromae*, AGENTE CAUSAL
DA RESINOSE EM CAJUEIRO

Estudo proteômico do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal da resinose em cajueiro

José Glauber Moreira Melo^{1*}; Aline Kelly de Aquino Lima Cipriano¹; José Emilson Cardoso²; Darcy Mayra Furtado Gondim³; José Tadeu Abreu de Oliveira¹; Frederico Bruno Mendes Batista Moreno³.

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

*Autor para correspondência: joseglauber@yahoo.com.br

RESUMO

Lasiodiplodia theobromae é um fungo cosmopolita, endofítico e oportunista que ataca diversos hospedeiros, sendo considerado um grande problema para a fruticultura tropical. A identificação das proteínas é um passo crucial para uma melhor compreensão das bases moleculares da sua patogenicidade, cujas informações são de grande utilidade para o 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 foi encontrado na literatura. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: estabelecer um método de extração de proteínas fúngicas que contemple bom rendimento, solubilidade e compatibilidade com a técnica de eletroforese bidimensional; obter mapas bidimensionais das proteínas do fungo *L. theobromae*; e identificar, por meio da espectrometria de massas, as proteínas diferencialmente expressas em isolados mais agressivos em comparação com os menos agressivos. Quando o perfil eletroforético foi analisado, foi possível identificar 700 spots, sendo 96 diferencialmente expressas, onde 95 spots foram exclusivos do grupo mais agressivo e somente um do grupo menos agressivo. 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: *Anacardium occidentale*, Botryosphaeriaceae, proteômica.

ABSTRACT

Lasiodiplodia theobromae is a cosmopolitan fungus, endophytic and opportunistic attacking other hosts, is considered a major problem for tropical fruit production. The identification of proteins is a crucial step towards a better understanding of the molecular basis of pathogenicity, which information is of great utility for plant breeding as well as in management studies of the disease. Several studies concerning this pathogen are known, however, no study has the proteomic level was found in the literature. Thus, the objectives of this study were to establish an extraction method of fungal proteins that includes good yield, solubility and compatibility with two-dimensional electrophoresis; obtain two-dimensional maps of the fungus *L. theobromae* proteins; and identifying, by mass spectrometry, the differentially expressed proteins in more aggressive isolates in comparison with the less aggressive. When the electrophoretic profile was analyzed, it was possible to identify 700 spots, 96 differentially expressed, where 95 spots were exclusive to the more aggressive group and only a less aggressive group. 84 proteins were identified. Some proteins expressed only in the most aggressive isolates have been described as virulence factors in other fungi. The proteins identified only in more aggressive isolates are potential candidates for the development of pathogenic diagnostic markers, thus requiring further study for confirmation. Thus, through this pioneering work, preliminary characterization of the protein profile of the fungus *L. theobromae* give some indication of the mechanisms involved in their aggressiveness was possible.

Key words: *Anacardium occidentale*, Botryosphaeriaceae, proteomic.

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. Além disso, a maioria dos patógenos - incluindo quase todos os biotróficos - 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; CHERK; SOMERVILLE, 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 (BERG, 2009; GONZÁLEZ-FERNANDEZ; JORRIN-NOVO, 2012).

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

L. theobromae é um fungo cosmopolita, polífago e oportunista, com pouca especificação 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 dificultado, 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; SILVA; RIBEIRO, 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 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 métodos 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 a nível molecular. Estudos de proteômica de fungos filamentosos começaram apenas recentemente 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 usada 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 caracterizar 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 que 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; CASTRO; FONTES, 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 trípticos, possibilitando determinar sua sequência de

aminoácidos. Sua principal desvantagem está na dificuldade de interpretação dos espectros e de distinção entre os aminoácidos isobáricos (CUNHA; CASTRO; FONTES, 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 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, os objetivos deste trabalho foram estabelecer um método de extração de proteínas do fungo *L. theobromae*, que contemple bom rendimento, solubilidade e compatibilidade com a técnica de eletroforese bidimensional, obter mapas bidimensionais das proteínas do referido fungo, verificar e identificar proteínas diferencialmente expressas entre isolados mais e menos agressivos do fungo quando inoculados 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, e em seguida, liofilizadas durante 48 horas.

