



Metodologia?

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ISOLADOS DE *Lasiodiplodia theobromae* CAUSADORES DE RESPOSTAS DIFERENCIADOS EM DIVERSAS FRUTEIRAS

Rosilene Oliveira Mesquita¹; Marlos Alves Bezerra²; José Emilson Cardoso²; Enéas Gomes Filho³; Raimundo Bezerra Costa⁴

¹Mestranda em Fisiologia Vegetal – Univ. Federal de Viçosa – rosilenemesquita@gmail.com

²Engº Agrônomo, D.Sc. - Embrapa Agroindústria Tropical – R. Dr. Sara Mesquita, 2270 Pici - marlos@cnpat.embrapa.br

³Professor da Universidade Federal do Ceará – egomesf@ufc.br

⁴Professor da Universidade Estadual do Ceará – raibezcosta@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é um fitopatógeno que causa doenças em diversos hospedeiros, promovendo perdas consideráveis na produtividade das plantas. Em função da importância dessas doenças e da dificuldade do seu controle, faz-se necessário a utilização de novas ferramentas para o estudo da interação patógeno-hospedeiro, visando o manejo adequado da planta. Nesse sentido o presente trabalho teve por objetivo elaborar mapas protéicos, utilizando a eletroforese bi-dimensional, de quatro isolados do fungo *L. theobromae*, causadores de diferentes sintomas em cajueiro, mangueira e sapotizeiro, a fim de identificar as principais proteínas expressadas, sejam diferencialmente ou em comum nos diversos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

As respostas bioquímicas e moleculares do fungo *L. theobromae* foram estudadas em quatro isolados do fungo, que causam patogenicidade e respostas diferenciadas em três fruteiras tropicais. Os isolados testados foram provenientes da micoteca do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, todos originários da região semi-árida nordestina. Os quatro isolados de *L. theobromae* causam as seguintes fitomoléstias: resinose (LT-01) e podridão-preta-da-haste (PPH) (LT-58) em cajueiro (*Anacardium occidentale*), morte-descendente (LT-56) em mangueira (*Mangifera indica*) e seca-descendente (LT-14) em sapotizeiro (*Manilkara achras* [Mill] Fosberg).



Os isolados selecionados foram cultivados em meio líquido batata-Dextrose (BD), durante 10 dias. Em seguida, a manta miceliana foi filtrada a vácuo, macerada com nitrogênio líquido e liofilizada.

Para a extração das proteínas, o material liofilizado foi precipitado com uma solução de TCA 10%, seguido de lavagem com acetona gelada. Em seguida, o material foi novamente centrifugado e o precipitado final recolhido, secado e armazenado a -20°C para posterior análise.

Para a solubilização das proteínas, 170 mg do pó protéico foi adicionado a 1 mL de tampão de lise, o qual continha uréia a 7 M, CHAPS a 2%, IPG buffer a 2% (pH 3-10, Amersham Biosciences, Sweden) e DTT a 0,3%, como descrito por Rabilloud et al. (1997). Após, determinou-se a concentração de proteínas no sobrenadante pelo método do Coomassie Blue (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Após a quantificação, as proteínas foram carregadas diretamente no gel, com gradiente de pH imobilizado na faixa de 3 a 10. A focalização isoelétrica das proteínas foi feita em um IPGphor. A segunda dimensão foi realizada em géis de poliacrilamida, contendo o detergente SDS (SDS-PAGE), enquanto a detecção das proteínas resolvidas em 2-DE/SDS-PAGE foi feita através da afinidade das proteínas pela prata.

As análises eletroforéticas e as comparações entre os quatro isolados foram realizadas tendo como referencial o isolado LT-01, causador da resinose em cajueiro. A análise dos géis bi-dimensionais foi feita, inicialmente, por intermédio da digitalização das imagens em ImageScanner II, as quais foram comparadas e os "spots" de proteínas tiveram seus atributos determinados (massa molecular e ponto isoelético) com o emprego do Software ImageMaster 2D Platinum, versão 6.0 (Amersham Biosciences, Sweden).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise eletroforética bidimensional (2D) revelou que o fungo LT-01 apresentou um total de 329 proteínas, sendo 19,2% destas exclusivas desse isolado. Por sua vez, os fungos LT-14, LT-56 e LT-58 apresentaram um total de 536, 273 e 550 proteínas, respectivamente, sendo que destas 37,5, 64,5 e 51,2% são exclusivas de cada isolado, respectivamente (Tabela 1).

Esses resultados indicam que embora os isolados sejam classificados como da mesma espécie, existe uma grande variabilidade entre os mesmos. Cardoso (2004), caracterizou geneticamente 50 isolados de *L. theobromae* e também encontrou diferenças genéticas entre os mesmos. Da mesma forma, variações quanto à patogenicidade e agressividade de

isolados de diferentes hospedeiros e até mesmo entre isolados da mesma cultura já foram registrados, sendo a razão dessa variação desconhecida (PEREIRA et al. 2006).

