

## Caracterização rápida e inequívoca de patógenos do cacauero (*Phytophthora* spp.) baseada nos perfis de proteínas por MALDI-MS.

Fábio Neves dos Santos<sup>1\*</sup> (PG), Kátia R. A. Belaz<sup>1</sup> (PG), Alessandra Tata<sup>1</sup> (PG), Dilze M. A. Magalhães<sup>2</sup> (PQ), Marcos N. Eberlin<sup>1</sup> (PQ).

\*fabiof6@gmail.com

<sup>1</sup>Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, IQ-UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), CEPLAC, Ilhéus-BA, Brasil.

Palavras Chave: *Phytophthora* spp., patógenos, podridão-parda, cacauero, MALDI-TOF-MS.

### Introdução

Os patógenos do gênero *Phytophthora* spp. (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. heveae*) são causadores da podridão-parda do cacauero. Dessas espécies, *P. citrophthora* e *P. palmivora* são as duas mais agressivas e *P. palmivora* a mais prevalente na região cacauera da Bahia, sendo responsáveis pelas perdas de produção de cacau<sup>1</sup>. A identificação rápida, segura e inequívoca de patógenos é de grande importância para a cacauicultura. O método de observação das características morfológicas é subjetivo e tem baixa precisão devido à semelhança morfológica das espécies, além de procedimentos trabalhosos e demorados<sup>2</sup>. A caracterização de patógenos por espectrometria de massas MALDI-MS é rápida, segura e inequívoca, visto que está baseada nos perfis das proteínas ribossomais, característico de cada espécie. Assim, o objetivo desse trabalho foi a caracterização de patógenos do cacauero (*Phytophthora* spp.) através dos perfis de proteínas ribossomais obtidos por MALDI-TOF-MS.

### Resultados e Discussão

As cepas dos patógenos cultivadas em BDA (Batata, Dextrose, Agar) foram cedidas pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), CEPLAC, Ilhéus-BA, sendo dois isolados de *P. palmivora* (250 e 262), *P. citrophthora* (101 e 161), *P. capsici* (135 e 437) e um isolado *P. heveae* (1009). As cepas foram inativadas com 1,2 mL de (EtOH/H<sub>2</sub>O 3:1), o solvente foi descartado e as amostras secas. Em seguida, as proteínas ribossomais foram extraídas com 50 µL (70% ácido fórmico/ACN 1:1), por agitação (vortex) seguida de centrifugação a 13.000 xg por 2 min. A fase superior foi coletada e 1 µL foi adicionado a placa metálica do MALDI seguida pela adição de 1 µL da matriz DHB. As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas equipado com sistema de ionização por laser (Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF) e os espectros processados no software Flex Analysis (Bruker Daltonics). Os espectros mostraram íons mais intensos na região de *m/z* 2000-7000. Dez réplicas de cada um dos

isolados mostraram alta similaridade e repetibilidade, sendo os principais íons observados nos isolados *P. heveae* *m/z* (2037.9; 2389.0 e 2430.4); *P. palmivora* *m/z* (2085.9; 5326.8; 6227.7; 6276.3 e 6378.1); *P. capsici* *m/z* (2049.8; 2387.0; 2665.9; 3342.9; 6296.5 e 6299.3); *P. citrophthora* *m/z* (3149.0; 5112.7; 6302.9; 6347.5 e 7001.7). Dez espectros de cada isolado foram utilizados para obter um espectro médio característico de cada espécie no software Flex Analysis. Os espectros foram adicionados à biblioteca de espectros Biotyper 3.0. Testes “cegos” foram realizados para validar a biblioteca e confirmar a viabilidade de caracterizar os patógenos de forma inequívoca e confiável.

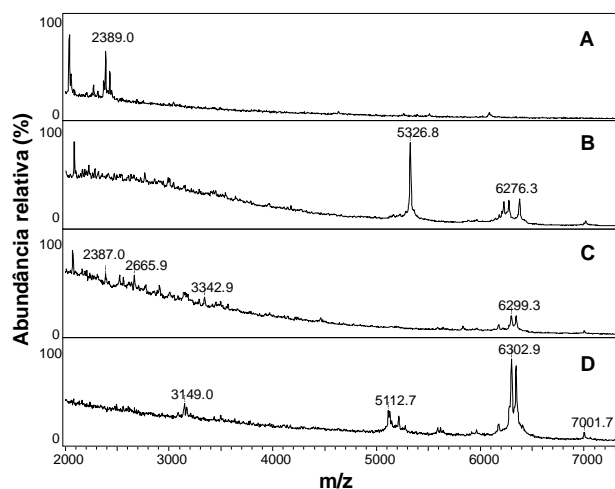


Fig 1. *P. heveae* (A), *P. palmivora* (B), *P. capsici* (C) e *P. citrophthora* (D).

### Conclusões

Quatro espécies de patógenos do cacauero do gênero *Phytophthora* spp., foram caracterizadas de forma inequívoca e confiável através dos perfis de proteínas ribossomais obtidos por MALDI-TOF-MS.

### Agradecimentos

UNICAMP, CEPLAC/CEPEC, CNPq, FAPESP.

<sup>1</sup>Luz, E.D.M.N.; Silva, S.D.V.M. Livraria Editora Rural. Ed. Campinas, 2001, v. 1, 175-265.

<sup>2</sup> Braga, P.A.C.; Tata, A.; dos Santos, V.G.; Barreiro, J.R.; Schwab, N.V.; Veiga dos Santos, M; Eberlin, M.N.; Ferreira, C.R. Rsc Advances, 2013, 3, 994-1008.