2.3. Estabelecimento do método de extração de proteínas de *L. theobromae* para análise proteômica

Os materiais fúngicos obtidos após a liofilização foram macerados utilizando almofariz e pistilo, sendo adicionado nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Para a extração proteica, foram adicionados 350mg 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 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado 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 serão descritos a seguir. As extrações foram realizadas em triplicata.

2.3.1. Método 1: Precipitação com solução de acetona, TCA e Fenol

Este método foi baseado no descrito por Gondim (2010) com algumas alterações. Nas amostras, foram adicionadas 7 ml da solução Acetona: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 microtubo de 2 mL 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 $15.000 \times g$ 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 ($10.000 \times g$ a 4°C por 10 min) a fase fenólica superior foi coletada e re-extraída com 1 ml da solução de extração tampão, sendo o material agitado por 10 min a 4°C , seguido de centrifugação ($10.000 \times g$ a 4°C por 10 min). Essa re-extração é necessária para obter uma maior quantidade de proteínas.

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 ($15.000 \times g$ a 4°C por 30 min) o sobrenadante foi descartado 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 $15.000 \times g$ 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 ($10.000 \times g$ 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% em acetona (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha), homogeneizadas em vórtex a 4°C por 10 min e incubadas *overnight* a -20°C .

Após centrifugação ($10.000 \times g$ a 4°C por 30 min), o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 2 ml de acetona 80%. Após nova centrifugação a $10.000 \times g$ 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: Solubilização 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 mM 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 ressuscendido 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 ressuspensionado 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 diluídos (5µL da amostra e 95 µL de água ultrapura). 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 integridade e a distribuição das bandas das proteínas, utilizou-se em um volume total de 25 µL, onde quantidades iguais de extrato de proteína (4µg) 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 desnaturadas 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. Eletroforese bidimensional 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 quantidade de proteínas aplicada foi 250 mg.

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 reidratação [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 de 12,5%, 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 *et al.*, 2004). As imagens dos géis com proteínas coradas foram obtidas por meio do ImageScanner (Amersham Biosciences) e calibradas pelo programa LabScan v. 5.0 (GE Healthcare), sendo 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.

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[®] (GE Healthcare) e analisadas com o software PD-Quest[™] (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

Os *spots* foram retirados 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* foram descorados com 400 µl de NH₄HCO₃ (m/v) a 25 mM 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, secados à 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 NH₄HCO₃ 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 NH₄HCO₃ 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 trípticos extraídos foram então centrifugados e concentrados em “Speed Vac”.

Os peptídeos secos foram dissolvidos em solução de ácido fórmico a 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 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 (Walters 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 da cisteína, possível oxidação da 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 dados proteicos do NCBI escolhendo como limitação taxonômica *Fungi taxa*.

3. RESULTADOS

3.1. Estabelecimento do método 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 obtidos 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 impurezas 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 2D-PAGE.