TABELA 1. Comparação entre os quatro isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. LT-01: resinose em cajueiro; LT-14: seca decedente em sapotizeiro; LT-56: morte decedente em mangueira e LT-58: podridão-preta-da-haste.

| Isolados | Total de Spots | Spots exclusivos | % spots exclusivos | Spots em comum |
|----------|----------------|------------------|--------------------|----------------|
| LT-01 | 329 | 63 | 19,2 | 5 |
| LT-14 | 536 | 201 | 37,5 | |
| LT-56 | 273 | 176 | 64,5 | |
| LT-58 | 550 | 283 | 51,5 | |

A comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas dos fungos revelou que existem apenas 5 proteínas em comum nos quatro isolados de *Lasiodiplodia theobromae*: LT-01, LT-14, LT-56 e LT-58 (Figura 1), podendo estas estarem relacionadas com a classificação dos isolados na mesma espécie, mesmo apresentando respostas sintomáticas diferenciadas em seus respectivos hospedeiros. No entanto, essas proteínas em comum tiveram suas expressões alteradas, ou seja, houve aumento ou redução na intensidade de expressão em cada isolado.

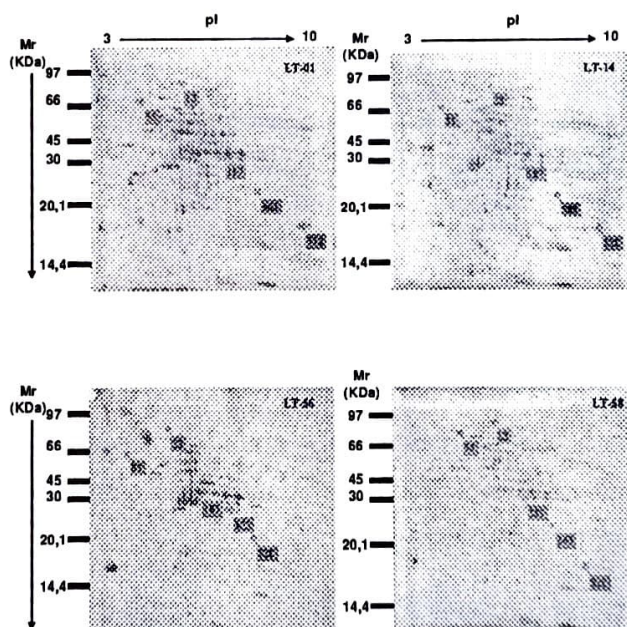


FIGURA 1. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de quatro isolados de fungos de *Lasiodiplodia theobromae* causadores das seguintes fitomoléstias: resinose (LT-01) e podridão-preta da haste (PPH) (LT-58) em cajueiro, seca decedente (LT-14) em sapotizeiro e morte decedente (LT-56) em mangueira.



Uma caracterização inicial, com base no peso molecular e no ponto isoelétrico das cinco proteínas em comum, revelou que essas proteínas apresentam massas moleculares variando de 17,8 a 88,7 KDa. Da mesma forma, o ponto isoelétrico das mesmas variou de 3,8 a 9,1 (Tabela 2).

Uma simples análise dos padrões eletroforéticos 2D dos quatro isolados, mostra que os mesmos apresentam grandes variações nas expressões gênicas, tanto com relação ao número total de proteínas, ao número de proteínas comuns e de proteínas específicas de cada isolado, quanto ao tipo de expressão. Tais resultados adicionam um nível de complexidade ainda maior para o entendimento das modificações genéticas envolvidas em cada isolado. Portanto, tornam-se indispensáveis o sequenciamento e a identificação das proteínas em comum, e aquelas com níveis de expressão alterados, para que se possa inferir sobre seus possíveis papéis na patogenedicidade de seus respectivos hospedeiros.

TABELA 2. Comparação entre as cinco proteínas comuns aos quatro isolados de *Lasiodiplodia theobromae*, baseado nos parâmetros: ponto isoelétrico (pI), peso molecular (Mr) e % de intensidade de expressão.

| Nº Proteína | pI | Mr (kDa) | % Intensidade | | | |
|-------------|-----|----------|---------------|--------|--------|--------|
| | | | LT-01 | LT-14 | LT-56 | LT-58 |
| 12 | 5,1 | 88,7 | 0,0709 | 0,0962 | 0,1150 | 0,0668 |
| 38 | 3,8 | 69,8 | 0,8509 | 0,4162 | 0,0850 | 0,3005 |
| 187 | 6,5 | 32,5 | 0,4611 | 0,1176 | 0,8893 | 0,2632 |
| 310 | 9,1 | 17,8 | 0,0905 | 0,1420 | 0,0884 | 0,0724 |
| 363 | 7,6 | 22,9 | 0,0700 | 0,1305 | 0,3732 | 0,1385 |

CONCLUSÃO

Os padrões protéicos dos quatro isolados foram bastante diferenciados, não sendo possível se estabelecer uma correlação entre a doença e a patogenedicidade em seus respectivos hospedeiros, sugerindo ainda a possibilidade de existir diferentes espécies dentro do complexo atualmente denominado de *Lasiodiplodia theobromae*.

REFERÊNCIAS

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



XX Congresso Brasileiro de Fruticultura
54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture
12 a 17 de Outubro de 2008 - Centro de Convenções – Vitória/ES

CARDOSO, J.E. Genetical variability of a *Lasiodiplodia theobromae* population and patogenicity to cashew and soursop plants. Postdoctor Report, 16p. 2004.

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.

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316, 1997.

20080731_212410