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

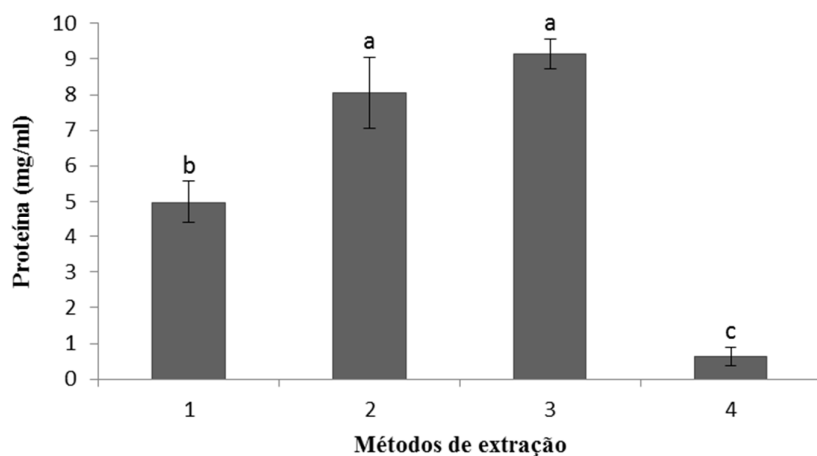
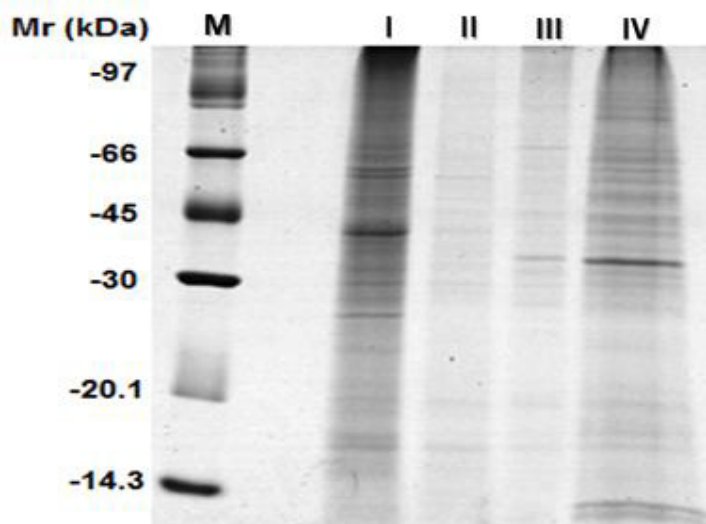


Figura 2 - Gel SDS-PAGE a 12,5% dos protocolos de extração de proteínas do fungo *L. theobromae*. M - marcador, I – método 1, II – método 2, III – método 3, IV – método 4. Fortaleza, 2014.



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 arrastes e uma focalização melhor dos spots e, principalmente, sua 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).

Com relação ao número total de spots, foram detectados em média, 586 ± 20 spots para o grupo I e 492 ± 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 que um único spot foi verificado como exclusivo para o grupo II. A partir destas informações, os spots foram retirados 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.). Foi usada a mesma quantidade de proteínas para os 2 grupos. 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.

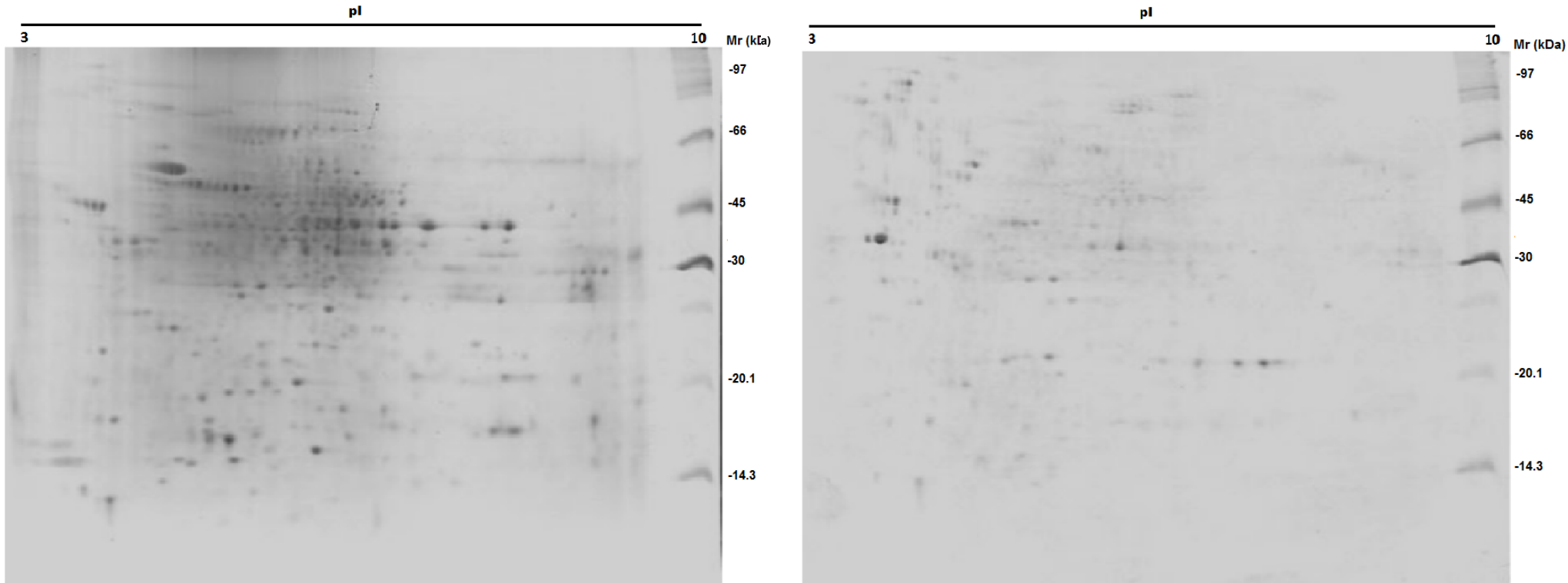
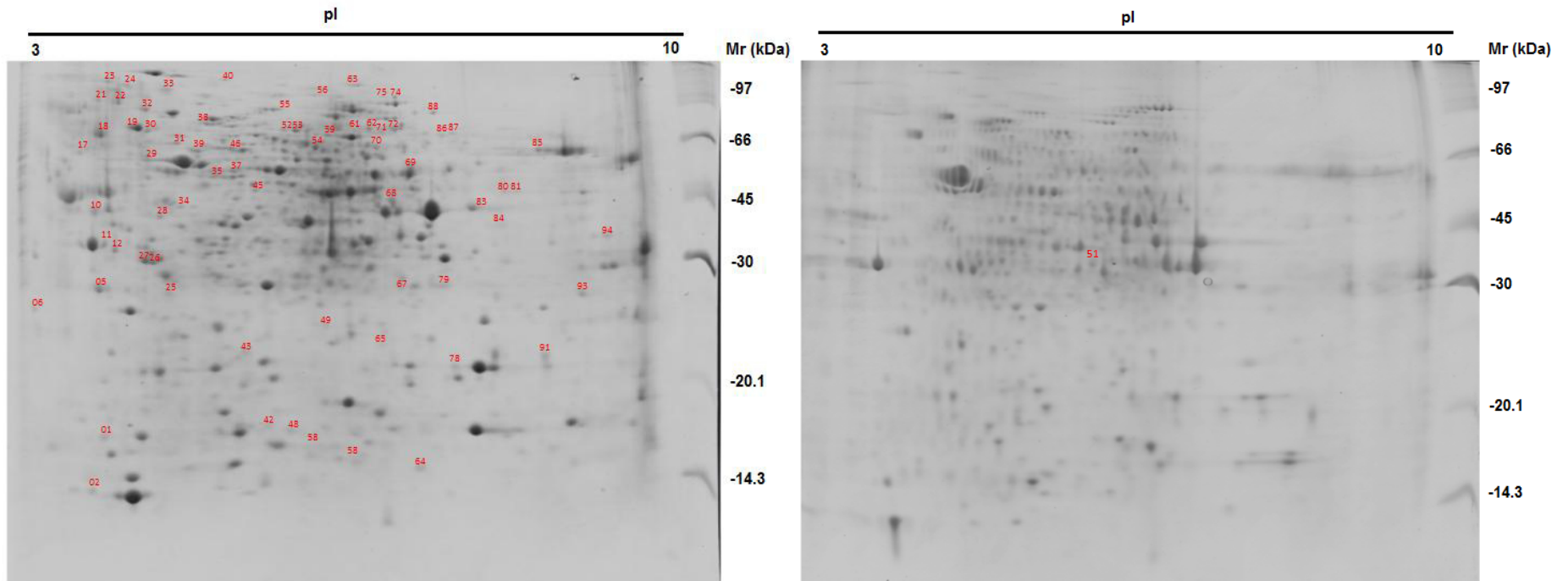


Figura 4 - Perfil dos géis bidimensionais de proteínas extraídas de *L. theobromae* pelo método “1” dos isolados mais agressivos – grupo I (à esq.) e menos agressivos – grupo II (à dir.), separados em gel de acrilamida a 12,5%. 250 µg de proteínas foram separadas por focalização isoeétrica em tiras de 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 com 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*, *fungai 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 (GAPDH), indentificado em *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.

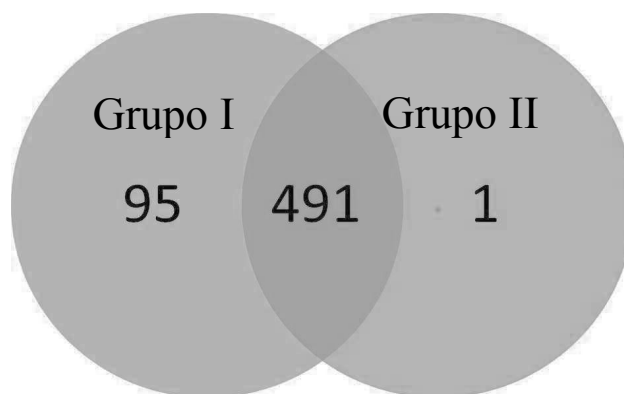


Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, através de análise por UPLC-ESI-Q-TOF e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot ^a	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)
				Experimental	Teórico		
<i>Atividades enzimáticas</i>							
2	gi 429857347	guanyl-specific ribonuclease fl	<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>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.63/19.13	4.36/10.90	141	19
10	gi 407928836	Peptidase A1	<i>Macrophomina phaseolina</i>	3.65/61.58	5.93/26.85	68	5
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
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
24	gi 485916460	putative choline dehydrogenase protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	4.02/138.68	4.68/71.34	76	1
31	gi 407916991	Peptidase A1	<i>Macrophomina phaseolina</i>	4.61/95.63	4.74/47.31	182	9
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
17	gi 407916986	Peptidase S8/S53 subtilisin/kexin/sedolisin	<i>Macrophomina phaseolina</i>	3.62/94.07	4.75/65.94	59	1
23	gi 485926408	Putative a chain endothiapsin	<i>Neofusicoccum parvum</i>	3.80/141.75	5.44/42.53	108	7
25	gi 407929406	Inorganic pyrophosphatase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	4.50/32.98	5.41/22.58	415	34
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
52	gi 557722301	phosphoglucomutase	<i>Byssoschlamys spectabilis</i>	5.87/99.64	6.14/87.68	217	5
59	gi 212526916	N-acetylglucosamine-phosphate mutase	<i>Talaromyces marneffe</i>	6.34/97.85	5.90/59.27	149	4
67	gi 189194551	dihydrolipoamide succinyltransferase	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	7.25/32.41	6.09/50.67	65	4
70	gi 407920945	acyltransferase ChoActase/COT/CPT	<i>Macrophomina phaseolina</i>	6.96/98.72	8.49/73.11	172	9
90	gi 4588118	alkaline serine protease Pen c2	<i>Penicillium citrinum</i>	9.45/17.14	6.00/48.14	123	4

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 ^a	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)
				Experimental	Teórico		
<i>Resposta ao estresse oxidativo</i>							
5	gi 407927209	Fungal lignin peroxidase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	3.67/36.25	5.22/32.85	86	4
<i>Reserva de nutrientes</i>							
18	gi 485917627	putative oxalate protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	3.72/104.37	4.57/48.87	157	13
<i>Metabolismo e Enovelamento de Proteínas</i>							
6	gi 385302704	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Dekkera bruxellensis</i>	3.03/26.12	7.56/42.19	76	2
47	gi 305381752	cyclophilin 1 short isoform	<i>Alternaria longipes</i>	6.04/14.35	6.82/20.23	145	18
84	gi 385302704	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Dekkera bruxellensis</i>	8.32/52.19	7.56/42.19	60	2
95	gi 407929121	Aspartate/other aminotransferase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	9.38/66.53	9.18/46.21	401	21
<i>Homeostase Redox</i>							
19	gi 407917126	Thioredoxin	<i>Macrophomina phaseolina</i>	4.01/106.88	4.68/58.42	373	14
30	gi 407917126	Thioredoxin	<i>Macrophomina phaseolina</i>	4.27/103.54	4.68/58.42	330	15
66	gi 485925663	putative mn superoxide dismutase protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	7.16/27.90	9.14/25.34	145	11
83	gi 145252658	oxidoreductase, 2-nitropropane dioxygenase family	<i>Aspergillus niger</i>	8.17/57.16	6.67/37.55	96	6
88	gi 407916900	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	<i>Macrophomina phaseolina</i>	7.56/124.73	8.53/97.12	492	14
<i>Proteção e defesa</i>							
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
32	gi 576931550	GMC oxidoreductase	<i>Bipolaris oryzae</i>	4.12/119.45	6.85/74.16	183	8
40	gi 407920048	heat shock protein 70	<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
69	gi 485916230	putative elongation factor 2 protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	7.27/76.43	6.31/93.54	234	6
74	gi 226287792	elongation factor 2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	7.10/126.51	6.36/93.63	299	6
91	gi 407924727	pathogenesis associated protein Cap20, putative	<i>Macrophomina phaseolina</i>	8.81/21.27	8.54/19.88	166	22

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 ^a	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)
				Experimental	Teórico		
<i>Metabolismo energético</i>							
1	gi 485929592	putative regulatory protein suaprgal protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	3.57/16.58	4.18/29.27	67	4
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
36	gi 407927250	Succinyl-CoA synthetase beta subunit	<i>Macrophomina phaseolina</i>	5.19/80.12	5.68/48.10	385	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
49	gi 239614827	ATP-citrate-lyase	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	6.16/26.02	6.40/52.94	125	7
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
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
64	gi 294957165	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial (GAPDH)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7.35/14.87	5.31/18.47	62	11
75	gi 407917511	Methionine synthase vitamin-B12 independent	<i>Macrophomina phaseolina</i>	6.93/127.07	6.43/86.29	383	10
78	gi 387233033	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	<i>Neocallimastix frontalis</i>	7.75/21.24	6.45/35.90	76	4
81	gi 407921479	Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	8.49/62.81	8.87/41.20	179	13
85	gi 145253056	ATP synthase subunit alpha	<i>Aspergillus niger</i>	8.73/83.72	9.14/60.02	540	19
87	gi 145253056	ATP synthase subunit alpha	<i>Aspergillus niger</i>	7.73/97.56	9.14/60.02	144	4
96	gi 407917511	Methionine synthase vitamin-B12 independent	<i>Macrophomina phaseolina</i>	9.38/77.91	6.43/86.29	481	17

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 ^a	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)
				Experimental	Teórico		
<i>Atividade catalítica</i>							
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
39	gi 407924800	Hexokinase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	4.87/90.25	5.29/45.46	271	10
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
53	gi 407921831	AICARFT/IMPCHase bienzyme	<i>Macrophomina phaseolina</i>	6.20/98.33	6.27/65.49	188	11
68	gi 407918916	Thiamine pyrophosphate enzyme TPP-binding protein	<i>Macrophomina phaseolina</i>	7.06/63.43	5.91/63.95	292	16
71	gi 494827166	alpha-mannosidase	<i>Coniosporium apollinis</i>	7.10/100.35	5.96/123.00	130	3
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>Arabidopsis thaliana</i>	7.17/104.36	6.61/68.50	194	6
80	gi 832919	BMH1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.34/63.09	5.89/22.02	57	5
<i>Componentes do RNA</i>							
35	gi 116180670	cell cycle control protein-related	<i>Chaetomium globosum</i>	5.06/76.54	5.01/44.85	186	8
<i>Sinalização celular</i>							
42	gi 320590717	14-3-3 family protein	<i>Grosmannia clavigera</i>	5.66/17.11	4.98/34.45	172	9
<i>Atividade de canais de ânions</i>							
94	gi 407928557	Porin eukaryotic type	<i>Macrophomina phaseolina</i>	9.50/50.24	8.99/29.72	151	17

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 ^a	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)
				Experimental	Teórico		
<i>Proteínas não caracterizadas</i>							
48	gi 389645829	hypothetical protein	<i>Magnaporthe oryzae</i>	6.20/16.65	5.50/16.57	63	7
51	gi 552919150	hypothetical protein	<i>Rhizophagus irregularis</i>	6.14/51.37	8.84/96.95	54	2
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
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
65	gi 146412442	hypothetical protein	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	6.96/23.38	6.13/55.07	61	2
76	gi 171677169	hypothetical protein	<i>Podospora anserina</i>	6.85/127.22	9.42/54.84	54	3
79	gi 296416283	hypothetical protein	<i>Tuber melanosporum</i>	7.62/34.67	7.94/72.40	137	7
86	gi 398409000	hypothetical protein	<i>Zymoseptoria tritici</i>	7.61/96.58	6.05/59.17	66	2
93	gi 407917508	hypothetical protein	<i>Macrophomina phaseolina</i>	9.24/29.13	8.53/20.97	77	11

^a – os spots estão identificados na figura 4.

^b – ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (Mr).

^c – 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. Método 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, onde o uso de variedades resistentes ao seu ataque, torna-se cada vez mais necessário em que 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 método visando obedecer a critérios como a obtenção de maior rendimento, solubilização e pouca contaminação 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 (VÁLCU; SCHLINK, 2006).

Desta forma, métodos 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 em extração fenólica e na precipitação com acetona/TCA/2-ME apresentou uma ótima eficiência na extração de proteínas do fungo, além de gerar géis bidimensionais apresentando excelente resolução, 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 métodos e, mesmo com materiais diferentes, no caso tecido lenhoso do cajueiro, o mesmo método 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 métodos 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, 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, constatou-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 presentes ou ausentes, ou seja, aqueles exclusivos em um grupo de fungo. Desta forma, observaram-se noventa e seis spots diferenciais, sendo estes, retirados, digeridos com tripsina, e então, submetidos à identificação por MS.

Comparando-se os padrões eletroforéticos 2D dos isolados do grupo I (mais agressivo) e grupo II (menos agressivo), verificou-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 agressividade, apenas as proteínas diferenciais foram utilizadas como parâmetro. Essas proteínas estão descritas na tabela 1.

Mancini *et al.* (2013) estudando três espécies de *Diplodia* apresentando características morfológicas e genéticas muito semelhantes, conseguiu distingui-los 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, conforme citado anteriormente, os mesmos apresentam várias proteínas em comum. Estas proteínas presentes no grupo mais agressivos e ausentes no grupo antagonico 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 PMF (*fingerprinting*) 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*, 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 clara. Na maioria dos casos, a especificidade do 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).

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 fosfogluose no patógeno do 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 estresses 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.*, 2007). 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 cytosolic*. 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 ampla variedade de processos celulares, incluindo a resposta a estresse ambiental, controle do ciclo celular, regulação da sinalização por cálcio e o controle da 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.*, 2003). O papel de ciclofilina como um fator de virulência em *Botrytis 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 *B. 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 α -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; RAMPITSCH; DAAYF, 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 agressividade 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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

WANG, H.; KESINGER, J. W.; ZHOU, G.; WREN, J. D.; MARTIN, G.; TURNER, S.; TANG, Y.; FRANK, M. B.; CENTOLA, M. Identification and characterization of zebrafish ocular formation genes. **Genome**, v. 51, n. 3, p. 222-235, 2008.